

DOTTORATO DI RICERCA IN
“METODOLOGIE ANALITICHE NELLA TECNOLOGIA ALIMENTARE E
NELL’ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE”

XXI ciclo

VET/04

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA
Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Sezione di Igiene e Tecnologia Alimentare

IMPIEGO DELLA SPETTROMETRIA DI MASSA
NELL’ANALISI DI FUMONISINE IN ALIMENTI E MATRICI
DI ORIGINE ANIMALE

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ROBERTO ROSMINI

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa BARBARA LUGOBONI

Docente guida:

Chiar.mo Prof. GIAMPIERO PAGLIUCA

Anno Accademico 2008/2009

INDICE

CAPITOLO 1 **1**

INTRODUZIONE ALL'ANALISI DI FUMONISINE IN MATRICI DI ORIGINE ANIMALE **1**

1.1 LE MICOTOSSINE	1
1.1.1 Fattori influenti sullo sviluppo fungino e sulla sintesi delle micotossine	8
1.1.2 La legislazione sulle micotossine	14
1.1.3 Prevenzione della contaminazione e trattamento degli alimenti contaminati	17
1.2 LE FUMONISINE	21
1.2.1 Meccanismo d'azione delle fumonisine e dei loro metaboliti	25
1.2.2 Tossicità negli animali	29
1.2.3 Patogenicità per l'uomo	34
1.2.4 Tossicocinetica, metabolismo e distribuzione nei tessuti delle fumonisine	37
1.2.5 Limiti di legge	39
1.2.6 Fumonisine nei prodotti di origine animale	43
1.2.7 Metodi di analisi delle fumonisine in matrici di origine animale	47

CAPITOLO 2 **52**

SCOPO DEL LAVORO E PRESENTAZIONE DELLA PARTE SPERIMENTALE **52**

CAPITOLO 3 **55**

MATERIALI E METODI **55**

3.1 SISTEMA HPLC-MS/MS	55
3.2 DETERMINAZIONE DI FB ₁ IN LATTE BOVINO	57
3.2.1 Materiali	57
3.2.2 Strumentazione	58
3.2.3 Condizioni HPLC-MS/MS	58

3.2.4 Estrazione della FB ₁ dal latte bovino	60
3.2.5 Validazione del metodo	61
3.3 DETERMINAZIONE DI FB ₁ , FB ₂ , HFB ₁ E HFB ₂ IN FEGATO DI MAIALE	65
3.3.1 Materiali	65
3.3.2 Strumentazione	68
3.3.3 Condizioni HPLC-MS/MS	69
3.3.4 Estrazione degli analiti (FB ₁ , FB ₂ , HFB ₁ e HFB ₂) dal fegato di maiale	70
3.3.5 Validazione del metodo	73
3.4 DETERMINAZIONE DI FB ₁ E FB ₂ IN ALIMENTI SECCHI COMPLETI E COMPLEMENTARI PER CANE	78
3.4.1 Materiali	78
3.4.2 Strumentazione	79
3.4.3 Condizioni HPLC-MS/MS	80
3.4.4 Estrazione della FB ₁ e FB ₂ dagli alimenti secchi per cane	81
3.4.5 Validazione del metodo	84
3.5 NORME DI SICUREZZA E PRESCRIZIONI AMBIENTALI	86

CAPITOLO 4 **87**

RISULTATI E DISCUSSIONI	87
4.1 DETERMINAZIONE DI FB ₁ IN LATTE BOVINO	89
4.1.1 Messa a punto del metodo	89
4.1.2 Validazione del metodo	95
4.1.3 Analisi dei campioni	102
4.2 DETERMINAZIONE DI FB ₁ , FB ₂ , HFB ₁ E HFB ₂ IN FEGATO DI MAIALE	104
4.2.1 Messa a punto del metodo	104
4.2.2 Validazione del metodo	110
4.2.3 Analisi dei campioni	116
4.3 DETERMINAZIONE DI FB ₁ E FB ₂ IN ALIMENTI SECCHI COMPLETI E COMPLEMENTARI PER CANE	120
4.3.1 Messa a punto del metodo	120
4.3.2 Validazione del metodo	123
4.3.3 Analisi dei campioni	129

CAPITOLO 5	134
-------------------	------------

CONCLUSIONI	134
--------------------	------------

CAPITOLO 6	138
-------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	138
---------------------	------------

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE ALL'ANALISI DI FUMONISINE IN MATRICI DI ORIGINE ANIMALE

1.1 LE MICOTOSSINE

Le micotossine sono dei prodotti naturali del metabolismo secondario di alcune specie di funghi microscopici saprofiti. Circa 200 specie sono state identificate come “tossigene” e quindi in grado di produrre micotossine. Tra queste, le principali appartengono ai generi *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, e *Fusarium sp.* (Krska R. *et al.*, 2008).

Nella figura sottostante si possono vedere l'aspetto al microscopio elettronico di due funghi microscopici filamentosi appartenenti ai generi *Penicillium sp.* (immagine a sinistra) e *Aspergillus sp.* (immagine a destra).

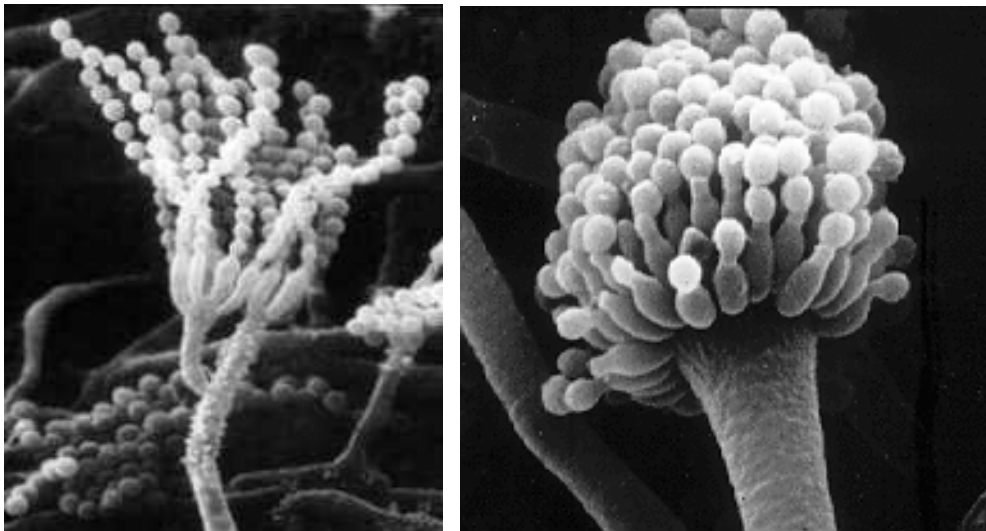


Figura 1: Immagini al microscopio elettronico di funghi del genere Penicillium sp. e Aspergillus sp..

Questi funghi sono in grado di crescere, in differenti condizioni climatiche ed ambientali, su svariati tipi di substrati vegetali (quali ad esempio cereali, semi oleaginosi, spezie, frutti e caffè). La crescita fungina su tali derrate può avvenire sia durante la fase di crescita in campo, ma anche che durante le successive fasi di raccolta, trasformazione, conservazione e stoccaggio (Zöllner P. e Mayer-Helm B., 2006).

Svariate centinaia di micotossine sono state scoperte negli ultimi cinquanta anni e questi composti rappresentano una classe estremamente eterogenea per caratteristiche strutturali e per proprietà chimico-biologiche.

Attualmente le micotossine rappresentano uno degli argomenti più rilevanti e preoccupanti nel campo della sicurezza alimentare (si stima che circa il 25 % delle coltivazioni mondiali siano contaminate da micotossine) (Bouhet S. *et al.*, 2004).

La loro tossicità e diffusione, il numero crescente delle derrate alimentari passibili di contaminazione, l'impatto delle micotossine sull'economia e sulla salute dell'uomo e degli animali, rappresentano le ragioni della crescente preoccupazione ed attenzione che si sta manifestando a livello mondiale nei confronti di questi contaminanti alimentari.

Aflatossine, ocratossine (prodotte soprattutto da alcune specie del genere *Aspergillus sp.*), fumonisine, tricoteceni, zearalenone (prodotte da *Fusarium sp.*), patulina (prodotta da *Penicillium sp.*) e gli alcaloidi dell'ergot (prodotti da *Claviceps sp.*) sono alcune micotossine che sicuramente meritano di essere citate, non solo per la frequenza con cui si trovano sulle derrate alimentari, ma anche per le importanti ripercussioni economiche e sanitarie che conseguono alla contaminazione dei prodotti alimentari.

Nella successiva tabella vengono riportate le principali micotossine, le specie fungine produttrici e le derrate alimentari in cui tali micotossine vengono ritrovate più di frequentemente (vedi Tabella 1).

In linea generale ogni specie fungina sintetizza una micotossina, ma occorre ricordare che alcuni miceti sono in grado di produrre più di una micotossina e che una singola micotossina può essere prodotta da differenti specie fungine (Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001). Ad esempio, come si nota anche in Tabella 1, *Aspergillus flavus* produce le aflatossine, ma anche delle tossine tremorgeniche, e la tossina patulina può essere prodotta da funghi del genere *Penicillium*, ma anche dei generi *Aspergillus* e *Byssosclamyces* (Bottarelli F., 1993).

Tabella 1: Micotossine, funghi produttori e derrate contaminate (Shephard G. S., 2008; Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001; Zöllner P. e Mayer-Helm B., 2001).

MICOTOSSINE	SPECIE FUNGINA	DERRATE CONTAMINATE
Aflatossine B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	<i>Aspergillus flavus</i>	Mais, grano, riso, sorgo, frutta secca (noci, nocciole, pistacchi, fichi).
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	
	<i>Aspergillus nomius</i>	
Aflatossine M ₁ ^a		Latte e prodotti lattiero caseari.
Fumonisine B ₁ , B ₂ , B ₃	<i>Fusarium verticillioides</i>	Mais, cereali e sottoprodotti dei cereali, sorgo e asparagi.
	<i>Fusarium proliferatum</i>	
Deossinivalenolo ^b	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali.
	<i>Fusarium culmorum</i>	
Tossina T-2 ^c	<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali.
	<i>Fusarium poae</i>	
Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali.
	<i>Fusarium culmorum</i>	
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	
Ocratossina A	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali, frutta, caffè, vino, birra, tessuti di maiale e pollame (sangue, fegato, rene, muscolo, uova) ^d .
	<i>Aspergillus niger</i>	
	<i>Penicillium verrucosum</i>	
	<i>Penicillium expansum</i>	
Patulina	<i>Aspergillus clavatus</i>	Mele e loro prodotti, succhi di frutta.
	<i>Byssochlamys nivae</i>	
Alcaloidi dell'ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali.
	<i>Claviceps africana</i>	
Tossine tremorgeniche (es: penitremi, lolitremi, roquefortina, etc.)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Cereali e sottoprodotti dei cereali, semi oleaginosi, frutta secca, foraggi.
	<i>Aspergillus flavus</i>	
	<i>Penicillium verrucosum</i>	

^a Metabolita dell'aflatossina B₁ escreto per via mammaria.

^b Il Deossinivalenolo appartiene al gruppo dei B tricoteceni ed è noto anche come vomitotossina.

^c La tossina T-2 appartiene al gruppo dei A tricoteceni.

^d Carry-over nei tessuti di animali alimentati con mangimi contaminati da ocratossina.

Una specie fungina viene definita “tossigena”, quando all’interno di tale specie esistono un certo numero di ceppi che, in determinate condizioni, sono in grado di attivare delle vie metaboliche secondarie che portano alla sintesi di micotossine. È bene ricordare infatti che non tutti i ceppi all’interno di una specie tossigena possiedono questa

capacità: si pensi ad esempio che *Aspergillus flavus* viene considerato non tossigeno in una proporzione attorno al 60 % (Derache R., 1988).

La percentuale di ceppi tossigeni all'interno di un'unica specie fungina dipende da svariati fattori quali la regione geografica e climatica di provenienza, il substrato di origine e le condizioni generali di sviluppo (Dragoni I. *et al.*, 1997).

Inoltre il potenziale tossigeno può variare notevolmente anche dal punto di vista quantitativo. In una ricerca condotta su 37 ceppi differenti di *Aspergillus versicolor*, che sono stati inoculati su mais umidificato a 27 °C per 13 giorni, le concentrazioni della sterigmatocistina rilevate variavano in un range da 0,4 a 1400 mg/kg (ppm o parti per milione). Dal momento in cui non sono state riscontrate differenze rilevanti nell'attività metabolica generale e nella velocità di crescita dei differenti ceppi, la variabilità riscontrata nelle concentrazioni di sterigmatocistina è da attribuire proprio alla notevole differenza di potenziale tossinogeno tra i diversi ceppi della stessa specie, (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

La formazione delle micotossine è raramente contemporanea alla fase di crescita del fungo, vengono infatti per lo più prodotte nella fase di biosintesi, ed in particolare quando nell'ambiente in cui crescono tendono a scarseggiare i nutrienti che forniscono azoto e fosforo (Bottarelli F., 1993). Un alimento può essere quindi contaminato da una specie fungina tossica senza che su di esso siano necessariamente presenti delle micotossine. Allo stesso tempo però, essendo queste molto più resistenti agli agenti esterni rispetto ai miceti, possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte e/o eliminazione del fungo. L'assenza di ceppi fungini negli alimenti non garantisce pertanto l'assenza anche di micotossine (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Come accennato in precedenza, le micotossine rappresentano i prodotti del cosiddetto metabolismo "secondario" (Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001).

Il metabolismo "secondario" differisce da quello "primario" per la specificità dei ceppi fungini implicati e per la natura dei metaboliti che si vengono a formare.

Il metabolismo "primario", uguale per tutte le specie fungine, consta di vie metaboliche che consentono la sintesi glucidica, lipidica e proteica. Il metabolismo "secondario" invece può essere specifico di una data specie, talora di un singolo ceppo fungino, e porta alla sintesi di composti specifici per ciascun tipo di fungo preso in considerazione (Wyllie T. D. e Morehouse L. G., 1977).

Il motivo per cui si suole definire queste vie metaboliche con l'aggettivo "secondario" è che i metaboliti prodotti non sembrano avere alcun ruolo apparente per lo sviluppo e la crescita dell'organismo che li produce. Sembra tuttavia che l'attivazione di queste vie metaboliche sia comunque necessaria per la sopravvivenza fungina. L'ipotesi più accreditata, interpreta il metabolismo "secondario" come una via metabolica alternativa, che si innesca quando la crescita fungina è temporaneamente limitata o impedita. Questo permetterebbe infatti di dirottare i normali intermedi metabolici, come ad esempio acetato, malonato e piruvato, impedendone l'accumulo (Deacon J. W., 1997). Nonostante questi metaboliti secondari non abbiano alcuna importanza biochimica nella crescita e sviluppo del fungo produttore, sono in grado di indurre potenti effetti biologici su animali ed uomo.

Si pensi ad esempio che numerosi antibiotici sono dei metaboliti secondari fungini. Per citarne uno tra tanti si può ricordare la penicillina, la cui scoperta ha letteralmente cambiato il corso della medicina (Bottarelli F., 1993).

Gli antibiotici, infatti, possono essere considerati come composti a tossicità selettiva verso i germi patogeni. Le micotossine tuttavia sono in grado di esplicare azione tossica anche su gli organismi superiori andando ad interagire con diversi organi e sistemi bersaglio.

Gli effetti tossici causati dalle micotossine sono molteplici e tali tossine possono essere classificate in base al principale organo bersaglio come epatotossine, nefrotossine, neurotossine, immunotossine e dermatotossine. Sulla base poi degli effetti cronici, le micotossine possono essere inoltre classificate come mutagene, cancerogene o teratogene (Steyn P.S., 1995).

Nel 1993 la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha valutato il potenziale cancerogeno di svariate micotossine, classificando le aflatossine B₁ e G₁ come agenti cancerogeni per l'uomo (gruppo 1), le fumonisine B₁, le ocratossine e le aflatossine M₁ come possibili agenti cancerogeni (gruppo 2B) e i tricoteceni e le zearalenone come non cancerogeni (gruppo 3) (IARC, 1993).

Tutte queste attività biologiche sono riconducibili ad interazioni che le micotossine, oppure i derivati e/o metaboliti delle micotossine, stabiliscono con DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici o costituenti di membrana.

Nella tabella seguente si trova una lista delle principali micotossine e degli effetti tossici che possono produrre su uomo ed animali (vedi Tabella 2).

Tabella 2: Micotossine e relative azioni tossiche (Krska R. e Crews C., 2008; Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001).

MICOTOSSINE	PRINCIPALI EFFETTI TOSSICI
Aflatossine	Effetto cancerogeno, mutageno e teratogeno. Spiccata azione epatotossica che porta spesso a cirrosi ed in ultimo stadio alla comparsa di un epatocarcinoma. Effetto immunodepressivo.
Fumonisine	Effetto cancerogeno e mutageno. Spiccata azione epatotossica.
Tricoteceni	Effetto citotossico particolarmente marcato per i tessuti a rapido accrescimento (midollo osseo, linfonodi timo ed intestino). Comparsa di irritazioni cutanee, vomito, diarrea, emorragie multiple ed immunodepressione.
Zearalenone	Effetto estrogenico e conseguente comparsa di sintomi da iperestrogenismo e disturbi della fertilità.
Ocratossine	Effetto cancerogeno, mutageno e teratogeno. Spiccata azione nefrotossica ed effetto immunodepressivo.
Patulina	Effetto citotossico. Azione irritante su tratto gastro intestinale e comparsa di nausea.
Alcaloidi dell'ergot	Effetto neurotossico. Nella forma "ischemica" si ha comparsa di una intensa sensazione di bruciore alla pelle, vasocostrizione periferica e possibili fenomeni gangrenosi alle estremità. Nella forma "convulsiva" si osservano allucinazioni, delirio, vertigini, crampi dolorosi, movimenti spastici degli arti.
Tossine tremorgeniche	Azione neurotossica con comparsa di tremori e fenomeni convulsivi.

Tra tutti i tipi di micotossine note, solo una ventina, tuttavia, si possono ritrovare con frequenza e livelli di contaminazione significativamente pericolosi sulle derrate alimentari (Anklam E. *et al.*, 2002).

E' necessario inoltre sottolineare, che il grado di tossicità nei confronti dell'uomo e degli animali è influenzato dalla concentrazione totale di micotossine assunte e dalle capacità metaboliche dell'organismo (Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001).

La principale via di assunzione delle micotossine è la via alimentare e la maggior parte delle micotossicosi è legata principalmente al consumo di piante e loro derivati precedentemente contaminati dal fungo produttore, così come pure di carni e derivati di animali alimentati con derrate contaminate (Huwig A. *et al.*, 2001). Nei prodotti di origine animale derivanti da animali alimentati con mangimi contaminati si può infatti

assistere al cosiddetto fenomeno di *carry-over* ossia il passaggio ed accumulo delle micotossine nei tessuti animali.

Più rare, ma non per questo meno pericolose, sono le possibilità di assunzione per via polmonare o cutanea (CAST, 2003). Quindi sebbene la maggior parte dei casi di intossicazione da micotossine siano riferibili all'ingestione di alimenti contaminati da micotossine, è bene sottolineare, che a seguito della manipolazione di materiali contaminati, si può avere la liberazione di polveri e aerosol molto pericolosi.

È infine opportuno ricordare che, se pure con un'incidenza decisamente minore, anche le analisi di laboratorio delle micotossine possono costituire una fonte di esposizione per l'uomo. Gli operatori di laboratorio che utilizzano o sono in contatto con tali sostanze devono quindi attenersi scrupolosamente alle norme di sicurezza (vedi paragrafo 3.5).

Le patologie causate dalle micotossine vengono genericamente indicate come micotossicosi e possono avere un decorso acuto oppure cronico. Le micotossicosi acute sono dovute all'assunzione di micotossine in dosi molto elevate e in tempi relativamente ridotti. Le forme a decorso cronico sono invece tipiche dei casi di esposizioni prolungate a basse dosi di micotossine (Fujimoto H., 2003).

Tutte le micotossicosi sono accomunate da una serie di elementi distintivi comuni:

- Non sono malattie trasmissibili;
- La tossicità è influenzata dall'età, dal sesso e dallo stato nutrizionale del soggetto;
- Le manifestazioni cliniche sono correlate spesso ad una particolare alimentazione o all'assunzione di certe sostanze;
- I disturbi hanno generalmente un andamento stagionale, in quanto la produzione di micotossine è influenzata dalle condizioni climatiche;
- Il trattamento con farmaci ed antibiotici è inefficace (Fujimoto H., 2003).

Alcune patologie umane, riconducibili all'assunzione di cibo contaminato da micotossine, sono: l'ergotismo causato dagli alcaloidi dell'ergot (diffuso soprattutto in Europa), l'aleuchia tossica alimentare (o ATA, comparsa in Russia all'inizio del novecento) causata dai tricoteceni, la "nefropatia balcanica" causata da ocratossina A, carcinomi epatici causati dalle aflatossine in molte zone dell'Africa e dell'Asia (Steyn P. S., 1995).

Anche negli animali, inoltre, esistono delle micotossicosi caratterizzate da sintomi patognomici: si ricordi ad esempio la sindrome genitale del suino indotta da zearalenone, la necrosi della coda indotta da tricoteceni e la leucoencefalomalacia equina (ELEM) causata da fumonisine.

La maggior parte delle micotossicosi, sia negli animali che nell'uomo, tuttavia non è contraddistinta da una sintomatologia specifica e si manifesta piuttosto con un'insieme di disordini e problemi patologici a carico di diversi organi ed apparati.

Inoltre è frequente la possibilità di trovare simultaneamente su un alimento contaminato due o più micotossine, per cui l'azione combinata tra questi differenti tipi di composti, rende difficile attribuire i sintomi osservati ad una singola tossina (Bottarelli F., 1993).

Dal punto di vista zootecnico i danni provati da queste forme "miste", che spesso presentano un andamento subclinico, sono ingenti e consistono in un calo delle produzioni, turbe della fertilità ed immunodepressione con conseguente maggior recettività a svariati tipi di malattie infettive o aggravamento del loro decorso.

1.1.1 Fattori influenti sullo sviluppo fungino e sulla sintesi delle micotossine

I più importanti fattori influenzanti la crescita di un certo ceppo e la sua capacità di sintetizzare micotossine possono essere divisi in FATTORI ESTRINSECI, costituiti dall'insieme delle condizioni che favoriscono lo sviluppo fungino e, dunque, l'eventuale produzione dei metaboliti fungini, ed in FATTORI INTRINSECI, legati invece al ceppo fungino.

Dei FATTORI INTRINSECI si è già sostanzialmente parlato in precedenza. In primis, si deve prendere in considerazione la specie fungina; all'interno di ciascuna specie tossigena si deve poi tenere conto del differente potenziale tossinogeno dei vari ceppi. Il potenziale tossinogeno può infatti variare in maniera consistente (variazioni da 1 a 10^3 o 10^4) tra un ceppo e l'altro (Pietri A., 1998). Anche il livello iniziale di contaminazione è in grado di influenzare notevolmente la quantità finale di micotossine prodotte. Esiste infatti, una stretta correlazione tra la gravità dell'infestazione fungina della pianta o della derrata alimentare e la quantità di micotossine che si può rinvenire sul prodotto alimentare (Pietri A., 1998).

I principali **FATTORI ESTRINSECI** in grado di influenzare la capacità di crescita di un ceppo fungino e la capacità di produrre micotossine sono:

- **L'umidità ambientale;**
- **L'acqua libera (a_w);**
- **La temperatura;**
- **La concentrazione di ossigeno;**
- **Il pH;**
- **La natura del substrato.**

L'umidità ambientale e il tenore di acqua degli alimenti sono due tra i fattori più influenti sui livelli finali di contaminazione da micotossine. **L'acqua libera** (o attività dell'acqua o a_w) rappresenta la quota di acqua libera, utilizzabile per la crescita fungina, rispetto all'umidità totale.

A valori bassi di a_w , come 0,25-0,30, i legami tra l'acqua ed il substrato organico sono molto forti; all'aumentare del valore di a_w , i legami divengono meno tenaci e cresce quindi il grado di disponibilità dell'acqua (Dragoni I. *et al.*, 1997).

La contaminazione da parte dei funghi è più frequente di quella batterica a livelli di a_w minori di 0,85: questo perché i batteri sono fortemente competitivi e man mano che i valori di a_w si avvicinano ad 1,00 diventano la microflora predominante. Solo alcuni batteri, tra i quali cocchi e batteri lattici, riescono a crescere velocemente a livelli di a_w tra 0,85 e 0,90, pertanto in queste condizioni l'invasione delle muffe e dei lieviti prende il sopravvento (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

La relazione tra l'umidità totale e l'acqua libera non è lineare e per questo motivo l'umidità, da non superare per garantire una buona conservazione (corrispondente ad un valore di a_w di 0,65 circa), è diversa a seconda del tipo di alimento considerato. Per esempio, ad una temperatura di 25 °C, per evitare contaminazioni fungine l'umidità non deve superare il 13-13,5 % nei cereali e il 7-8 % nei semi oleosi (Amodeo P., 2001).

I livelli di a_w necessari per avere tossinogenesi sono generalmente superiori a quelli necessari per la crescita fungina, avvicinandosi sempre a 0,90. Anche sotto questo aspetto, comunque, tra le varie specie c'è una certa variabilità: ad esempio *Aspergillus flavus* può sintetizzare aflatossine già a 0,83, mentre *Aspergillus ochraceus* produce ocratossine soltanto con un livello di a_w non inferiore a 0,97.

Vista la notevole influenza dell'umidità del substrato sulla possibilità di contaminazione dell'alimento, il controllo e monitoraggio di tale fattore, risulta indispensabile nelle aziende mangimistiche e nelle industrie agro-alimentari, al fine di tenere sotto controllo le contaminazioni da micotossine (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

La **temperatura** ideale per lo sviluppo di una muffa è generalmente compresa tra 15 e 30 °C, con un optimum di 20-25 °C. Alcune specie, però, nelle loro forme di sopravvivenza sono in grado di resistere anche a temperature molto rigide: per esempio, alcune spore di *Penicillium* sono state rinvenute su pesce congelato a -20 °C (Dragoni I. *et al.*, 1997).

Solitamente le temperature ottimali di crescita fungina e di sintesi delle micotossine coincidono, ma in alcune specie si rileva un gap tra i due valori. Un esempio di questo è dato da *Aspergillus flavus*, il cui optimum di crescita è 36-38 °C, mentre la produzione di tossine avviene tra i 20 e i 30 °C (Battilani P., 2004). Ancora più marcato è il divario tra la temperatura di sviluppo di *Fusarium roseum*, circa 25 °C, e quella di sintesi dello zearalenone, che si attesta sui 12-15 °C.

Infine vi sono funghi in grado di elaborare tossine diverse a seconda della temperatura: è il caso di *Aspergillus ochraceus*, che intorno ai 25 °C produce ocratossina, mentre a temperature attorno ai 20 °C sintetizza soprattutto acido penicillico (Derache R., 1988).

Le condizioni atmosferiche ed ambientali influiscono quindi, in maniera decisiva, sul tipo di contaminazione che si può trovare su una derrata alimentare. Con condizioni atmosferiche piovose e di elevata umidità, in prossimità della raccolta, si ha prevalenza di contaminazione da zearalenone e tricoteceni, a causa del maggior sviluppo di funghi del genere *Fusarium*, mentre con un clima particolarmente caldo e secco predominano i funghi produttori di fumonisine, accompagnati da una diffusa contaminazione di aflatossine (Bartolini R., 2002).

Le muffe sono generalmente degli organismi aerobi che si sviluppano sulla superficie dei substrati in presenza di un'alta **concentrazione di ossigeno**. In linea di massima un aumento del tenore di anidride carbonica ambientale tende quindi a limitare o impedire la proliferazione delle muffe (Derache R., 1988). Esistono tuttavia delle specie in grado di svilupparsi più in profondità nell'alimento e quindi in presenza di scarse concentrazioni di ossigeno (ad esempio specie appartenenti al genere *Stachyobotrys*) (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Altri miceti possono poi adattarsi a crescere in ambiente anaerobio e ricco di anidride carbonica, purché sussistano le altre condizioni ideali di crescita: è il caso di *Byssochloromyces niveus*, *Paecilomyces varioti* e *Aspergillus clavatus*, tre specie produttrici di patulina.

Anche il **pH** del substrato è in grado di influenzare la crescita fungina. Lo sviluppo del micelio avviene generalmente a pH compresi tra 4 e 8, ma vi sono anche specie che, modificando l'acidità del mezzo secondo le loro necessità, possono crescere in condizioni di acidità differenti (Dragoni I. *et al.*, 1997).

Se sussistono tutte le condizioni ambientali sopra descritte, lo sviluppo e crescita del micelio vengono scarsamente influenzati dalla **natura del substrato**. Per contro, la natura del substrato sembra essere il fattore che più di tutti influenza la tossinogenesi (Dragoni I. *et al.*, 1997).

La produzione di micotossine è favorita in maniera particolare dalla disponibilità di amido e per questa ragione avviene più frequentemente su substrati di origine vegetale piuttosto che su quelli di origine animale (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Tra gli alimenti più frequentemente contaminati da micotossine, vanno menzionati i cereali (mais, grano, riso, avena, segale, sorgo), i semi oleaginosi (arachidi, girasole), alcune spezie (paprica, curcuma, peperoncino, mostarda, pepe di Cayenna, noce moscata, zenzero), la frutta secca (mandorle, fichi secchi, noci, nocciole), la frutta fresca (uva, mele, pere) e i succhi di frutta (Amodeo P., 2002; Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Lo sviluppo e la crescita di funghi tossigeni e la produzione di micotossine può avvenire durante tutte le fasi di produzione o trasformazione di un prodotto alimentare: direttamente in campo sulle piante, durante le fasi di raccolta e stoccaggio, oppure nel corso di trasformazioni tecnologiche e preparazioni alimentari (Pietri A., 2001).

In generale, le piante sono resistenti alle infezioni fungine, ma qualsiasi condizione in grado di apportare loro uno stress le rende particolarmente suscettibili ed attaccabili già nella fase di coltivazione in campo. Forti escursioni termiche durante le fasi di maturazione della pianta, infestazioni da insetti, eccessivo o sregolato uso di pesticidi, sistemi di irrigazione non idonei o forti precipitazioni poco prima della raccolta sono tutte situazioni stressanti che favoriscono lo sviluppo fungino e la sintesi di micotossine (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Numerosi studi sono stati condotti allo scopo di selezionare e sviluppare varietà di cereali naturalmente resistenti all'attacco di funghi produttori di micotossine. Allo stato attuale le ricerche per la selezione di ibridi resistenti non hanno ancora portato a risultati di immediata utilizzazione, mentre le nuove tecniche di ingegneria genetica rappresentano il sistema più promettente per la creazione di nuove varietà resistenti. La varietà di mais transgenico (*Bt* mais) che contiene geni isolati da *Bacillus thuringensis* (responsabili della codifica di proteine tossiche per alcuni insetti), produce raccolti a minor contenuto di fumonisine in virtù di una maggior resistenza della pianta agli attacchi di piralide (Visconti A. e Avantaggiato G., 2002).

Recentemente sono stati scoperti due ceppi di lieviti ed uno di batteri, in grado di accrescersi utilizzando la fumonisina B₁, che viene quindi degradata completamente fino alla formazione di CO₂. Gli enzimi responsabili di tale degradazione sono stati isolati e si stanno compiendo delle ricerche per consentire l'espressione dei corrispondenti geni in piante transgeniche (Jouany J. P., 2007).

Durante le fasi successive alla crescita in campo (fasi di raccolta, conservazione e trasformazione), non sono tanto le caratteristiche chimiche del substrato a condizionare la possibilità di crescita fungina, quanto piuttosto lo stato fisico dell'alimento.

Qualsiasi lesione presente sul seme costituisce infatti, una via di ingresso preferenziale per i funghi responsabili della produzione di micotossine (Bartolini R., 2002).

Operazioni di raccolta condotte in maniera scorretta, come una trebbiatura effettuata su granella troppo secca (i valori di umidità ideali al momento della raccolta sono attorno al 20-25 %) o l'utilizzo di una mietitrebbia non correttamente regolata, possono apportare danni fisici alle sementi.

Anche l'azione di grandine, insetti, uccelli e roditori può determinare danneggiamento del rivestimento esterno e rottura dei semi, rendendoli più facilmente intaccabili dalle muffe.

Si è visto che l'incidenza di infezione da parte di alcune specie micotossigene (come *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Fusarium verticilloides*) è significativamente più elevata nelle cariossidi danneggiate da insetti rispetto a quelle sane (Visconti A. e Avantaggiato G., 2002).

Durante le fasi di immagazzinamento e conservazione, il controllo dei parametri che regolano la crescita fungina, quali la temperatura, l'umidità relativa della derrata e le

tensioni di CO₂ e di O₂, sono di primaria importanza per poter contenere il rischio di contaminazioni da micotossine (Mari R., 1997).

Come già detto in precedenza, anche i prodotti di origine animale rappresentano delle possibili fonti di esposizione alle micotossine. Infatti gli animali da reddito che assumono mangimi o foraggi contaminati, metabolizzano e successivamente accumulano nei loro tessuti le micotossine (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Per quanto riguarda i prodotti carnei, il rischio di micotossinogenesi viene mantenuto molto basso grazie all'applicazione di basse temperature durante tutte le fasi di lavorazione e conservazione del prodotto. Fa eccezione l'ocratossina A che si ritrova frequentemente nel sangue e nelle carni fresche e conservate di maiale (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Anche le uova possono, seppur raramente, essere contaminate da micotossine. Tale contaminazione deriva dalla metabolizzazione di tossine che le ovaiole assumono tramite la dieta. Per le aflatossine, ad esempio, è stato calcolato un fattore di conversione di 2200: cioè sono necessari 2200 µg/kg (ppb o parti per bilione) di aflatossine per ritrovare nelle uova deposte 1 µg/kg (Haouet M. N. e Altissimi M. S., 2003).

Tra tutti i prodotti di origine animale, il latte è probabilmente il più pericoloso per quel che riguarda il rischio umano di assunzione di micotossine. Ad esempio, nel latte prodotto da vacche, alimentate con mangimi altamente contaminati da aflatossine, si riscontra la presenza dei metaboliti idrossilati delle aflatossine B₁ e B₂, denominati M₁ e M₂ (Chiavaro E. *et al.*, 2001). Questi metaboliti si concentrano per un 80 % nel latte scremato, in virtù del loro legame con la frazione proteica (specialmente la caseina), e per questo motivo si possono rinvenire anche nei derivati lattiero-caseari (Govaris A. *et al.*, 2001).

La presenza di tossine nei formaggi (non solo aflatossine, ma anche, ad esempio, ocratossine prodotte da *Aspergillus ochraceus*) può derivare, oltre che dalla contaminazione del latte conseguente ad un *carry-over* di tossine introdotte dal ruminante con la dieta, anche dalla crescita dei miceti direttamente sulla superficie del prodotto.

Così come per la carne, comunque, una attenta conservazione dei formaggi alle giuste temperature (inferiori ai 10 °C) e in confezioni con atmosfera modificata limita notevolmente la possibilità di contaminazioni elevate (Cousin M. A., 2003).

1.1.2 La legislazione sulle micotossine

Da quanto detto finora si comprende come la contaminazione da micotossine rappresenti attualmente una delle principali problematiche nella gestione della sicurezza igienico-sanitaria delle materie prime, dei prodotti della filiera cerealicola, nonché dei prodotti di origine animale.

L'impatto sulla salute umana ed animale, accertato e dimostrato da numerose ricerche sul tema, ha spinto diversi Paesi a stabilire tenori massimi di accettabilità per la presenza delle principali micotossine nei mangimi e nelle derrate alimentari (Corticelli C., 2004). Per questa ragione, le legislazioni sia locali che nazionali si sono arricchite negli ultimi anni di numerosi provvedimenti, continuamente aggiornati, allo scopo di regolamentare il problema micotossine.

Il primo provvedimento legislativo riguardante le micotossine risale al 1965, quando la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti d'America stabilì una soglia di tolleranza nei confronti di tutte le aflatossine (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) pari a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb o parti per bilione). Soltanto quattro anni più tardi, tale limite venne abbassato a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, in risposta all'elevato potere tossico riscontrato in queste sostanze. Negli anni successivi, tale soglia di tolleranza fu ulteriormente rivista, grazie anche al supporto di tecniche analitiche sempre più precise e con limiti di rilevazione sempre più bassi (Rustom I. Y. S., 1997).

Nel 2003 erano ben 100 le nazioni che stabilivano dei limiti di legge sia negli alimenti zootecnici che negli alimenti destinati al consumo umano (FAO, 2003).

Osservando la situazione ai giorni nostri, si nota come, a seconda della nazione o organizzazione che li abbia fissati, i massimi livelli di micotossine tollerati presentino notevoli differenze. Nei paesi in via di sviluppo a clima caldo ed umido, ove la contaminazione dei prodotti agricoli è tendenzialmente molto elevata, i limiti stabiliti (quando esistono) sono molto meno restrittivi di quelli in vigore nei paesi industrializzati delle zone temperate-fredde. Ne è un esempio il fatto che, per quanto riguarda i cereali destinati a consumo umano diretto, in Europa la soglia massima consentita per la somma delle aflatossine $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ è 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Regolamento CE n. 1881/2006), mentre in Brasile è 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Risoluzione dell'ANVISA RDC n. 274, 2002).

Questa discrepanza tra le legislazioni delle diverse nazioni costituisce un grande problema nel commercio internazionale, in particolare per i paesi in via di sviluppo, nei

quali l'esportazione di certi prodotti agricoli è di primaria importanza, ma che spesso subiscono gravi danni economici, conseguenti al blocco delle importazioni da parte dei paesi consumatori di tali prodotti.

Numerosi sforzi si stanno attualmente compiendo per armonizzare le varie legislazioni vigenti al mondo. È necessario però tener conto, come sottolineato dalla FAO e WHO, che nei paesi in via di sviluppo è molto più grave il danno causato dalla denutrizione piuttosto che l'incidenza delle patologie conseguenti alla contaminazione di micotossine e non ha senso imporre, in queste aree, dei limiti che comporterebbero lo scarto delle già esigue risorse alimentari (Rustom I. Y. S., 1997).

Le organizzazioni internazionali hanno promosso, e continuano a promuovere, studi e programmi di ricerca tossicologici ed epidemiologici, al fine di ottenere risultati sul rischio per la salute dell'uomo e degli animali. Poter disporre di dati aggiornati consente infatti di rivedere le concentrazioni massime ammissibili della normativa vigente e di porre le basi per la discussione sulle regolamentazioni da fare *ex novo*.

Numerosi sono i fattori che possono influenzare la creazione di limiti di legge per le micotossine (disponibilità di dati sulla presenza di micotossine nelle varie derrate alimentari e sulla distribuzione all'interno di un lotto, disponibilità di metodi analitici, legislazione nei Paesi con cui esistono scambi commerciali, necessità legate all'approvvigionamento di un particolare alimento), ma le normative tengono conto *in primis* dei dati tossicologici. La valutazione dei rischi per le micotossine, attualmente considerate più significative, è stata fatta dal Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), corpo consultivo scientifico della FAO e del WHO. La valutazione dei dati tossicologici generalmente risulta nella stima di un TDI (Tolerable Daily Intake). Talora si parla di Provisional TDI (PTDI) quando si vuole sottolineare la provvisorietà del dato e la necessità di effettuare ulteriori ricerche.

Per le micotossine cancerogene non si stabilisce un TDI ma si raccomanda di ridurre la contaminazione secondo il criterio ALARA (As Low As Reasonably Achievable). Il livello ALARA è definito come la concentrazione di una sostanza che non può essere eliminata da un alimento, senza richiedere lo scarto dell'alimento nel complesso o senza compromettere seriamente la disponibilità delle maggiori domande di alimento (FAO, 2003).

Nella tabella successiva si trovano i risultati delle valutazioni tossicologiche effettuate dall'JFECA per le principali micotossine (vedi Tabella 3).

Tabella 3: Valutazioni tossicologiche delle principali micotossine.

<i>MICOTOSSINA</i>	<i>TDI provvisori o definitivi ($\mu\text{g}/\text{kg b.w.}$)</i>
Aflatossina B ₁	ALARA
Ocratossina A	0,005
Patulina	0,4
Deossinivalenolo	1
Fumonisine	2
Zearalenone	0,2
Tossina T2 – HT2	0,06

b.w. = body weight (peso corporeo)

Per quanto riguarda la legislazione vigente nella Comunità Europea, il problema micotossine è stato affrontato ripetutamente ed in maniera sempre più dettagliata nel corso degli anni. Il Regolamento CE n. 1525/1998 nato dalla presa di coscienza a livello europeo delle disparità esistenti fra i regimi giuridici degli Stati membri e dei problemi economici derivanti, ha istituito una linea di condotta comunitaria, al fine di garantire l'esistenza di un mercato unico (Amodeo P., 2001).

Con questo provvedimento vennero per la prima volta fissati i massimi tenori per alcuni contaminanti, tra cui le aflatossine, tollerati su svariati prodotti al momento dell'immissione in commercio (Regolamento CE n. 1525/1998).

Con Regolamenti successivi, queste misure hanno subito rettifiche ed aggiornamenti, relativi anche ai metodi di campionamento ed analisi (vedi Regolamenti CE n. 466/2001, CE n. 472/2002, CE n. 2174/2003 e CE n. 401/2006); inoltre sono state introdotte limitazioni anche per ocratossina A (Regolamento CE n. 123/2005) e patulina (Regolamento CE n. 1425/2003). Nel 2004, con il Regolamento CE n. 683/2004, sono stati invece fissati i limiti di alcune micotossine negli alimenti per l'infanzia e negli alimenti dietetici a fini medicinali speciali.

Infine, a partire dall'1 marzo 2007 è stato applicato il Regolamento CE n. 1881/2006, che integra, e in parte sostituisce, i precedenti provvedimenti, ridefinendo i tenori massimi di alcuni contaminanti anche in base a quanto stabilito dal Codex Alimentarius. Nello scenario economico dell'Unione Europea, il settore zootecnico ricopre un ruolo di primaria importanza e il raggiungimento di risultati soddisfacenti per la salute umana, per il benessere animale, per l'ambiente e per l'efficienza di tale settore, dipende dall'utilizzo di mangimi di buona qualità. Per questa ragione il problema degli agenti contaminanti (comprese, ovviamente, le micotossine) è stato affrontato anche per

quanto riguarda i prodotti destinati all'alimentazione animale, e la relativa normativa è descritta nel Regolamento CE n. 178/2002, nella Direttiva 2003/100/CE e nel più recente Regolamento CE n. 183/2005.

1.1.3 Prevenzione della contaminazione e trattamento degli alimenti contaminati

La definizione dei limiti di legge, insieme allo sviluppo di piani di monitoraggio e campionamento, è senza ombra di dubbio estremamente importante ai fini del controllo del rischio da contaminazioni di micotossine sulle derrate alimentari. Per poter ottenere una significativa riduzione dei danni causati dalle micotossine è necessario tuttavia che, a queste misure, si aggiungano un profondo coinvolgimento nella gestione del rischio da parte di tutti gli operatori della filiera, nonché l'adozione di ulteriori misure preventive (Corticelli C. e D'Imperio R., 2004).

Le misure preventive in grado di ridurre e controllare le contaminazioni in campo comprendono tutte quelle tecniche di coltivazione, che applicate correttamente limitano o riducono il più possibile lo stress per la pianta. Nella pratica, questo si traduce in una adeguata preparazione del terreno alla semina, una corretta gestione delle irrigazioni (sia carenza che eccesso idrico possono favorire lo sviluppo fungino) e della concimazioni (sono importanti un giusto apporto di azoto e un buon bilancio sodio/potassio), nell'applicazione di trattamenti anti-parassitari nella fase di post-fioritura delle piante e nell'impiego delle rotazioni colturali (Jouany J. P., 2007).

Per quanto riguarda la fase di raccolta, invece, è di basilare importanza effettuarla non appena la pianta sia giunta ad un giusto grado di maturazione ed umidità, cercando quindi di evitarne la post-maturazione. E' bene, inoltre, curarsi che i macchinari impiegati non creino rotture o fessurazioni sul tegumento dei cereali (Amodeo P., 2002).

Durante la fase di stoccaggio, infine, è fondamentale controllare l'umidità del prodotto, che deve essere omogenea e quanto più rapidamente possibile portata a livelli inferiori al 14 % per i cereali e al 7-8 % per i semi oleaginosi. Importante è anche mantenere un buon stato di pulizia nei locali e silos in cui vengono stoccate le materie prime (Pietri A. *et al.*, 2004).

In considerazione della elevata resistenza delle micotossine ai più comuni trattamenti di preparazione, trasformazione e conservazione dei prodotti alimentari, gli interventi più efficaci contro la loro formazione e diffusione sono proprio queste misure preventive di cui sopra.

Tuttavia, non sempre è possibile applicare al meglio queste tecniche preventive, poiché la contaminazione in campo dipende anche da fattori non controllabili ed imprevedibili, come ad esempio, le condizioni climatico-ambientali. Dal momento in cui, ci si trova di fronte ad un substrato contaminato, è possibile ricorrere ad una serie di accorgimenti, per decontaminare e/o detossificare l'alimento. Tali accorgimenti hanno come obiettivo, l'allontanamento delle parti contaminate (decontaminazione) e/o la distruzione e inattivazione *in situ* delle micotossine (detossificazione). A seconda della natura del processo responsabile della sanificazione del prodotto alimentare, i metodi di decontaminazione e/o detossificazione possono essere classificati in chimici, fisici o biologici (Castells M. *et al.*, 2005).

Tra i trattamenti chimici, vanno menzionati il trattamento con ammoniaca, idrossido di calcio, aldeide formica ed etere metilico. È necessario tener presente che, in linea generale, questi processi comportano però la formazione di residui tossici e l'alterazione delle qualità nutrizionali e sensoriali dell'alimento (Rustom I. Y. S., 1997).

Le normali operazioni di pulitura, vagliatura e cernita delle granaglie, agiscono come metodi di decontaminazione fisica portando alla separazione ed allontanamento delle parti contaminate. Grazie a queste operazioni è possibile raggiungere valori consistenti di abbattimento del contenuto di micotossine (Pavesi M. *et al.*, 2004).

Anche la molitura può essere considerata come un metodo di decontaminazione fisica delle derrate. La macinazione ad umido, usata principalmente nella lavorazione del mais, porta ad un accumulo delle micotossine idrosolubili nell'acqua di macerazione, con produzione di amido a bassi livelli di contaminazione (Bullerman L. B. e Bianchini A., 2007). Con la macinazione a secco si assiste, invece, ad una redistribuzione delle micotossine nelle diverse frazioni della molitura: ad esempio dopo macinazione a secco del mais i livelli più alti di fumonisine si registrano a livello di crusca e spezzature simili, quelli di aflatossine a livello di germe e pula (Jouany J. P., 2007)

I principali trattamenti di detossificazione fisica sfruttano invece le capacità inattivanti del calore, sia secco che umido, e l'azione di alcuni tipi di radiazioni (UV, gamma, solari).

Alcuni esempi di trattamenti che sfruttano il potere del calore sono: la cottura, l'autoclavaggio, la tostatura, la nixtamalizzazione (cottura in presenza di alcali) ed infine la cottura-estrusione (Castells M. *et al.*, 2005).

Sebbene numerose micotossine siano estremamente resistenti all'inattivazione termica (aflatossine, fumonisine, zearalenolo e deossinivalenolo sono i composti più termostabili) l'estrusione sembra avere un potere detossificante più o meno intenso a seconda dei parametri di temperatura, umidità e pressione impiegati.

I dati riportati in letteratura al proposito sono tuttavia discordanti. Secondo alcuni autori nei prodotti estrusi (vedi Figura 2) si può arrivare, infatti, a registrare una riduzione della contaminazione da micotossine anche del 100 % rispetto ai valori iniziali (Castells M. *et al.*, 2005; Jouany J. P., 2007). Altri autori sottolineano, invece, come la capacità di detossificazione di tale processo sia fortemente influenzata da parametri quali la temperatura finale del processo, l'eventuale presenza di zuccheri, l'umidità dell'impasto, la velocità di progressione delle coclee, ecc... (Scudamore K. A. *et al.*, 2008). In particolari condizioni l'estrusione comporta, quindi, riduzioni della contaminazione decisamente più modeste, attorno al 10 % (Voss K. A. *et al.*, 2008).



Figura 2: *Alimenti per animali preparati con cottura-estrusione*

Tra i metodi di detossificazione delle derrate, ed in particolar modo quelle destinate al consumo animale, l'aggiunta di adsorbenti (alluminosilicati di sodio e di calcio, zeoliti, carboni attivi, bentonite, argille) rappresenta attualmente il metodo più efficace per ridurre i rischi da intossicazione da micotossine e per prevenire il fenomeno del *carry-over*, ossia il trasferimento di tali tossine nei prodotti di origine animale (latte, carne e uova). Gli adsorbenti sono materiali inerti dal punto di vista nutrizionale, capaci di

legarsi stabilmente alle micotossine, riducendone quindi l'assorbimento a livello gastrointestinale (Visconti A. e Avvantaggio G., 2002).

Un approccio alternativo ai sistemi convenzionali di inattivazione delle micotossine, ancora al suo esordio, è rappresentato dalla detossificazione biologica. Tale detossificazione prevede la degradazione o trasformazione enzimatica delle micotossine ad opera di specifici agenti biologici (batteri, muffe, lieviti, piante o loro metaboliti). Ad esempio *Flavobacterium aurantiacum* è in grado di detossificare prodotti contaminati con aflatossine, in virtù della sua capacità di convertire l'aflatossina AFB₁, in un metabolita meno tossico, l'aflatossina AFB_{2a} (Rustom I. Y. S., 1997).

Un ulteriore esempio di detossificazione biologica è l'aggiunta di batteri produttori di acido lattico e acido propionico agli insilati. Tali microrganismi vengono già utilizzati come additivi per migliorare il processo di maturazione in silos e per inibire la proliferazione di micro-organismi potenzialmente dannosi, e grazie alle loro capacità fermentative possono inoltre risultare utili nei processi di detossificazione da micotossine (Niderkorn V. *et al.*, 2006).

In un recente studio è emerso che i batteri lattici, in particolar modo, danno ottimi risultati nella rimozione delle micotossine. L'attività detossificante varia però in funzione della micotossina presa in esame: più in dettaglio si è registrata una diminuzione del 100 % per fumonisina B₂, dell'82 % per fumonisina B₁ e del 55 % per deossinivalenolo (Niderkorn V. *et al.*, 2006).

In conclusione, sebbene esistano alcuni trattamenti in grado di ridurre i livelli di alcune micotossine, allo stato attuale, non si dispone di un metodo efficace e sicuro che porti ad una completa decontaminazione e/o detossificazione degli alimenti e dei mangimi da tutti i tipi di micotossine esistenti. Le misure di prevenzione in pre-raccolta costituiscono, quindi, la miglior strategia per poter ottenere prodotti alimentari sicuri o con livelli di micotossine che non costituiscano un rischio per la salute umana ed animale. Tuttavia, non sono ancora ben noti tutti gli effetti e le conseguenze dei trattamenti detossificanti. Ulteriori studi sono quindi necessari per comprendere il reale destino delle micotossine durante queste fasi e la reale sicurezza dei prodotti alimentari trattati (Visconti A. *et al.*, 2000).

1.2 LE FUMONISINE

Le fumonisine sono un gruppo di micotossine prodotte dai funghi *Fusarium verticillioides* (conosciuto anche come *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum*, e in piccola parte anche da altre specie di *Fusarium* (vedi Figura 3).

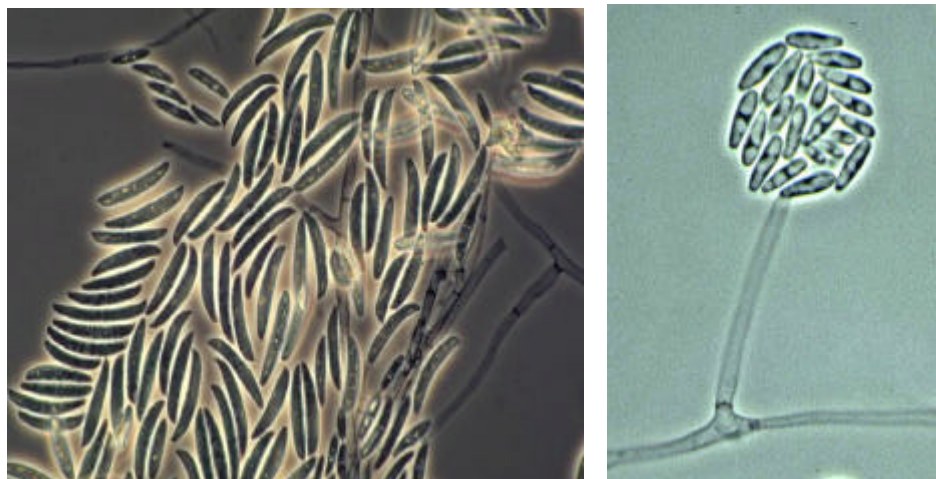


Figura 3: Funghi genere Fusarium sp. al microscopio ottico.

I funghi del genere *Fusarium* sono in grado di sintetizzare una grande varietà di micotossine che vengono genericamente definite con il termine fusariotossine: tra queste si possono ricordare lo zearalenone (ZON), le fumonisine (FB) e i vari tricoteceni, come deossinivalenolo (DON), nivalenolo (NIV) e tossine T-2 e HT-2.

Questi miceti sono presenti in tutto il mondo, in particolar modo nelle regioni temperate, e si sviluppano principalmente nel mais e negli alimenti destinati agli animali a base di mais (Voss K. A. *et al.*, 2007).

La contaminazione della granella di mais da parte di questo genere di funghi è spesso evidenziata da un caratteristico aspetto a “stella esplosa”, per cui appaiono delle striature biancastre sui chicchi (vedi Figura 4).

Occorre tuttavia ricordare che, l’assenza di segni di sviluppo e crescita fungina su un alimento, non costituisce una garanzia di mancata contaminazione da micotossine (Munkvold G. P. e Desjardins A. E., 1997).



Figura 4: Caratteristico aspetto a “stella esplosa” dei chicchi di mais contaminati da funghi del genere *Fusarium* sp.

Le fumonisine furono isolate per la prima volta nel 1988 da una coltura di *Fusarium verticillioides* cresciuta su mais, e successivamente ne fu determinata la struttura chimica. Da allora sono stati scoperti più di 28 omologhi, ed è probabile che ne vengano identificati altri ancora.

Tra questi, la FB₁ (diestere di propano-1,2,3-acido tricarbossilico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentaidrossieicosano) è la più comune e la più pericolosa da un punto di vista tossicologico; FB₂, FB₃ e FB₄ sono rispettivamente meno diffuse, e differiscono da FB₁ per numero e posizione dei gruppi ossidrilici legati allo scheletro idrocarburico della molecola (vedi Figura 5) (Voss K. A. *et al.*, 2007).

La FB₁ rappresenta generalmente il 70-80 % delle fumonisine prodotte sui cereali, mentre FB₂ è presente in una percentuale del 15-25 % e FB₃ del 3-8 % (Fodor J. *et al.*, 2006).

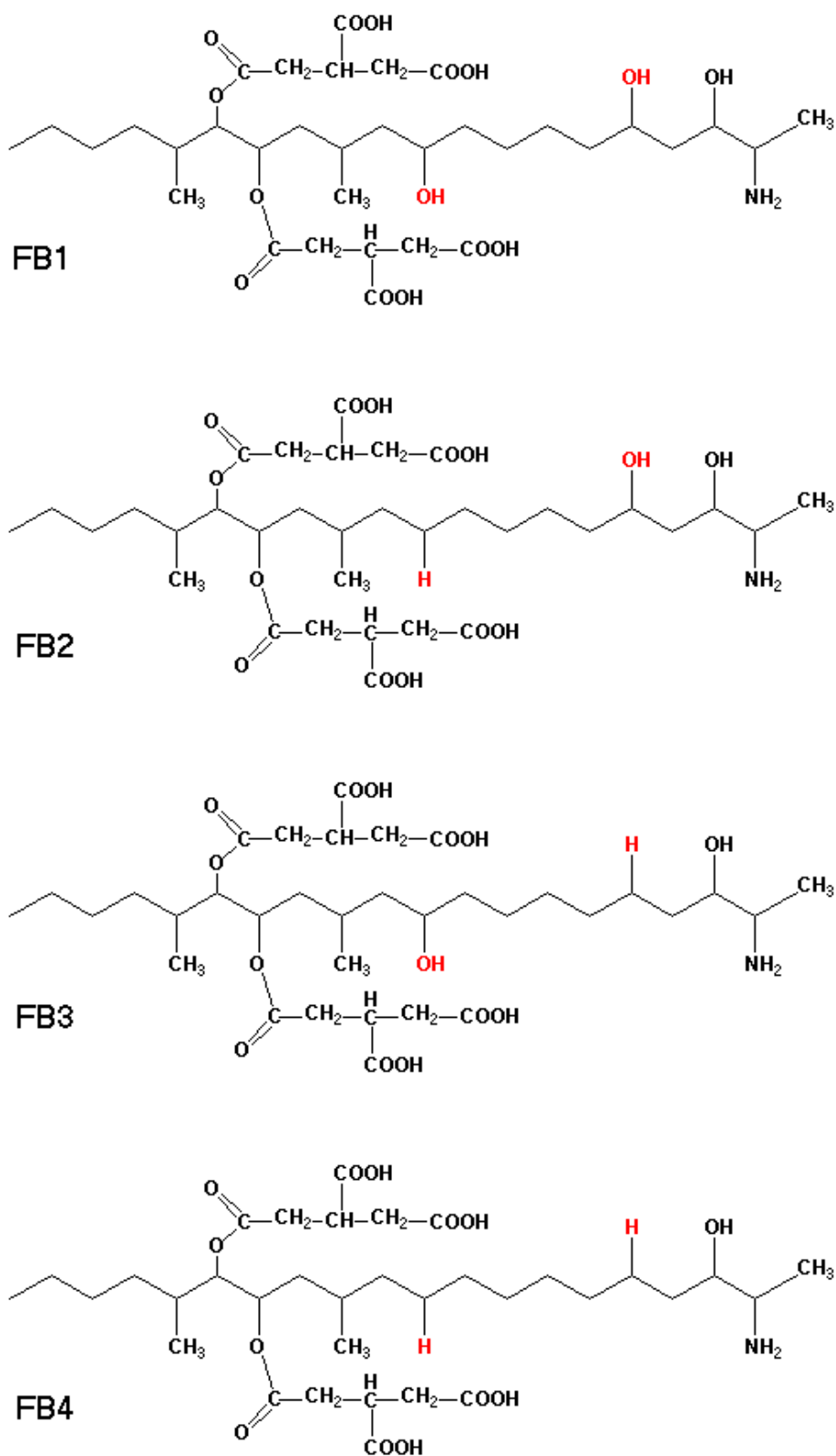


Figura 5: Strutture chimiche delle fumonisine B₁, B₂, B₃ e B₄.

Alla lunga catena idrocarburica che caratterizza le fumonisine sono legati in posizione 14 e 15, tramite legame estereo, due acidi tricarbossilici (TCA); i numerosi gruppi idrofili presenti conferiscono a questi composti una notevole polarità.

Tra i principali metaboliti delle fumonisine vanno ricordati l'aminopentolo (AP) e l'aminotetrolo (AT) che derivano rispettivamente dalla fumonisina B₁ e della fumonisina B₂ per idrolisi dei due legami esterei (vedi Figura 6) (Shier W. T., 1992; Thakur R. A. e Smith J. S., 1996; Fodor J. *et al.*, 2008a).

Un secondo gruppo, appartenente alle fumonisine, è quello rappresentato dalle fumonisine C (FC), costituito dalla FC₁, FC₂, FC₃ e FC₄, che differiscono dalle fumonisine B per la mancanza del gruppo metile in posizione C1.

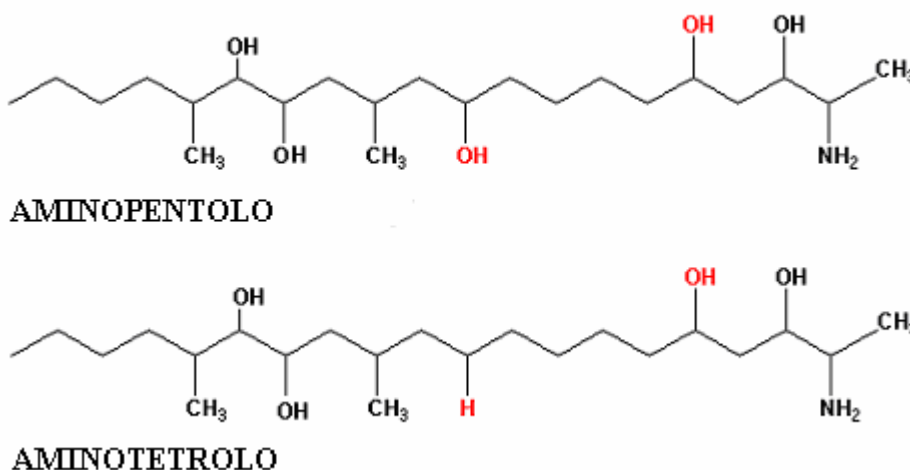


Figura 6: Struttura chimica dell'aminopentolo e dell'aminotetrolo.

Le fumonisine sono contaminanti naturali del mais (e dei prodotti da esso derivati) e rappresentano un problema per la sicurezza delle derrate alimentari in molte parti del mondo, tra cui Nord America, Sud Africa e vari Paesi Europei, inclusa L'Italia (SCF, 2000).

Sebbene riescano a crescere ad un range di temperature piuttosto ampio, i funghi del genere *Fusarium* necessitano di valori di attività dell'acqua piuttosto alti ($a_w > 0,9$) per proliferare: per questa ragione, le tossine vengono prodotte sul mais prima del raccolto o immediatamente dopo, durante le prime fasi di immagazzinamento. Eccetto condizioni particolari, la presenza di fumonisine tende a non aumentare durante lo stoccaggio (EFSA, 2005).

In virtù della loro polarità, e quindi solubilità in acqua, è possibile ridurre la concentrazione di fumonisine nel processo di macinazione a umido, ottenendo dell'amido a bassa contaminazione (SCF, 2000).

E' stato inoltre appurato, che le fumonisine sono abbastanza resistenti al calore, è possibile tuttavia ottenere un certa diminuzione della contaminazione, attraverso procedimenti di trasformazione, nei quali si utilizzano valori di temperatura superiori a 150 °C (come durante certi procedimenti di cottura-estrusione), oppure tramite nixtamalizzazione e ammonizzazione (Castells M. *et al.*, 2005; EFSA, 2005).

Questi ultimi due processi sono in grado di convertire la fumonisina B₁, a seconda che l'idrolisi sia parziale o totale, in FB₁ idrolizzata ed aminopentolo rispettivamente (WHO, 2000). Se da un lato questi trattamenti riducono il contenuto di fumonisina, è anche vero però, che poco è noto, circa la tossicità dei prodotti di idrolisi, e i dati presenti in letteratura a riguardo sono spesso contrastanti (SCF, 2000; Voss K. A. *et al.*, 2007).

1.2.1 Meccanismo d'azione delle fumonisine e dei loro metaboliti

Il principale composto tossico, all'interno di questo gruppo di micotossine, è la fumonisina B₁, la cui azione di carginogenesi ed apoptosi cellulare in diverse specie animali è stata ampiamente studiata e documentata (Voss K. A. *et al.*, 2007).

Gli effetti biologici delle fumonisine sembrano essere riconducibili a una serie di svariati meccanismi d'azione sub-cellulari e biochimici, primo tra tutti il perturbamento del metabolismo lipidico.

La principale azione tossica della fumonisina B₁ consiste nell'inibizione competitiva della ceramide-sintetasi con conseguente alterazione della sintesi *ex novo* di ceramide e del metabolismo delle basi sfingoidi in tutti i tipi di tessuti (Voss K. A. *et al.*, 2007).

La somiglianza strutturale delle fumonisine con le basi sfingoidi sfinganina (Sa) e sfingosina (So) (vedi Figura 7), è il motivo per cui, tali tossine hanno la capacità di interferire con il metabolismo sfingolipidico (Voss K. A. *et al.*, 2007).

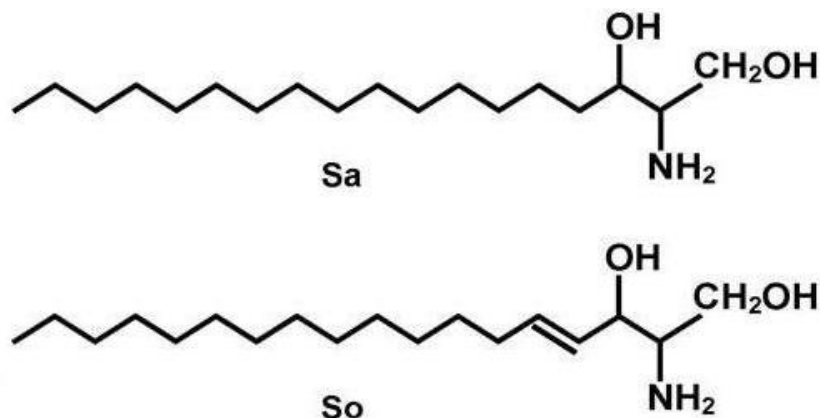


Figura 7: Strutture chimiche di Sfinganina (Sa) e Sfingosina (So).

La biosintesi lipidica avviene a livello del reticolo endoplasmatico rugoso (RER) e dell'apparato del Golgi ed inizia con la condensazione dell'aminoacido serina con un acido grasso (acetil-CoA) come ad esempio il palmito-CoA (vedi Figura 8). A seguito di questa reazione di condensazione si forma la sfinganina che viene quindi convertita, ad opera dell'enzima ceramide-sintetasi, in ceramide a sua volta impiegata nella biosintesi di svariati sfingolipidi.

L'enzima ceramide-sintetasi è in grado di catalizzare la formazione di ceramide anche a partire dalla sfingosina, tale base sfingoide, origina però dal turnover degli sfingolipidi e non dalla sintesi *ex novo* (Merril A. H. Jr *et al.*, 2001).

Durante la sintesi *ex novo* degli sfingolipidi, regolata dall'enzima ceramide-sintetasi, la fumonisina B₁ viene "scambiata" per la base sfingoide sfinganina (Sa) che quindi tende ad accumularsi nella cellula. L'azione inibente della fumonisina B₁ può portare talora anche ad un accumulo di sfingosina (So); tale accumulo è tuttavia tardivo ed avviene quando già sussistono lesioni cellulari, in grado di perturbare e degradare la membrana cellulare (Riley R. T. *et al.*, 2001).

L'innalzamento dei livelli di sfinganina, intermedio metabolico ad altissima bioattività, causa l'inizio di una cascata di eventi cellulari, direttamente responsabili della tossicità generale e della cancerogenicità attribuibile a questo gruppo di micotossine. Oltre all'aumento dei livelli di sfinganina, l'inibizione della ceramide-sintetasi, causata dalle fumonisine determina anche il perturbamento del rapporto tra sfinganina e sfingosina (Sa/So), che, generalmente, tende ad essere a favore della sfinganina.

L'accumulo di sfinganina e l'alterazione del rapporto Sa/So è stato riscontrato in una grande varietà di mammiferi, uccelli e pesci (Voss K. A. *et al.*, 2007). Variazioni,

seppur minime, di questo parametro sono state riscontrate già poche ore dopo la somministrazione orale di concentrazioni di FB₁ a partire dai 0,2 mg/kg b.w. in su (SFC, 2000).

Se da un lato, la concentrazione di sfingalina può essere utile per confermare l'esposizione alla FB₁ negli animali da allevamento, bisogna considerare anche che, le alterazioni indotte dalla tossina sono reversibili: ciò vuol dire che l'aumento o diminuzione del valore riscontrato, dipende strettamente dal fatto che l'animale ingerisca o meno l'alimento contaminato (Voss K. A. *et al.*, 2007).

Il rapporto Sa/So può essere quindi considerato come biomarker di una recente esposizione a concentrazioni tossiche di fumonisine (Solfrizzo M. *et al.*, 1997; Turner P. C. *et al.*, 1999; Seefelder W. *et al.*, 2002). Tuttavia l'utilizzo di tale biomarker in ambito umano è ancora piuttosto limitato, e non è ancora certa, l'effettiva utilità a fini epidemiologici (Voss K. A. *et al.*, 2007).

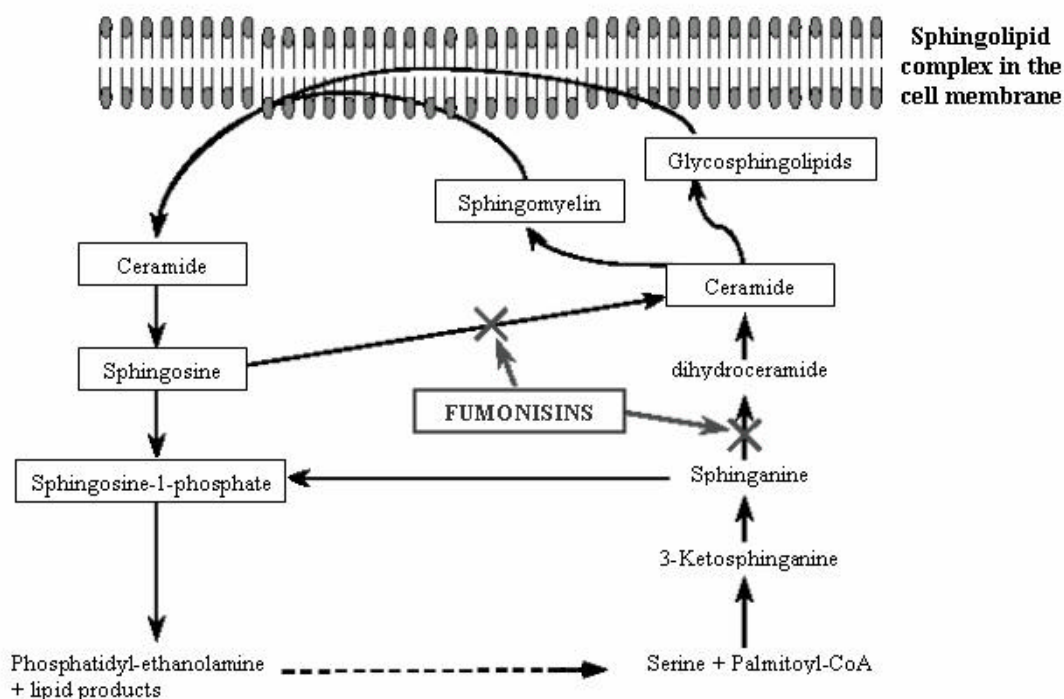


Figura 8: Alterazione del metabolismo degli sfingolipidi indotta dalla fumonisin B₁ (Yiannikouris A. e Jouany J. P., 2002).

Anche l'aminopentolo (AP), derivante dall'idrolisi totale della fumonisin B₁, mostra una capacità di inibizione dell'enzima ceramide-sintetasi. Studi effettuati "in vitro" hanno dimostrato che l'AP risulta di per sé un inibitore meno potente della FB₁ (Merril

A. H. Jr *et al.*, 2001). Tuttavia la perdita delle due catene tricarbossiliche rende l'AP, non solo un inibitore della ceramide-sintetasi, ma anche un substrato per l'acilazione, promossa da tale enzima. In presenza di palmitol-CoA, l'aminopentolo viene infatti trasformato in N-palmitol-AP (PAP) che mostra un potere inibente della ceramide-sintetasi addirittura maggiore della FB₁ (Merril A. H. Jr *et al.*, 2001; Fodor J. *et al.*, 2008a).

Quanto detto, spiega i risultati emersi da uno studio condotto su due differenti gruppi di topi che sono stati alimentati con mangime contaminato, rispettivamente, con 50 ppm di FB₁ e con 10 ppm di AP. Le lesioni anatomopatologiche evidenziate nei due gruppi erano pressoché sovrapponibili, nonostante la dieta contaminata con AP contenesse un quantitativo di tossina ben 5 volte inferiore (Fodor J. *et al.*, 2008a).

Anche il principale metabolita della fumonisina B₂, l'aminotetrolo, subisce l'acilazione operata dalla ceramide-sintetasi, trasformandosi anch'esso, in un composto in grado di perturbare il metabolismo sfingolipidico (Seiferlen M. *et al.*, 2007).

Queste considerazioni fanno comprendere come l'attenzione scientifica debba essere rivolta, non solo verso le fumonisine, ma anche verso i loro metaboliti, la cui potenzialità tossica necessita di essere ulteriormente approfondita.

Il perturbamento del metabolismo lipidico si traduce in una profonda interferenza dei fisiologici meccanismi cellulari, con conseguente stress ossidativo cellulare, alterazione della permeabilità della membrana cellulare e, a seconda della specie animale, con fenomeni di crescita, differenziazione, apoptosi e necrosi cellulare (EFSA, 2005).

Lo squilibrio tra apoptosi e proliferazione cellulare provoca un aumento della velocità, con conseguente perdita del controllo della trascrizione, aumentando così il rischio di mutazione genica. Questa interferenza tra proliferazione e apoptosi cellulare ha quindi un ruolo fondamentale nello scaturire la cancerogenesi. Le concentrazioni in grado di causare apoptosi dipendono però dalla durata dell'esposizione: per esempio, in uno studio effettuato su roditori, tale dosaggio variava da 0,9 a 12 mg FB₁/kg b.w., in prove a lungo e a breve termine rispettivamente (SCF, 2000).

Le fumonisine sono in grado di inibire anche altri enzimi cellulari, come la fosfatasi, l'arginosuccinato sintetasi e la proteina chinasi C, causando quindi, anche un'alterazione del metabolismo delle proteine e del ciclo dell'urea (Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001; Karuna R. e Sashidhar R. B., 2008). La proteina chinasi C gioca un

ruolo fondamentale nella modulazione e regolazione di diverse risposte cellulari che vanno dalla crescita cellulare alla morte programmata (Gopee N. V. *et al.*, 2003).

Un'altra azione tossica di queste micotossine è la lenta perturbazione delle vie metaboliche, regolate dalle Δ^6 -desaturasi e dalla cicloossigenasi. Questo meccanismo d'azione è stato documentato nel fegato di ratti da Gelderblom W. C. A. *et al.*, 2001.

In particolare, da vari studi, è stato evidenziato che la fumonisina B₁ interagisce con il metabolismo del C20:4 Δ^6 , acido grasso correlato alla crescita e differenziazione cellulare e coinvolto nei processi di proliferazione ed apoptosi.

L'alterazione delle vie metaboliche collegate agli enzimi Δ^6 -desaturasi, sembra determinare un irrigidimento delle membrane cellulari ed un cambio della fluidità del doppio strato fosfolipidico, ciò comporta dei cambi conformazionali della stessa membrana cellulare, con probabile alterazione della capacità di risposta dei recettori di membrana (Gelderblom W. C. A. *et al.*, 2001).

1.2.2 Tossicità negli animali

Intossicazioni conseguenti all'esposizione di fumonisine sono state documentate ed osservate in differenti specie animali: le differenze nella sensibilità e nel quadro clinico, tipico di ogni specie, sono riportate qui di seguito. Nella tabella sottostante si trova un riassunto delle principali patologie animali causate dalla fumonisina B₁ (vedi Tabella 4).

Tabella 4: *Principali patologie provocate da FB₁ negli animali.*

SPECIE ANIMALE	PATOLOGIA
Equini	Leucoencefalomalacia equina (ELEM)
Suini	Edema polmonare (PPE) e alterazioni dell'assorbimento intestinale
Bovini	Steatosi epatica
Ovini	Nefropatie ed epatopatie
Polli	Linfocitopenia ed immunosoppressione
Conigli	Emorragia cerebrale
Ratti	Carcinoma epatico
Primati	Cirrosi epatica e trombosi intraventricolare

Nonostante la scoperta e l'isolamento delle fumonisine risalga ad una ventina di anni fa, gli effetti dell'intossicazione da fumonisine sono stati osservati e registrati numerosi anni prima. Tra il 1901 e il 1902, negli Stati Uniti, più di 2000 CAVALLI morirono a seguito dell'ingestione di mangime ammuffito; e sempre per lo stesso motivo, tra il 1934 e il 1935, si registrò il decesso di oltre 5000 cavalli nel solo stato dell'Illinois (Voss K. A., 2007). Questa malattia fu descritta con svariati nomi, come avvelenamento da mais ammuffito, malattia del foraggio, leucoencefalite o cerebrita, ma oggi è nota come leucoencefalomalacia o ELEM (equine leukoencephalomalacia).

La ELEM è una malattia neurologica degenerativa letale, il cui nome, deriva dal tipo (malacia = ammorbidimento, dovuto a necrosi colliquativa) e dalla localizzazione (leuco = materia bianca) della lesione predominante nel cervello (Voss K. A., 2007). Oltre che da queste lesioni cerebrali, l'intossicazione da fumonisine nel cavallo è spesso caratterizzata da danni epatici e renali (WHO, 2000).

Nonostante lesioni neurologiche siano state occasionalmente riscontrate anche in altre specie, questo quadro patologico risulta essere patognomonico per l'intossicazione da fumonisine, solo nella specie equina. Le lesioni neurologiche, solitamente, compaiono a distanza di 7 giorni dall'assunzione e sono inducibili anche sperimentalmente, somministrando direttamente FB₁ per via orale o fornendo con l'alimentazione mais contaminato da *Fusarium moniliforme*. È stato infatti dimostrato, che la somministrazione di 5 mg/kg, per 4-6 settimane, è in grado di provocare ELEM mortale in un cavallo adulto (Marasas W. F. O. *et al.*, 1988).

Studi sperimentali hanno dimostrato che la minima dose intravenosa di FB₁ in grado di provocare alterazioni neurologiche è di 0,01-0,05 mg/kg b.w./day. Assumendo un valore di assorbimento orale attorno al 5 %, la corrispondente dose orale dovrebbe essere di 1,0 mg/kg b.w./day e rappresenta il cosiddetto limite LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) (EFSA, 2005).

I Paesi in cui si riscontra una maggior incidenza di tale patologia sono Egitto, Sud Africa e Stati Uniti (Ross P. F., 1994).

Nei SUINI, la fumonisina è in grado di determinare effetto tossico anche a concentrazioni piuttosto ridotte.

La principale patologia suina associata all'esposizione di fumonisina è l'edema polmonare (porcine pulmonary edema o PPE), che nel 1989, ha causato la morte di migliaia di maiali. Tale patologia è caratterizzata dall'insorgenza di dispnea e cianosi 4-7 giorni dopo l'assunzione di mangime contaminato e può avere una rapida evoluzione con morte degli animali anche nel giro di 48 ore (Voss K. A. *et al.*, 2007). L'esito letale si osserva in genere quando viene somministrato un mangime con concentrazione di FB₁ uguale o superiore a 12 ppm, corrispondente ad una assunzione di 0,6 mg/kg b.w. per giorno. In questi casi mortali, al tavolo anatomopatologico, si osserva un severo quadro di edema polmonare, con polmoni pesanti, intrisi di liquido edematoso e con setti interlobulari ben marcati, senza però che siano presenti segni di natura infiammatoria. Quando invece, si ha una esposizione protratta, oltre le otto settimane, a concentrazioni anche attorno ad 1 mg di FB₁ per kg di mangime, si osservano alterazioni polmonari (proliferazione connettivale attorno ai vasi linfatici, nello spazio sub-pleurico, attorno ai lobuli, come anche attorno ai bronchi e bronchioli), senza che però vi siano dei segni clinici (EFSA, 2005).

In genere il livello LOAEL, per tale specie, si aggira attorno ai 0,2 mg/kg b.w./day, e già con 0,4 mg/kg b.w./day si possono rinvenire le tipiche lesioni polmonari descritte in precedenza (EFSA, 2005).

La FB₁ è anche in grado di alterare la proliferazione e la funzione di barriera propria delle cellule epiteliali dell'intestino dei suini, interferendo così, con il fisiologico assorbimento di nutrienti (Bouhet S. *et al.*, 2004). Questo effetto tossico, a livello gastroenterico, può inoltre facilitare la colonizzazione da parte di *Escherichia coli* patogeno, aprendo così la strada ad ulteriori infezioni (Oswald I. P. *et al.*, 2003).

Nei suini è stata poi osservata una sinergia tossica tra la fumonisina B₁ e l'aflatossina B₁, con un incremento notevole del livello sierico della bilirubina, e degli enzimi fosfatasi alcalina, aspartato amino-trasferasi ed alanina amino-trasferasi. In animali esposti ad entrambe queste micotossine sono state evidenziate al tavolo anatomopatologico epato-splenomegalia ed ipertrofia cardiaca e polmonare (Dilkin P. *et al.*, 2003).

Interessanti, ma non ancora del tutto noti, sono gli effetti tossici delle fumonisine nei **RUMINANTI**. La tossicocinetica delle fumonisine in questi animali è infatti differente, in virtù della particolare fisiologia e della peculiare flora microbica dei sistemi poligastrici. Dai vari studi, effettuati negli anni successivi alla scoperta di queste micotossine, è stato riscontrato che esse vengono scarsamente metabolizzate dalla microflora ruminale e dai microsomi del fegato (Caloni F. *et al.*, 2000; Spotti M. *et al.*, 2001), e che i ruminanti, contrariamente ad altre specie animali, sono relativamente tolleranti a queste molecole (Sørensen L. K. e Elbæk T. H., 2005). Questo fatto è confermato dalla riscontrata tolleranza, da parte dei bovini, verso esposizioni a livelli di tossina letali per equini e suini.

La somministrazione di mangimi contaminati con FB₁, in concentrazioni dell'ordine di 150 mg/kg per 30 giorni, ha portato ad un significativo aumento del pool di enzimi epatici, associato a steatosi epatica, ma non è stato rilevato nessun segno di intossicazione acuta (Caloni F. *et al.*, 2000).

Anche negli ovini è stata osservata una simile alterazione dei livelli degli enzimi epatici, con nefropatie ed epatopatie (Prelusky D. B. *et al.*, 1996b). Una sperimentazione che prevedeva la contaminazione per via orale di un gruppo di agnelli ha però portato a disfunzione epatica e renale dall'esito mortale (Gurung N. K. *et al.*, 1998).

Da vari studi è emerso che una concentrazione media di 95 mg di FB₁ per kg di mangime (corrispondente a 2,4-3,5 mg/kg b.w./day) è in grado di provocare alterazioni biochimiche, correlabili a danno epatico nei ruminanti.

Questa relativa tolleranza alle fumonisine da parte dei bovini, unitamente alla natura ubiquitaria di queste micotossine nel mais, rendono possibile una assunzione cronica da parte di queste specie. L'assenza di segni clinici gravi, conseguenti a tale esposizione, presenti invece in altre specie, secondo alcuni Autori, potrebbe portare ad una assimilazione del tossico o dei suoi metaboliti nelle carni bovine, che potrebbero quindi risultare una pericolosa fonte di assunzione indiretta per l'uomo (Prelusky D. B. *et al.*, 1996b).

Anche i **POLLI** sembrano essere più resistenti agli effetti tossici delle fumonisine rispetto ai suini e cavalli. Tutti gli studi tossicologici, condotti su tale specie, hanno evidenziato un calo delle performances e un ridotto incremento ponderale, associati a fenomeni di iperplasia epatocellulari. Tutti questi effetti sono strettamente dose

dipendenti e gli animali giovani in genere risultano essere più sensibili rispetto agli anziani (WHO, 2000).

La fumonisina B₁ ha inoltre evidenziato una potente azione tossica a livello dei linfociti, con conseguenti fenomeni di immunosoppressione. Allo scopo di valutare l'effetto tossico delle fumonisine, sul sistema immunitario, pulcini broiler di un giorno, sono stati alimentati con mangimi a differenti contaminazione da FB₁ (50, 100 e 200 mg/kg). Dopo tre settimane, gli animali sono stati infettati con *E. coli* e sottoposti a vaccinazione con il virus inattivato della malattia di Newcastle. Dalla valutazione dei livelli di batteriemia e dei titoli anticorpali è emerso che la FB₁ può esercitare effetto immunosoppressivo nel gruppo di pulcini alimentati con mangime contenente 200 mg/kg di fumonisina (EFSA;2005).

Nei **CONIGLI** questa micotossina causa invece danni a livello cerebrale, che si traducono in emorragia e malacia bilaterali. Oltre alle lesioni cerebrali, la fumonisina causa in tale specie una marcata degenerazione (apoptosi) degli epatociti e dell'epitelio del tubulo renale (EFSA, 2005).

Svariati studi sono stati effettuati sui **TOPI**, al fine di descrivere e delineare meglio gli effetti tossici acuti e cronici dell'esposizione alle fumonisine.

Somministrando per via intraperitoneale, fumonisina B₁ ¹⁴C radiomarcata a un gruppo di topi, è stato riscontrato nel fegato solo l'1 % della dose totale e solo tracce nei reni, mentre il restante quantitativo è stato rinvenuto in feci ed urine (WHO, 2000). Gli animali hanno però mostrato danni renali ed epatici cirrotici, congiuntamente a trombosi cardiaca ed epatocarcinoma (SCF, 2000).

Nonostante vi siano delle chiare evidenze, che nei topi, la fumonisina B₁ abbia potere cancerogeno, in una recente monografia della IARC (IARC, 2002), la fumonisina B₁ rimane classificata nel gruppo 2B (possibile cancerogeno per l'uomo). Se questo potere cancerogeno venisse dimostrato ampiamente in un approfondito ed esauriente studio tossicologico, la classificazione IARC potrebbe cambiare da 2B a 2A (probabile cancerogeno per l'uomo) richiedendo quindi un'attenta rivalutazione dei valori di TDI (Miller J. D., 2008).

In una prova eseguita nutrendo tre **BABBUINI** con materiale contaminato da *Fusarium verticillioides*, la tossicosi ha portato a morte per arresto cardiaco due degli animali coinvolti, mentre il terzo animale all'autopsia effettuata dopo la soppressione, ha mostrato segni evidenti di cirrosi epatica (WHO, 2000).

1.2.3 Patogenicità per l'uomo

I dati riguardanti gli effetti delle fumonisine sull'uomo sono ancora piuttosto scarsi, tuttavia, da diversi studi, svolti in questi ultimi anni, sono emerse correlazioni tra l'ingestione di fumonisina B₁ e l'insorgenza di alcune patologie che vengono qui di seguito riportate.

E' interessante notare la grande variabilità tra i livelli di tossina assunti nelle varie aree geografiche (si ricorda che il TDI stabilito per la tossina è 2 µg/kg b.w.). Tale variabilità è dovuta principalmente alla diversa importanza che il mais ricopre all'interno della dieta, nelle diverse popolazioni mondiali, e ciò, è influenzato da motivi di natura demografica, etnica, culturale ed economica (vedi Tabella 5).

Tabella 5: Stima ingestione fumonisina B₁ dal mais nel mondo (JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2001).

AREA GEOGRAFICA	CONSUMO DI MAIS g/giorno	ASSUNZIONE FB ₁ µg/kg b.w./day
Africa	110	2,4
Medio Oriente	48	1,1
America Latina	42	1,0
Europa	8,8	0,2

Più in particolare, in Europa, la JECFA stima valori di ingestione di FB₁ tra i 0,02 µg/kg b.w./day e i 0,2 µg/kg b.w./day. Questi valori sono ampiamente più bassi del valore di TDI previsto per tale micotossina.

Dati presentati dalla European Scientific Cooperation Task o EU SCOOP Task, riportano valori di assunzione del 0,8 % - 13,2 % del TDI per tutta l'intera popolazione e valori compresi tra 0,1 % - 14,1 % del TDI per gli adulti. Valori di esposizione superiori sono riportati per i bambini (attorno al 22,3 % del TDI), in ragione del maggior consumo di cereali di questa fascia di popolazione (EU SCOOP, 2003).

Tra i cereali, il mais e il grano, rappresentano le derrate che più di tutte determinano esposizione dell'uomo alle fumonisine. L'uomo può tuttavia assumere fumonisine, anche consumando prodotti di origine animale, in cui la fumonisinina sia presente a seguito del fenomeno del *carry-over*. In un recente studio, condotto in Francia per controllare l'apporto di fumonisine derivante da una dieta completa, ha fornito dati circa i prodotti di origine animale. In particolare, sono stati testati i visceri edibili, quali fegato e reni, nei quali sono stati trovati dei livelli di contaminazione da fumonisine tra 0,09 e 0,12 µg/kg. È stato quindi stimato, che l'assunzione di tali prodotti carnei, contribuisca per meno del 3 % sul valore di assunzione totale di fumonisine (EFSA, 2005; Leblanc J. Ch. *et al.*, 2005).

CARCINOMA ESOFAGEO: Studi epidemiologici, condotti in Sud Africa e Cina, hanno rivelato una probabile relazione tra l'assunzione di FB₁ e l'aumentata incidenza di cancro all'esofago.

Già negli anni '50, alcuni studi riportarono una incidenza molto alta di carcinoma esofageo nella regione di Transkei, in Sud Africa e nel 1995 furono registrati livelli allarmanti, con ben 56 casi su 100.000 (Makaula N. A. *et al.*, 1996).

Studi comparativi, sulle specie di funghi contaminanti il mais, in questa area geografica hanno dimostrato che il *Fusarium* era quello predominante (con concentrazioni di FB₁ fino a 118 µg/g di mais).

Similmente, una correlazione tra incidenza di cancro all'esofago e consumo di cereali particolarmente contaminati (con livelli ancora maggiori, fino a 155 µg/g) è stata osservata anche in alcune zone della Cina settentrionale, dove i dati statistici hanno riportato 140 casi su 100.000 persone (WHO, 2000; Munkvold G. P. e Desjardins A. E., 1997).

Stesse considerazioni sono emerse anche da uno studio svolto in Iran settentrionale (Shepard G. S. *et al.*, 2000).

L'Italia nord-orientale, più precisamente la provincia di Pordenone, è risultata essere in Europa, l'area con il più elevato tasso di mortalità dovuta a carcinomi alle parti superiori dell'apparato digerente. E' stata rilevata una mortalità di 17 casi su 100.000 persone, ma il consumo di mais contaminato, rinvenuto in quella zona, sarebbe solo una concausa nello sviluppo della malattia, associata anche al marcato consumo di alcool (WHO, 2000).

Ulteriori indagini per confermare la correlazione tra consumo di cereali contaminati ed alta incidenza di carcinoma esofageo, sono state condotte anche in Kenya, Zimbabwe, Brasile e Stati Uniti.

CARCINOMA EPATICO PRIMARIO: Uno studio durato tre anni, nelle regioni di Haimen e di Penlai, nella Cina orientale, ha valutato la responsabilità della fumonisina B₁ nell'incidenza del tumore epatico.

La mortalità registrata ad Haimen è stata circa 4 volte più alta di quella di Penlai, con 52-65 casi su 100.000 persone. Parallelamente, dall'analisi di 240 campioni di mais, provenienti da Haimen è emersa anche una concentrazione di FB₁ da 10 a 50 volte maggiore. Gli stessi campioni presentavano anche una più elevata contaminazione da deossinivalenolo. Alcuni Autori hanno ipotizzato una potente azione sinergica tra diverse micotossine nello sviluppo di carcinoma epatico primario e tale tesi è stata anche dimostrata con studi condotti sui ratti (Gelderblom W. C. A. *et al.*, 1996; Ueno Y. *et al.*, 1997; Gelderblom W. C. A. *et al.*, 2002).

MALFORMAZIONI DEL TUBO NEURALE: Un altro importante effetto negativo, attribuito alla fumonisina, è il blocco nell'assunzione di folato, molecola fondamentale durante il processo di organogenesi. Interferenze con il metabolismo del folato sono state correlate con difetti di sviluppo e malformazioni al tubo neurale (Missmer S. A. *et al.*, 2000).

Una alta incidenza di questa patologia è stata registrata in varie zone del Sud Africa, nelle quali, il consumo di mais ed altri cereali contaminati dalla fumonisina B₁, è piuttosto elevato. Nella provincia di Mpumulanga si è riscontrato ad esempio un tasso di 3,6 casi su 1000, mentre nel distretto di Umzikulu di 3,8 casi su 1000 (Venter P. A. *et al.*, 1995). Inoltre l'incidenza si è dimostrata molto maggiore (fino a 10 volte) nelle zone rurali, piuttosto che nelle città, fatto probabilmente imputabile al maggior consumo di cereali contaminati (Cornell J. *et al.*, 1983).

Un alto tasso (4,3 casi su 1000) di difetti al tubo neurale è stato rilevato anche negli Stati Uniti, a cavallo del 1930. In tale periodo storico, concomitante alla grande depressione economica, è plausibile che il maggior consumo di derrate alimentari ammuffite, e quindi contaminate da *Fusarium*, sia stato un fattore determinante (MacMahon B. e Yen S., 1971).

MICOTOSSICOSI ACUTE: Un grave caso di micotossicosi umana, caratterizzato da tossicità generalizzata a livello gastro-intestinale, con conseguenti dolore addominale e diarrea, è stato riportato nel 1995 nel sud dell'India.

Diversi Autori ritengono che la causa di tale episodio, sia da attribuire al consumo di mais e sorgo ammuffito. Gli abitanti di 27 villaggi di quella zona dell'India, a causa di ristrettezze di natura socio-economica, erano stati infatti costretti a nutrirsi di derrate alimentari deteriorate.

Le analisi, condotte sul sorgo e sul mais ammuffiti, evidenziarono un'elevata presenza di funghi dei generi *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*, entrambi produttori di micotossine. In particolare, la fumonisina B₁ è stata sia nel mais che nel sorgo, quella a concentrazione maggiore, venendo quindi associata a questa micotossicosi acuta (Shetty P. H. e Bhat R. V., 1997).

1.2.4 Tossicocinetica, metabolismo e distribuzione nei tessuti delle fumonisine

Da quanto detto finora si capisce come la fumonisina B₁ risulti essere molto tossica sia per gli animali che per l'uomo.

Nonostante ciò, numerosi studi di tossicocinetica, effettuati con fumonisina radiomarcata, hanno messo in evidenza uno scarsissimo assorbimento della fumonisina B₁ dopo somministrazione orale (Prelusky D. B. *et al.*, 1996a). In genere, i livelli di biodisponibilità della FB₁, dopo somministrazione orale, sono inferiori al 5 %, e la biodisponibilità della FB₂ sembra essere ancora minore (EFSA, 2005).

La frazione assorbita viene poi rapidamente distribuita in tutto l'organismo ed eliminata dai vari organi emuntori. Studi condotti su ratti inoculati endovena, con fumonisina marcata, hanno evidenziato una rapida eliminazione renale, con un tempo di emivita di

40 minuti. I tessuti in cui si sono state riscontrate le più alte concentrazioni di fumonisina erano i reni, seguiti dal fegato. È stata inoltre evidenziata l'eliminazione per via biliare di circa 1,4 % della dose di FB₁ a seguito di glucoronazione epatica (EFSA, 2005).

La secrezione biliare risulta essere molto importante in varie specie (nel maiale arriva ad essere il 70,8 % della dose somministrata per via endovenosa) e questa via di eliminazione, comporta il ricircolo entero-epatico, con un conseguente allungamento dei tempi di eliminazione della tossina (Prelusky D. B. *et al.*, 1996a).

Dosi generalmente ridotte ma persistenti (e biologicamente attive) di fumonisina, o di metaboliti della fumonisina, vengono trattenute dal fegato e dai reni (WHO, 2000).

La FB₁ può essere idrolizzata, ma studi effettuati su microsomi di fegato bovino non hanno evidenziato trasformazioni significative della molecola. Un ridotto tasso di idrolisi è stato osservato anche nel liquido ruminale. Nonostante la biotrasformazione sia davvero limitata, la fumonisina B₁ ha mostrato capacità di inibire alcuni enzimi P450 sia “*in vivo*” che “*in vitro*” (EFSA, 2005).

Non sono riportati casi di assorbimento di fumonisine per inalazione o esposizione cutanea: queste molecole sono infatti molto solubili in acqua e difficilmente i composti polari penetrano attraverso la cute integra. Tuttavia, in virtù della loro presenza nelle cellule di *Fusarium verticillioides*, non si può escludere il possibile rischio di assunzione per bocca o tramite inalazione.

E' stato infine dimostrato, in diverse specie animali, che la tossina non è in grado di attraversare la barriera placentare (SCF, 2000).

Per quanto riguarda invece i metaboliti delle fumonisine, poco si conosce circa l'assorbimento intestinale e il metabolismo dell'aminopentolo. Si sa però che le basi sfingoidi vengono rapidamente assorbite dai microvilli delle cellule intestinali e si ritiene quindi plausibile che anche l'aminopentolo possa venir assorbito a tale livello. Alcuni studi, infatti, hanno confermato che la fumonisina B₁, perdendo le due catene tricarbossiliche ed idrolizzandosi così ad aminopentolo, diventa meno polare e quindi più assorbibile a livello intestinale (De Angelis I. *et al.*, 2005).

La scarsa biodisponibilità, dopo somministrazione orale, ha dato origine al cosiddetto “PARADOSSO DELLA FUMONISINA”: come è possibile che questa molecola causi danni biomolecolari e patologie gravi, persino il cancro, se non viene assorbita dopo somministrazione orale (Shier W. T., 2000)?

Le spiegazioni plausibili che la letteratura fornisce a questo interrogativo sono molteplici:

- ★ La responsabilità potrebbe essere in realtà di un'altra tossina contaminante, più disponibile della fumonisina B₁;
- ★ La fumonisina B₁ potrebbe essere più biodisponibile a dosi più basse;
- ★ A concentrazioni minori potrebbe verificarsi una maggiore biotrasformazione della fumonisina B₁ in metaboliti attivi;
- ★ La poca quantità di fumonisina potrebbe accumularsi nel tempo;
- ★ Derivati di fumonisina B₁ potrebbero venir riassorbiti e riconvertiti a fumonisina B₁ o ad altri metaboliti attivi.

1.2.5 Limiti di legge

Come già detto in precedenza, le fumonisine rappresentano una scoperta relativamente recente, e numerose ricerche, si stanno ancora oggi compiendo, per meglio comprendere il loro meccanismo d'azione e la loro tossicità per uomo ed animali. Per tale ragione, i limiti fissati dai vari enti e commissioni, preposti alla sicurezza alimentare, nei diversi paesi del Mondo, sono attualmente in definizione ed in rapida e continua evoluzione.

Come precedentemente detto, nel 1993, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro ha inserito la FB₁ nel Gruppo 2B, classificandola come "possibile agente cancerogeno per l'uomo", sebbene non sussista ancora una correlazione diretta tra incidenza dei tumori e consumo di mais, derrata nella quale la tossina è molto diffusa (Hussein H. S. e Brasel J. M., 2001; Muscarella M. *et al.*, 2007).

Nonostante numerose ricerche scientifiche sottolineino la potenziale patogenicità di tutte le forme di fumonisine, la maggior presenza di FB₁ sulle derrate alimentari e la sua maggiore tossicità, rispetto alle altre forme di fumonisine, giustificano il fatto, che i valori soglia stabiliti dalla legge, siano spesso espressi come somma delle principali fumonisine: FB₁, FB₂ e talora di FB₃ (Muscarella M. *et al.*, 2007).

La SKLM tedesca (Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln) introduce nel 1999 il primo limite di legge relativo alla fumonisina B₁ presente su alimenti derivati dal mais, fissandolo in 4 µg/g

(di alimento) (SKLM, 1999). L'anno successivo, sulla base di studi sulla tossicità subcronica e cronica in animali da laboratorio, la SCF (Scientific Committee on Food) europea fissa a 2 µg FB₁/kg di peso corporeo il TDI (Tolerable Daily Intake), con un fattore di sicurezza di 100 (SCF, 2000). Nel 2001, la FDA (Food and Drug Administration) stabilisce un limite relativo alla fumonisina B₁ presente su prodotti alimentari derivati dal mais e su alimenti destinati alla nutrizione di animali da macello, pari a 2 µg/g; tuttavia, non considera rilevante, il rischio derivante dal consumo di carni di animali esposti alla potenziale assunzione di fumonisina, in virtù della sua scarsa biodisponibilità (3-6 %) e rapida escrezione, che non consentirebbe accumuli significativi nei tessuti edibili. In disaccordo con la SCF, la FDA abbassa poi il massimo valore tollerabile per l'assunzione giornaliera di FB₁ da parte dell'uomo (TDI) pari a 1 µg/kg di peso corporeo. Due anni più tardi, nell'aprile 2003, la SCF europea, alla luce dei risultati emersi da studi sperimentali su altre fumonisine, porta il TDI a 2 µg/kg di peso corporeo, considerando il peso assoluto di FB₁, FB₂ ed FB₃, da sole o in combinazione.

Il Regolamento CE n. 856 del 6 giugno 2005 modifica il precedente Regolamento CE n. 466/2001, in seguito all'intenzione da parte di alcuni Stati membri, di fissare tenori massimi di fusarium-tossine in taluni alimenti e a causa delle disparità esistenti tra i livelli autorizzati nei diversi Paesi. Nell'allegato viene anche indicata la normativa comunitaria di riferimento per quanto riguarda i metodi di campionamento e di analisi, ovvero la Direttiva 2005/38/CE.

Con il successivo aggiornamento apportato dal Regolamento CE n. 1881/2006, applicato a partire dall'1 marzo 2007, con conseguente abrogazione del Regolamento CE n. 466/2001, vengono indicati i livelli massimi consentiti relativamente a vari contaminanti, tra cui le tossine sintetizzate dai funghi del genere *Fusarium*, nei prodotti alimentari introdotti in commercio.

Per quanto riguarda nello specifico le fumonisine, si era previsto di utilizzare i valori indicati dal Regolamento, solo a decorrere dall'1 ottobre 2007, nel caso in cui prima di allora, alla luce di nuovi dati, relativi alla loro formazione e incidenza di contaminazione, non fossero stati fissati livelli massimi diversi.

Il periodo di tempo antecedente questa data ha consentito agli operatori alimentari della filiera cerealicola, di eseguire ulteriori indagini, che hanno portato le istituzioni, a

ritenere opportuno modificare i livelli massimi nel granoturco e nei prodotti da esso derivati, introducendo il Regolamento CE 1126/2007.

Nella tabella seguente (vedi Tabella 6) vengono riportati i livelli massimi di fumonisina B₁+B₂ tollerati nel granoturco e in alcuni alimenti da esso derivati, a partire dall'1 ottobre 2007:

Tabella 6: Tenori massimi di fumonisine in alimenti destinati al consumo umano (Regolamento CE n. 1126/2007).

PRODOTTO	TENORE MASSIMO FB₁ + FB₂ µg/kg (ppb)
Granoturco non trasformato	4000
Granoturco destinato al consumo umano diretto; Prodotti a base di granoturco destinati al consumo umano diretto, eccetto gli alimenti specificatamente indicati	1000
Cereali da colazione e merende a base di granoturco	800
Alimenti a base di granoturco trasformato e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
Frazioni della molitura del granoturco e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni >500 micron	1400
Frazioni della molitura del granoturco e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni =500 micron	2000

Tuttavia, come già previsto dai regolamenti precedentemente citati, la Commissione prevede di procedere ad un ulteriore riesame dei vari punti della normativa, inerenti i tenori massimi di deossinivalenolo, zearalenone, fumonisina B₁ e fumonisina B₂, conseguentemente ai progressi delle conoscenze scientifiche e tecnologiche, relative a queste tossine negli alimenti (Regolamento CE n. 1881/2006).

Per quanto riguarda il settore zootecnico, la Comunità Europea, al fine di potenziare il controllo delle principali micotossine, contaminanti gli alimenti animali, ha recentemente emanato la Raccomandazione CE n.576/2006, diretta a tutti gli Stati membri, nella quale vengono indicati anche i tenori massimi di FB₁ e FB₂ (vedi Tabella 7).

Tabella 7: Tenori massimi di fumonisine negli alimenti zootecnici (Raccomandazione CE n.576/ 2006).

PRODOTTO (DESTINATO AD ANIMALI)	TENORE MASSIMO mg/kg (ppm)
Materie prime per mangimi:	
Granoturco e prodotti derivati	60
Mangimi complementari o completi per:	
Suini Equini Conigli Animali da compagnia	5
Pesci	10
Pollame Vitelli (<4 mesi) Agnelli Capretti	20
Ruminanti adulti (>4 mesi) Visoni	50

Anche negli Stati Uniti, il problema fumonisina, è quanto mai attuale e oggetto di attenzioni. Per questa ragione la FDA (Food and Drug Administration) ha recentemente emanato linee guida, con lo scopo di identificare livelli massimi per le fumonisine, considerati adeguati, per proteggere la salute dell'uomo e degli animali, che possano essere raggiunti con l'uso di buone pratiche agricole e di trasformazione. Questi dati forniscono indicazioni preliminari, in attesa di un approfondimento delle conoscenze relative ai rischi sanitari, associati alle fumonisine, e dello sviluppo di un programma di controllo a lungo termine (FDA, 2001) (vedi Tabella 8).

Tabella 8: Tenori massimi di fumonisine $B_1+B_2+B_3$ (FDA, 2001).

PRODOTTO	TENORE MASSIMO $FB_1 + FB_2 + FB_3$ mg/kg (ppm)
Alimenti per l'uomo:	
Macinati di mais con tenore di grassi <2,25 %	2
Macinati di mais con tenore di grassi =2,25 %	4
Crusca di mais	4
Farina di mais bianco ("masa")	4
Mais per popcorn	3
Alimenti animali a base di cereali per:	
Equini	5
Cunicoli	(non più del 20 % della dieta) 20
Suini	(non più del 50 % della dieta) 20
Ruminanti da riproduzione	30
Pollame da riproduzione	(non più del 50 % della dieta) 60
Ruminanti >3 mesi all'ingrasso per la macellazione	(non più del 50 % della dieta) 100
Polli all'ingrasso per la macellazione	(non più del 50 % della dieta) 10
Altre specie di animali	(non più del 50 % della dieta)

1.2.6 Fumonisine nei prodotti di origine animale

La possibile contaminazione, da parte delle fumonisine, di alimenti di origine animale come latte, prodotti carnei e uova, non è da sottovalutare in virtù dell' enorme diffusione e consumo di tali prodotti (Yiannikouris A. e Jouany J. P., 2002).

Per quanto riguarda la possibilità di *carry-over* nel **LATTE**, numerosi studi e ricerche sono stati condotti e in alcuni casi, pur se a livelli estremamente bassi, è stato possibile evidenziare dei residui di fumonisine.

Negli Stati Uniti, è stato condotto uno studio, aggiungendo mangime contenente fumonisine alla dieta somministrata per 14 giorni a due Jersey in lattazione, allo scopo di determinare se il contaminante venisse poi escreto con il latte. Il quantitativo di micotossine assunte quotidianamente con la dieta era circa 3 mg/kg b.w., ma, nonostante l'utilizzo di metodiche di laboratorio con sensibilità di 5 ppb, nessun campione di latte è risultato contaminato da fumonisine e gli animali non hanno manifestato particolari sintomi clinici (Richard J. L. *et al.*, 1996).

In una ricerca condotta su 155 campioni di latte, Maragos C. M. e Richard J. L. (1994), hanno rilevato una concentrazione di $FB_1 > 5$ ppb (ng/ml) solo in un caso.

Anche somministrando FB_1 marcata in vacche da latte, attraverso la dieta (1 o 5 mg/kg b.w.) e contemporaneamente per via endovenosa (0,05 o 0,2 mg/kg b.w.), i residui rilevati sono stati insignificanti (5-6 ng/ml) (EFSA, 2005).

Più recentemente, è stato studiato il *carry-over* nel latte bovino, iniettando 2 mg di fumonisina B_1 in 3 quarti di mammella, per poi analizzare latte e siero a distanza di 150 minuti: il passaggio da sangue a latte è stato stimato nel range tra 0,001 e 0,004 % (Spotti M. *et al.*, 2001).

I dati forniti dalle sperimentazioni effettuate sui bovini, vengono confermati da dati analoghi, ottenuti da ricerche svolte sui suini. Ad esempio, dopo 2 settimane di dieta contenente 100 mg FB_1 /kg, Becker B. e collaboratori non hanno rilevato la presenza di fumonisina nel latte delle scrofe in concentrazioni superiori al limite di quantificazione della metodica impiegata che era di 30 ppb (Becker B. A. *et al.*, 1995).

In uno studio più recente, effettuato in Ungheria, la tossina è stata invece rinvenuta nel latte di scrofe, a cui era stata somministrata quotidianamente una coltura fungina contenente dosi elevate di FB_1 (100 mg/giorno per animale). La contaminazione del latte in tale ricerca è risultata attorno ai 18,0-27,5 ng/g (ppb) (Fodor J. *et al.*, 2006).

Come già detto in precedenza, le fumonisine mostrano una certa sensibilità ai trattamenti termici effettuati sui cereali; allo scopo di valutare un'eventuale riduzione della contaminazione, a seguito di trattamenti termici del latte (pastorizzazione e sterilizzazione), in uno studio sono stati confrontati i dati ottenuti, analizzando latte fortificato e conservato fino ad 11 giorni ad una temperatura di 4 °C e latte fortificato e riscaldato a 62 °C per 30 minuti, senza però rilevare nessuna variazione nel tenore di FB_1 e FB_2 (Maragos C. M. e Richard J. L., 1994).

Anche le ricerche più recenti, che sfruttano tecniche analitiche innovative e moderne, dalla elevata precisione e sensibilità, confermano che il latte bovino non sembra avere un ruolo rilevante come fonte di assunzione di fumonisine nell'uomo. È necessario tuttavia sottolineare che il latte costituisce un alimento di fondamentale importanza per i bambini, fascia di popolazione generalmente considerata più sensibile agli effetti tossici delle fumonisine. Inoltre, tutti gli studi di cui si è parlato sono stati condotti su animali con un buono stato di salute e una perfetta condizione fisiologica dell'organo emuntore mammario (Fink-Gremmels J., 2008). In condizioni di alterazione della barriera emato-

mammaria si assiste ad un'aumentata permeabilità e ad un maggior passaggio di tossine dal circolo sanguigno al secreto mammario. Non si può quindi escludere, che in particolari condizioni (somministrazione di alimenti zootecnici ad elevata contaminazione da fumonisine in concomitanza con un'alterazione dello stato di salute degli animali), si possano osservare nel latte, residui di fumonisina tali da poter costituire una fonte di rischio per l'uomo.

In un recente studio Coffey R. e collaboratori (2009) hanno utilizzato il metodo Monte Carlo, per trarre una stima della potenziale esposizione umana alle micotossine, a seguito del consumo di latte. Tale metodo statistico, tiene conto di svariate variabili (contaminazione degli alimenti zootecnici, esposizione dei bovini alle micotossine, entità del *carry-over*, consumo umano di latte) e delle probabilità connesse a tali variabili. Per quanto riguarda la fumonisina B₁, l'utilizzo di tale metodo statistico ha permesso di ottenere una stima della contaminazione media di tale micotossina nel latte e tale valore è di 0,36 µg/kg (Coffey R., 2009).

Il possibile *carry-over* di fumonisine nel latte potrebbe rappresentare un problema anche per il settore zootecnico: la somministrazione di latte contaminato a vitelli, suinetti ed altri giovani animali può portare a perdite economiche, per scarso incremento ponderale e comparsa di altri effetti negativi (Voss K. A., 2007).

Numerose ricerche sono state svolte al fine di investigare e quantificare il fenomeno del *carry-over* nei **PRODOTTI CARNEI**. In uno studio condotto, somministrando a maiali in accrescimento 100 mg di FB₁ al giorno per 5 e 10 giorni, sono stati riscontrati residui di fumonisina in vari tessuti organici. Le maggiori concentrazioni di micotossina sono state rinvenute in fegato (231 ng/g), reni (833 ng/g), polmoni (170 ng/g) e milza (854 ng/g), mentre i tessuti muscolari (26 ng/g) e adiposi (2 ng/g) non hanno evidenziato rilevanti contaminazioni da FB₁ (Meyer K. *et al.*, 2003).

Risultati simili sono stati ottenuti anche in ricerche eseguite successivamente (Fodor J. *et al.*, 2006; Fodor J. *et al.*, 2008a; Fodor J. *et al.*, 2008b). Questi lavori hanno infatti confermato l'accumulo di FB₁ in fegato, reni, polmoni e milza e hanno anche evidenziato l'accumulo di FB₂ nel fegato e nel tessuto adiposo (Fodor J. *et al.*, 2006), nonché la presenza in tali tessuti, dei metaboliti aminopentolo e FB₁ parzialmente idrolizzata (PHFB₁) (Fodor J. *et al.*, 2008a).

La presenza di fumonisina B₁ e del suo metabolita aminopentolo, in fegato di maiali alimentati per sei settimane, con un mangime contenente 30 mg/kg è stata evidenziata anche da Pagliuca G. e collaboratori (2005).

È stata inoltre evidenziata una correlazione tra la concentrazione di fumonisina B₁, accumulatasi nei tessuti ed organi animali, e la concentrazione di tossina presente nella razione alimentare quotidiana. All'aumentare della dose assunta con la dieta, il contenuto di FB₁ in alcuni organi, aumenta con andamento esponenziale (rene e muscolo) o lineare (fegato) (Fodor J. *et al.*, 2008b).

Nonostante la maggior parte delle ricerche, svolte per approfondire il fenomeno di *carry-over* nei prodotti carnei, siano state condotte sulla specie suina, in letteratura è possibile trovare anche qualche dato relativo alla specie bovina. Si è visto, ad esempio, che nei bovini da carne si riscontra l'accumulo di fumonisina B₁ nei tessuti, solo dopo una prolungata e massiccia esposizione degli animali, a concentrazioni estremamente alte di tossina. Vitelloni alimentati per 30 giorni, con una dieta contenente mais contaminato con ben 400 µg/g (ppm) di FB₁, all'esame post mortem hanno mostrato accumulo di tossina in fegato, reni e muscolo (Smith J. S. e Thakur R. A., 1996).

Prendendo in considerazione il valore medio di FB₁, trovato nei tessuti muscolari da Meyer K. *et al.* (26 ng/g), e considerando che una bistecca di media proporzione pesa 200 g circa, con il consumo di una porzione di carne, si potrebbe arrivare ad assumere 5,2 µg di fumonisina. Considerando che il TDI per le fumonisine è di 2 µg/kg b.w., una porzione di carne contenente 5,2 µg di FB₁ per un uomo di 70 kg verrebbe a rappresentare il 3,1 % del valore di fumonisine totali previsto dal TDI (140 µg). È necessario sottolineare tuttavia, che nell'esperimento condotto da Meyer *et al.*, gli animali sono stati esposti a concentrazioni elevatissime di fumonisina che hanno perturbato il normale stato fisiologico dell'animale. Alcuni animali sono morti prima della fine dell'esperimento e in tutti i casi, sono state riscontrate severe lesioni patologiche a carico dei polmoni, che avrebbero determinato l'esclusione dal consumo umano in una normale ispezione *post mortem* al macello (Meyer *et al.*, 2003). Per poter calcolare un valore realistico di esposizione alle fumonisine, derivante dalla carne, sarebbe quindi necessario condurre delle ricerche, somministrando dosi inferiori di fumonisina, al di sotto dei livelli tossici per l'animale.

Il *carry-over* delle fumonisine è stato studiato anche nelle specie avicole, al fine di valutare l'eventuale permanenza di residui nelle UOVA. A seguito della

somministrazione intravenosa (2 mg/kg b.w.) o orale (2 mg/kg b.w.) di ^{14}C -FB₁ in galline ovaiole, la maggior parte della tossina è stata rinvenuta negli escreti degli animali, mentre nei tessuti, è stata riscontrata una quota di accumulo decisamente modesta (< 10-15 ng/g), ad eccezione del fegato (530 ng/g) e dei reni (210 ng/g). Tutte le uova, deposte dalle galline nel corso di tale ricerca, sono state raccolte per poter analizzare albumi, tuorli e gusci. I livelli residui di fumonisina B₁, in tutte queste porzioni sono tuttavia risultati molto bassi (< 10-15 ng/g) (EFSA, 2005).

Alla luce dei dati sopra riportati si comprende come, l'aver a disposizione metodi analitici sempre più selettivi, sensibili e ad ampio spettro, consenta *in primis* di approfondire il fenomeno del *carry-over* e di riflesso, consentirebbe di monitorare i rischi derivanti dalla contaminazione da fumonisine, nei prodotti di origine animale (Sørensen L. K. e Elbæk T. H., 2005).

1.2.7 Metodi di analisi delle fumonisine in matrici di origine animale

I lavori presenti in letteratura, che riguardano la determinazione di fumonisina in matrici di origine animale, non sono molto numerosi. I metodi analitici, sviluppati e messi a punto per l'analisi e il monitoraggio delle derrate di origine vegetale, sono infatti molto più frequenti.

La gran parte dei metodi d'analisi delle fumonisine si basano su metodi cromatografici oppure su metodi immunoenzimatici, come i test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), questi ultimi molto utili per lo screening rapido di un ampio numero di campioni (Shephard G. S., 1998).

L'estrazione di tali composti polari dalla matrice viene generalmente effettuata utilizzando delle miscele acquose di solventi contenenti acetonitrile (ACN) o metanolo (MeOH) (Krska R., 2007; Turner N. W. *et al.*, 2009). In uno studio comparativo, effettuato su matrici vegetali, è stato osservato che l'utilizzo di miscele H₂O:ACN (50:50, v:v) garantisce generalmente recuperi migliori, rispetto all'utilizzo di miscele H₂O:MeOH (De Girolamo A. *et al.*, 2001). L'utilizzo dell'acetonitrile con alcuni tipi di matrici (ad esempio prodotti per l'infanzia) può talora portare alla formazione di una

interfase separativa e in tal caso è stata osservata una migliore estrazione utilizzando una miscela H₂O:ACN:MeOH (50:25:25, v:v:v) (Solfrizzo M. *et al.*, 2001).

I valori di recupero delle fumonisine vengono influenzati anche da altri parametri, quali durata e tipo di estrazione (agitazione magnetica *versus* agitazione meccanica) e valori di temperatura e pH (Krska R., 2007). Recuperi maggiori sono stati riscontrati effettuando l'estrazione del campione non su piastra ad agitazione magnetica, bensì su agitatori meccanici con piano oscillante (De Girolamo A. *et al.*, 2001).

Numerosi metodi analitici prevedono, prima dell'analisi strumentale vera e propria, un passaggio di purificazione del campione, per concentrare le fumonisine ed eliminare le impurità della matrice. La purificazione del campione viene generalmente effettuata mediante estrazione in fase solida (SPE o Solid Phase Extraction) su cartucce a fase inversa (C₁₈ o C₈), a scambio anionico (SAX), o ancora su colonnine di immunoaffinità (IAC). Le cartucce a scambio anionico consentono generalmente di ottenere degli estratti puliti e privi di interferenti, mentre le cartucce C₁₈ consentono la contemporanea determinazione delle fumonisine e dei loro principali metaboliti (Krska R., 2007; Turner N. W. *et al.*, 2009).

In letteratura è possibile trovare alcuni metodi per la determinazione delle fumonisine nel latte e nella carne che prevedono un passaggio purificativo su cartuccia a scambio ionico (Maragos C. M. e Richard J. L., 1994; Richard J. L. *et al.*, 1996, Thakur R. A. e Smith J. S., 1996). Pagliuca *et al.* hanno invece sviluppato e messo a punto una metodica che consente la contemporanea estrazione e purificazione dal fegato di maiale della fumonisina B₁ e del suo metabolita idrolizzato, aminopentolo, mediante utilizzo di una cartuccia Oasis[®] HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance). La fase solida polimerica di questo tipo di cartucce mostra caratteristiche di ritenzione sia idrofila che lipofila, che consentono quindi di estrarre contemporaneamente, sia le molecole polari di fumonisina B₁, che quelle meno polari di aminopentolo (Pagliuca G. *et al.*, 2005).

L'utilizzo di colonnine di immunoaffinità (IAC) è diventato sempre più frequente negli ultimi anni. Nonostante queste colonnine, vengano principalmente prodotte allo scopo di purificare matrici vegetali, quali cereali ed in particolar modo mais, in bibliografia è possibile trovare alcuni metodi analitici per la determinazione di fumonisine nei prodotti di origine animale, che prevedono l'utilizzo di queste colonnine nella fase purificativa del campione (Scott P. M. *et al.*, 1994; Scarano G. *et al.*, 2001; Tardieu D. *et al.*, 2008). Il meccanismo d'azione di questo tipo di colonnine si basa sull'istaurarsi di una

interazione estremamente specifica tra le molecole di fumonisina e gli anticorpi monoclonali adsorbiti alla fase solida di tale tipo di cartuccia (vedi Figura 9). Questo legame, altamente selettivo e specifico, permette di ottenere estratti estremamente puliti e privi di interferenti derivanti dalla matrice e ciò, giustifica il crescente impiego di tale metodica nell'analisi di alimenti di origine animale. Gli alimenti di origine animale rappresentano infatti delle matrici particolarmente problematiche e ricche di composti organici (proteine, lipidi, glucidi) che possono interferire con le successive fasi di analisi strumentale.

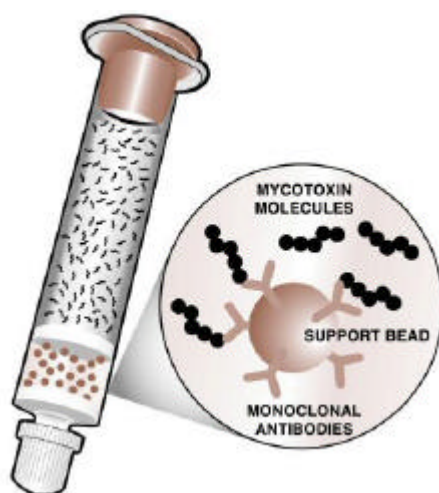


Figura 9: *Meccanismo d'azione delle colonnine di immunoaffinità.*

In virtù del loro elevato peso molecolare e della loro polarità, le fumonisine vengono generalmente separate ed analizzate, impiegando la cromatografia liquida (LC). I metodi di gas cromatografia (GC) trovano invece un limitato impiego nell'analisi di tali micotossine. Per effettuare un'analisi GC è necessario, infatti, rompere le molecole di fumonisina in frammenti dal più piccolo peso molecolare e sottoporre tali frammenti a delle reazioni di derivatizzazione. La preparazione del campione è quindi eccessivamente complessa e lunga, e porta inoltre alla perdita di preziose informazioni di natura strutturale (Zöllner P. e Mayer-Helm B., 2006).

La cromatografia in fase liquida (HPLC o High Performance Liquid Chromatography) accoppiata ad un sistema di rivelazione fluorimetrica (HPLC-FL) rappresenta uno dei più diffusi metodi di analisi delle fumonisine.

Siccome le fumonisine, come anche i loro metaboliti, non presentano un buon assorbimento ultravioletto e difettano di gruppi fluorescenti, per renderle visibili al detector fluorimetrico è necessario effettuare delle reazioni di derivatizzazione.

Svariate tecniche di derivatizzazione precolonna, che interessano il gruppo amminico primario, sono state descritte; le principali tuttavia prevedono l'utilizzo del NDA (acido naftalen-2,3-dicarbossilico) (Maragos C. M. e Richard J. L., 1994; Richard J. L. *et al.*, 1996) oppure l'impiego dell'OPA (orto-ftaldialdeide) (Scott P. M. *et al.*, 1994; Thakur R. A. e Smith J. S., 1996; Spotti M. *et al.*, 2001; Scarano G. *et al.*, 2001; Pagliuca G. *et al.*, 2005; Tardieu D. *et al.*, 2008).

La reazione con acido naftalen-2,3-dicarbossilico rende stabilmente fluorescenti le fumonisine, ma l'utilizzo come catalizzatore di sodio cianide rende questo metodo scomodo e pericoloso per la salute dello sperimentatore (Krska R., 2007).

L'orto-ftaldialdeide ha la capacità di legarsi ai gruppi amminici primari e rendere così il complesso formatosi fluorescente. L'OPA può però legarsi anche agli aminoacidi, ai dipeptidi e ai polipeptidi presenti nelle matrici alimentare complesse come quelle di origine animale. Molto importante risulta quindi la purificazione del campione, volta all'eliminazione di tali interferenti, nonché la separazione cromatografica degli analiti di interesse da tutti gli altri composti derivanti dalla matrice. Un'ulteriore aspetto negativo di questo tipo di derivatizzazione è legato alla scarsa stabilità degli OPA derivati (Krska R., 2007). È necessario quindi standardizzare attentamente il processo di derivatizzazione, facendo intercorrere non più di 60 secondi, tra l'aggiunta del reagente e l'iniezione nel sistema HPLC-FL (Pagliuca G. *et al.*, 2005).

Tra i metodi analitici più innovativi, vanno infine ricordati i metodi di cromatografia liquida, accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS). Negli ultimi dieci anni si è assistito infatti ad un aumento consistente dell'impiego di tali metodiche per l'analisi quali-quantitativa delle micotossine (Krska R. *et al.*, 2008).

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di molecole ionizzate, in funzione del loro rapporto massa/carica e tale separazione avviene generalmente tramite l'azione di un campo magnetico statico od oscillante. Affinché tale separazione avvenga in maniera ottimale è necessario che le molecole ionizzate si trovino in una condizione di alto vuoto, senza che eventuali molecole di gas atmosferico possano interferire con la progressione delle molecole ionizzate all'interno dell'analizzatore di massa.

La necessità di avere gli analiti in fase gassosa ha rappresentato un'evidente difficoltà tecnologica nell'accoppiare tale tipo di detector, operante in condizioni di alto vuoto, con i classici sistemi di cromatografia liquida. L'accoppiamento della cromatografia in

fase liquida (HPLC) con la spettrometria di massa (MS) è infatti un fenomeno piuttosto recente, poiché recente è la nascita di sorgenti ioniche a pressione atmosferica (atmospheric pressure ionization o API). Grazie a queste sorgenti API, la fase liquida che eluisce dal sistema cromatografico viene infatti trasformata in una fase gassosa, in cui le molecole si trovano disperse in forma ionizzata (Krska R. *et al.*, 2008).

Per capire come questo tipo di sorgenti rappresenti una scoperta innovativa, si pensi che solo nel 2002 il fisico J. Fenn ha vinto il nobel per la chimica per l'invenzione della sorgente a ionizzazione "electrospray" o ESI.

Grazie all'invenzione di questo tipo di sorgenti, e alla contemporanea comparsa sul mercato di sistemi strumentali da banco, la spettrometria di massa, accoppiata alla cromatografia liquida, ha subito una notevole diffusione come tecnica analitica per la determinazione di svariati analiti, tra i quali anche le micotossine (Shephard G. S., 2008).

Per quanto riguarda le fumonisine, la gran parte dei metodi analitici HPLC-MS è principalmente focalizzata alla determinazione della fumonisina B₁, in virtù della sua potenziale cancerogenicità. Le altre forme di fumonisina B, o le fumonisine appartenenti al gruppo C, vengono generalmente analizzate in concomitanza con la FB₁ o con altri tipi di micotossine (Zöllner P. e Mayer-Helm B., 2006). La gran parte dei metodi analitici HPLC-MS, presenti in bibliografia, è poi specifica per la determinazione della FB₁ in cereali, mais e prodotti derivati. Per quanto riguarda le matrici di origine animale, allo stato attuale sono ancora pochi i lavori che sono stati pubblicati.

Meyer K. e collaboratori hanno messo a punto una metodica HPLC-MS per la determinazione dei residui di fumonisina B₁ in diversi tessuti e campioni organici di origine suina (polmone, cuore, fegato, milza, pancreas, occhio, muscolo, grasso, siero, bile) (Meyer K. *et al.*, 2003).

Sørensen L. e Elbæk T. H. hanno invece pubblicato un metodo di cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS), per la determinazione di svariate micotossine, tra cui anche la fumonisina B₁ e B₂, in latte bovino (Sørensen L. K. e Elbæk T. H., 2005).

CAPITOLO 2

SCOPO DEL LAVORO E PRESENTAZIONE DELLA PARTE SPERIMENTALE

Come descritto nei paragrafi precedenti, le fumonisine sono delle micotossine ampiamente diffuse in tutto il mondo e presenti su diversi tipi di cereali. Questi, oltre a rappresentare una fonte di cibo potenzialmente dannosa per l'uomo, costituiscono anche parte fondamentale della dieta di un gran numero di animali da allevamento, rendendo così possibile il fenomeno del *carry-over* e la conseguente contaminazione dei prodotti di origine animale.

Alla luce della sospetta correlazione tra l'assunzione di queste sostanze e l'insorgenza di patologie, come tumori esofagei, epatici e malformazioni del tubo neurale, è quanto mai necessario prevenire l'esposizione sia acuta che cronica da parte dell'uomo. A tale scopo è fondamentale lo sviluppo di tecniche avanzate per la valutazione della contaminazione di fumonisine, tanto negli alimenti di origine vegetale, quanto in quelli di origine animale.

Numerosi lavori hanno infatti messo in evidenza elevate concentrazioni di fumonisine nel mais e nei prodotti a base di mais, mentre in letteratura pochi studi sono stati effettuati al fine di elaborare metodiche efficaci per l'estrazione e la quantificazione di queste micotossine in matrici di origine animale.

Per quanto riguarda il latte, i pochi lavori che hanno valutato la presenza di fumonisina B₁ sono in genere non molto recenti e si basano su tecniche di cromatografia liquida accoppiata a detector di tipo fluorimetrico. I risultati emersi da tali studi, inoltre, sono molto variabili e discordanti: alcuni lavori riportano, infatti, una possibile contaminazione del latte, mentre in altri non è stato evidenziato nessun campione positivo. (Maragos C. M. e Richard J. L., 1994; Scott P. M. *et al.*, 1994; Richard J. L. *et al.*, 1996; Scarano G. *et al.*, 2001; Spotti M. *et al.*, 2001; Sørensen L. K. e Elbæk T. H., 2005).

Anche per quanto riguarda la carne, non si trovano numerosi lavori che valutano la presenza di fumonisine in tale matrice. La maggior parte di questi lavori si basa poi su la rilevazione fluorimetrica dei composti derivatizzati con OPA, la cui instabilità nel tempo è ampiamente nota e documentata (Thakur R. A. e Smith J. S., 1996; Pagliuca G. *et al.*, 2005; Tardieu D. *et al.*, 2008). Solo in due studi di tossicocinetica, effettuati somministrando a dei suini diete ad elevata contaminazione da fumonisine, viene impiegata una metodica analitica che prevede l'utilizzo di uno spettrometro di massa triplo quadrupolo (Meyer K. *et al.*, 2003; Fodor J. *et al.*, 2006).

È necessario sottolineare, tuttavia, che in questi studi di tossicocinetica gli animali sono stati esposti a concentrazioni elevate di fumonisine, che hanno alterato il loro normale stato fisiologico. In tutti gli animali sono state infatti osservate svariate lesioni patologiche, il cui rilievo ad una normale ispezione *post mortem* al macello avrebbe determinato l'esclusione dal consumo umano dei prodotti derivanti da tali animali (Meyer *et al.*, 2003).

Per ottenere un dato di persistenza delle fumonisine nei prodotti carnei più veritiero possibile, sarebbe quindi necessario condurre delle ricerche somministrando dosi inferiori di fumonisine, al di sotto dei livelli tossici per l'animale, oppure osservare e monitorare i livelli di contaminazione riscontrabili in animali tenuti in normali condizioni di allevamento. Per effettuare questo tipo di monitoraggio si rende quindi necessario poter disporre di metodiche analitiche estremamente sensibili e selettive, in grado di rilevare con certezza e in maniera inequivocabile anche piccole concentrazioni di fumonisine.

Lo scopo di tale tesi sperimentale è stato quello di valutare la versatilità e le potenzialità della spettrometria di massa nell'analisi di fumonisine e derivati in differenti alimenti e matrici di origine animale.

Nel corso di tale lavoro sono stati infatti messe a punto e validate delle metodiche analitiche di conferma, mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS), per la determinazione delle fumonisine in diverse matrici di origine animale.

Le matrici alimentari, su cui è stato effettuato il lavoro sperimentale di messa a punto e validazione dei metodi HPLC-MS/MS, sono il **LATTE BOVINO** e il **FEGATO DI MAIALE**.

Si è deciso, inoltre, di inserire in questa trattazione il lavoro ed i risultati ottenuti nel corso di una ricerca analoga condotta su **MANGIMI SECCHI PER CANI**. Questo tipo di

matrice, ovviamente, non rappresenta per l'uomo una possibile fonte di esposizione alle fumonisine, tuttavia si è deciso di prenderla comunque in considerazione, visto che le attività effettuate hanno costituito parte integrante del lavoro di laboratorio svolto nei tre anni del corso di dottorato. Oltretutto i risultati ottenuti hanno riconfermato la versatilità e le potenzialità della spettrometria di massa nell'analisi di fumonisine in differenti matrici di origine animale.

Occorre sottolineare che gli alimenti di origine animale, generalmente, rappresentano delle matrici particolarmente critiche e difficoltose dal punto di vista analitico. Rispetto alle matrici vegetali, presentano infatti un maggiore contenuto di proteine e lipidi, composti in grado di interferire notevolmente con le fasi estrattive, purificative, separative ed identificative.

Nel processo di studio e messa a punto delle condizioni ottimali di preparazione del campione, si devono sempre tenere in considerazione le caratteristiche peculiari ed intrinseche della matrice, senza perdere di vista quelle che sono le finalità dell'analisi stessa. Nella scelta delle tecniche di estrazione e purificazione da adottare bisogna infatti considerare il numero e il tipo di analiti da determinare, la rapidità e facilità di preparazione del campione, nonché l'aspetto economico di tutta la procedura analitica.

Il lavoro sperimentale di messa a punto delle metodiche sopracitate, ha consentito, quindi, di sperimentare ed applicare svariate tecniche di estrazione, purificazione e separazione degli analiti prescelti.

Il presente lavoro sperimentale si inserisce nel contesto di diversi progetti di ricerca sulla determinazione di fumonisine in matrici di origine animale. Tali progetti, sono tutti stati svolti all'interno del servizio di prova di Igiene e Tecnologia Alimentare del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna, dipartimento certificato secondo le norme UNI EN ISO 9001:2000 (certificato n° 3516).

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

Lo scopo di tale tesi sperimentale è stato quello di valutare la versatilità e le potenzialità della spettrometria di massa nell'analisi di fumonisine e derivati in differenti alimenti e matrici di origine animale.

In particolare sono state sviluppate e validate differenti metodiche analitiche per la determinazione di:

- FB₁ in latte bovino;
- FB₁, FB₂ e relativi idrolizzati, HFB₁ e HFB₂, in fegato di maiale;
- FB₁ e FB₂ in alimenti secchi completi e complementari per cani.

Poiché la tecnica strumentale analitica impiegata è comune a tutte le metodiche che sono state messe a punto, qui di seguito si trova il Paragrafo 3.1 "Sistema HPLC-MS/MS" in cui verranno riportate le specifiche della strumentazione impiegata per tutte le differenti metodiche.

Dopo tale paragrafo comune, il Capitolo 3 verrà quindi suddiviso in tre differenti Paragrafi che riguarderanno le differenti metodiche analitiche messe a punto. In particolare si troverà il Paragrafo 3.2 "Determinazione di FB₁ in latte bovino", il Paragrafo 3.3 "Determinazione di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ in fegato di maiale" ed infine il Paragrafo 3.4 "Determinazione di FB₁ e FB₂ in alimenti secchi completi e complementari per cane".

3.1 SISTEMA HPLC-MS/MS

Il sistema strumentale utilizzato per l'analisi HPLC-MS/MS era costituito da una pompa quaternaria Waters Alliance 2695, corredata da degasatore, autocampionatore e termostato per colonna.

La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Waters XTerra MS C₁₈ (5 µm - 2,1 x 150 mm), abbinata ad una precolonna Phenomenex C₁₈ (4 x 3,0 mm) (Phenomenex, Torrance, USA).

Lo spettrometro di massa era il triplo quadrupolo Waters Quattro Premier XE (Waters Corporation, Milford, USA).

I dati sono stati ottenuti ed elaborati mediante il software MassLynx (Waters Corporation, Milford, USA).

L'azoto necessario per il funzionamento dell'interfaccia dello spettrometro di massa era prodotto dal generatore d'azoto N2 Mistral -4 (DBS Strumenti Scientifici s.r.l., Padova, Italia).

La figura sottostante ritrae il sistema HPLC-MS/MS utilizzato nel corso di questo lavoro sperimentale (vedi Figura 10).



Figura 10: Sistema HPLC-MS/MS.

3.2 DETERMINAZIONE DI FB₁ IN LATTE BOVINO

3.2.1 Materiali

Campioni di latte

I campioni di latte su cui è stato messo a punto e validato il metodo appartenevano a latte fresco intero acquistato in normali punti vendita e conservato in frigorifero.

Inoltre il metodo è stato confermato tramite l'analisi di alcuni campioni di latte di differenti tipologie (crudo, fresco intero, alta qualità e biologico) raccolti nella provincia di Bologna nel novembre 2007 (vedi Tabella 9).

Tabella 9: *Campioni di latte analizzati.*

<i>CAMPIONE DI LATTE</i>	<i>STABILIMENTO</i>
Crudo A	Ponte Rizzoli (BO)
Fresco intero A	Bologna (BO)
Fresco intero B	Bergamo (BG)
Fresco Intero C	Bologna (BO)
Alta Qualità A	Bologna (BO)
Alta Qualità B	Bergamo (BG)
Alta Qualità C	Bologna (BO)
Alta Qualità D	Grosseto (GR)
Biologico A	Bologna (BO)
Biologico B	Grosseto (GR)

Prodotti chimici

Per la messa a punto e validazione del metodo è stato utilizzato uno standard di FB₁ con purezza del 98% (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germania).

Tutti i solventi utilizzati, sia per l'estrazione che per l'analisi in HPLC-MS/MS, erano di grado LC-MS:

- metanolo (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acetonitrile (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acido formico (Fluka, Buchs, Svizzera).

L'acqua demineralizzata per osmosi inversa (RO) usata per l'estrazione dei campioni, come anche l'acqua ultrapura (UP) impiegata per l'analisi HPLC-MS/MS, è stata prodotta da uno strumento per la produzione di acqua RO e UP *Human Power*[®] I (Human Corporation, Seul, Corea).

Per l'estrazione e purificazione della fumonisina B₁ dal latte sono stati testati due tipi di colonnine a immunoaffinità: le FumoniTest[®] Vicam (Watertown, USA) e le Fumoniprep[®] R-Biopharm Rhône Ltd. (Glasgow, Scozia).

Il tampone fosfato salino (PBS) utilizzato per le fasi di caricamento e di lavaggio delle colonnine di immunoaffinità è stato prodotto sciogliendo le tavolette di PBS della Oxoid Ltd (Basingstoke, Inghilterra) in acqua distillata.

3.2.2 Strumentazione

Centrifuga

I campioni di latte sono stati centrifugati con una centrifuga ALC 4239R (max. rpm 20000), dotata di rotore ALC A-180 (max. rpm 18000, max. carico 0,773 kg) (ALC International s.r.l., Milano, Italia).

Estrattore multiplo per SPE

Per l'estrazione in fase solida (SPE) è stato utilizzato un estrattore multiplo (Waters), che permette di utilizzare fino a 20 cartucce contemporaneamente; tale strumento è dotato di un manometro ed una valvola per la regolazione della pressione interna.

3.2.3 Condizioni HPLC-MS/MS

Condizioni HPLC

L'analisi è stata condotta in condizioni programmate ad un flusso di 300 µL/min e la colonna è stata mantenuta termostata ad una temperatura di 35 °C. Le fasi mobili

erano costituite da acqua:acetonitrile = 90:10 (v:v) addizionata con 0,3 % di acido formico (fase A) e acetonitrile addizionato con 0,3 % di acido formico (fase B).

L'eluizione della FB₁ è stata ottenuta in condizioni isocratiche (75 % A e 25 % B), mentre per eliminare eventuali interferenti presenti nei campioni di latte rimasti in colonna, la fase mobile è stata portata a 20 % A e 80 % B per 2 min. Il programma completo della fase mobile è riportato nella Tabella 10.

Tabella 10: Programma del gradiente della fase mobile.

<i>TEMPO (min.)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	75	25
5,50	75	25
6,00	20	80
7,50	20	80
8,50	75	25
19,00	75	25

Condizioni MS/MS

La modalità di ionizzazione utilizzata era elettrospray positivo (ESI+). I parametri per lo spettrometro di massa utilizzati erano:

- voltaggio del capillare: 3,25 kV
- voltaggio del cono: 50 V
- voltaggio dell'estrattore: 3,00 V
- temperatura della sorgente: 140 °C
- temperatura di desolvatazione: 400 °C
- energia di collisione: 40 V
- flusso del gas del cono: 50 l/h
- flusso del gas di desolvatazione: 897 l/h

La modalità di analisi utilizzata era MRM (multiple reaction monitoring) utilizzando le seguenti transizioni precursore → prodotto della fumonisina B₁: 722,15 *m/z* → 334,10 *m/z* (Ione principale o “quantifier ion”) e 722,15 *m/z* → 352,10 *m/z* (Ione secondario o “qualifier ion”).

3.2.4 Estrazione della FB₁ dal latte bovino

Sono stati prelevati 5 mL di latte bovino precedentemente sgrassato a partire da 10 g di latte centrifugati per 15 minuti a 6000 rpm ad una temperatura di 4 °C. Il campione di latte sgrassato così ottenuto è stato successivamente diluito con l'aggiunta di 5 mL di acqua.

La soluzione ottenuta è stata quindi purificata mediante colonnina a immunoaffinità FumoniTest[®] Vicam: le colonnine sono state estratte dal frigorifero circa un'ora prima dell'analisi, in maniera tale che si potessero equilibrare e raggiungere la temperatura ambiente. I 10 mL di soluzione sono stati caricati per gravità o con un leggero vuoto, in modo da mantenere un flusso di circa 1 goccia al secondo.

Terminato il caricamento la cartuccia è stata lavata con 20 mL di soluzione tampone PBS, creando il vuoto nella parte finale di questa fase allo scopo di allontanare completamente il liquido dalla cartuccia.

E' stata quindi effettuata l'eluizione, caricando, sempre per gravità, 1,5 mL di metanolo seguiti da 1,5 mL di acqua, portando a secco al termine di ognuna delle due fasi. Durante il passaggio del metanolo attraverso la colonna è stato ripetuto per tre volte un processo di *backflushing* che consta nell'invertire il verso del flusso del solvente per garantire una più efficace denaturazione del legame tra la proteina anticorpale e la fumonisina permettendone il rilascio per la successiva analisi.

I 3 mL così ottenuti sono stati concentrati sotto flusso di azoto, riportando poi il volume della soluzione a 1 mL con acqua. 10 µL dell'estratto sono stati quindi iniettati nel sistema HPLC-MS/MS.

In Figura 11 viene riportato uno schema riassuntivo della procedura d'estrazione della fumonisina B₁ dal latte (vedi Figura 11).

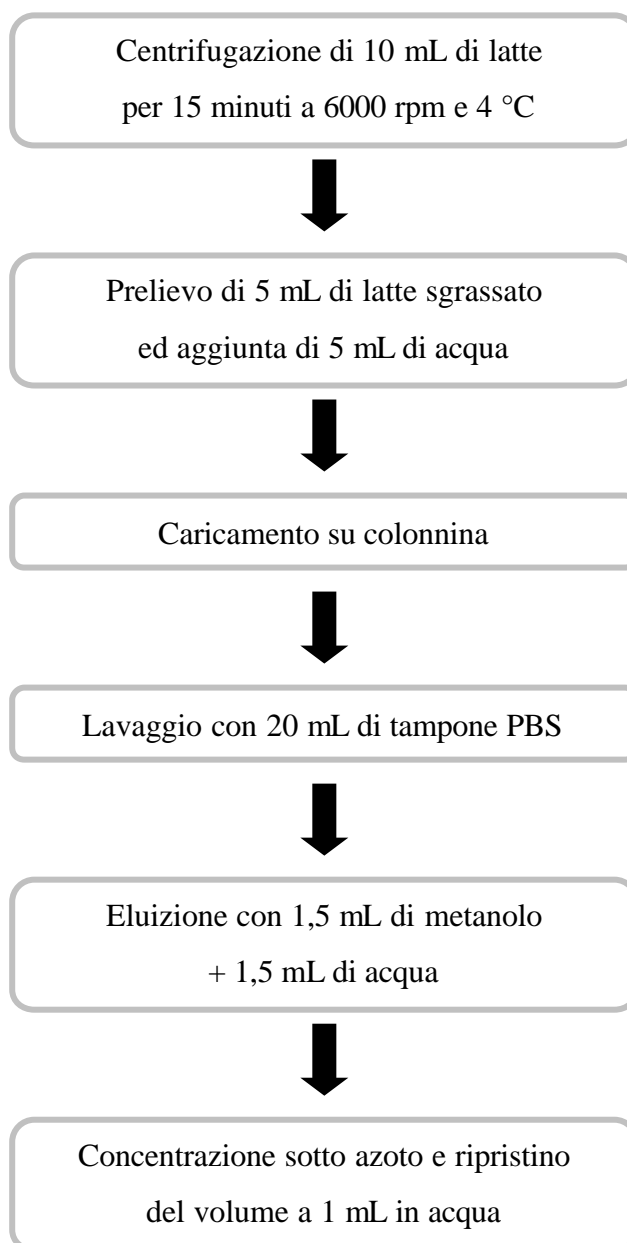


Figura 11: Schema della procedura d'estrazione della fumonisin B₁ dal latte.

3.2.5 Validazione del metodo

Verifica della linearità della risposta strumentale

Per verificare la linearità della risposta strumentale è stata costruita una curva di taratura utilizzando soluzioni standard di FB₁ a titolo noto (0,5 ppb - 2,5 ppb - 5 ppb - 50 ppb).

Lo standard primario di FB₁, pari a 1 mg, è stato solubilizzato in metanolo, ottenendo così 100 mL di soluzione a 10 ppm (stock solution); prelevando da questa 250 µL e

sciogliendoli in 5 mL di acqua è stata quindi ottenuta una soluzione a 500 ppb (soluzione madre). A partire da quest'ultima è stato poi preparato uno standard a 50 ppb, prendendo 200 μL e portandoli a 2 mL sempre con acqua. Tramite successive diluizioni di questa soluzione, sono stati creati gli standard a 0,5, 2,5 e 5 ppb (vedi Figura 12).

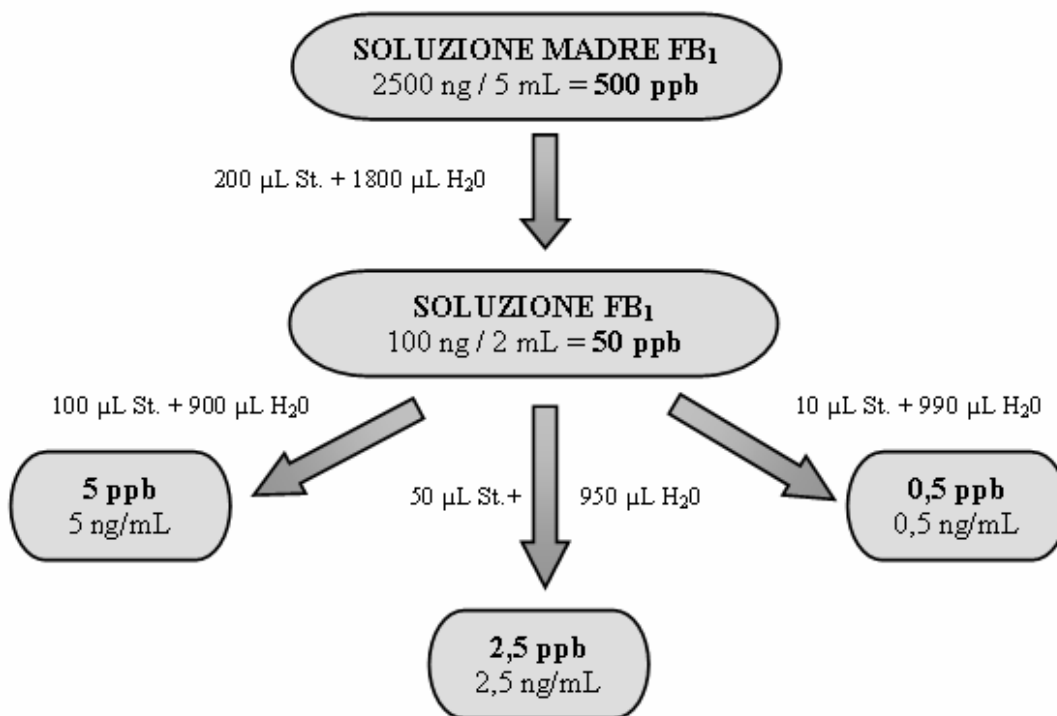


Figura 12: Schema delle diluizioni per la retta di taratura.

Accuratezza

L'accuratezza del metodo è stata valutata analizzando campioni di latte fortificati con diverse concentrazioni note di fumonisina B₁ (0,1 ppb, 0,5 ppb, 1 ppb e 10 ppb).

Per tutte le fortificazioni sono state utilizzate le soluzioni di FB₁ a 500 ppb e a 50 ppb in acqua, secondo questo schema:

20 μL di St. a 50 ppb in 10 mL di latte	➡	latte fortificato a 0,1 ppb
100 μL di St. a 50 ppb in 10 mL di latte	➡	latte fortificato a 0,5 ppb
4 μL di St. a 500 ppb in 10 mL di latte	➡	latte fortificato a 1 ppb
40 μL di St. a 500 ppb in 10 mL di latte	➡	latte fortificato a 10 ppb

Si è deciso di analizzare i campioni di latte fortificati in 3 giorni consecutivi, come riassunto nella tabella seguente (vedi Tabella 11). In questo modo ciascun livello di fortificazione è stato analizzato ogni giorno, per valutare la variabilità intergiornaliera, ed un giorno in doppio, per avere una indicazione della variabilità intragiornaliera. Inoltre ogni campione è stato iniettato due volte.

Tabella 11: Schema delle analisi effettuate in 3 giorni consecutivi.





<i>GIORNO 1</i>	<i>GIORNO 2</i>	<i>GIORNO 3</i>
1 campione bianco	1 campione bianco	2 campioni bianchi
1 campione 0,1 ppb	2 campioni 0,1 ppb	1 campione 0,1 ppb
2 campioni 0,5 ppb	1 campione 0,5 ppb	1 campione 0,5 ppb
1 campione 1 ppb	1 campione 1 ppb	2 campioni 1 ppb
1 campione 10 ppb	1 campione 10 ppb	2 campioni 10 ppb

Precisione

Per valutare la precisione del metodo messo a punto sono stati utilizzati gli stessi valori ottenuti per calcolare l'accuratezza, confrontandoli con quelli degli standard di riferimento.

Per avere standard comparabili con i campioni di latte fortificati, si è dovuto tener conto di un fattore di concentrazione pari a 5, dovuto alla sequenza di passaggi durante la preparazione dei campioni.

Di seguito vengono riportate le concentrazioni in matrice rapportate alle corrispondenti concentrazioni di standard:

0,1 ppb in matrice		0,5 ppb standard
0,5 ppb in matrice		2,5 ppb standard
1 ppb in matrice		5 ppb standard
10 ppb in matrice		50 ppb standard

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Al fine di valutare la purezza ed un'eventuale contaminazione crociata delle colonnine di immunoaffinità e dei solventi utilizzati per l'estrazione e l'analisi cromatografica è stata eseguita una prova "in bianco", nella quale sono stati ripercorsi tutti i passaggi della metodica analitica, applicandoli però a 10 ml di acqua invece che alla matrice latte.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Al fine di valutare la soppressione ionica dovuta ad eventuali interferenti presenti nella matrice è stata effettuata un'analisi cromatografica di un campione di latte bianco infondendo contemporaneamente e direttamente nello spettrometro di massa una soluzione di FB₁ a 0,5 ppm in acqua e acetonitrile (vedi Figura 13).

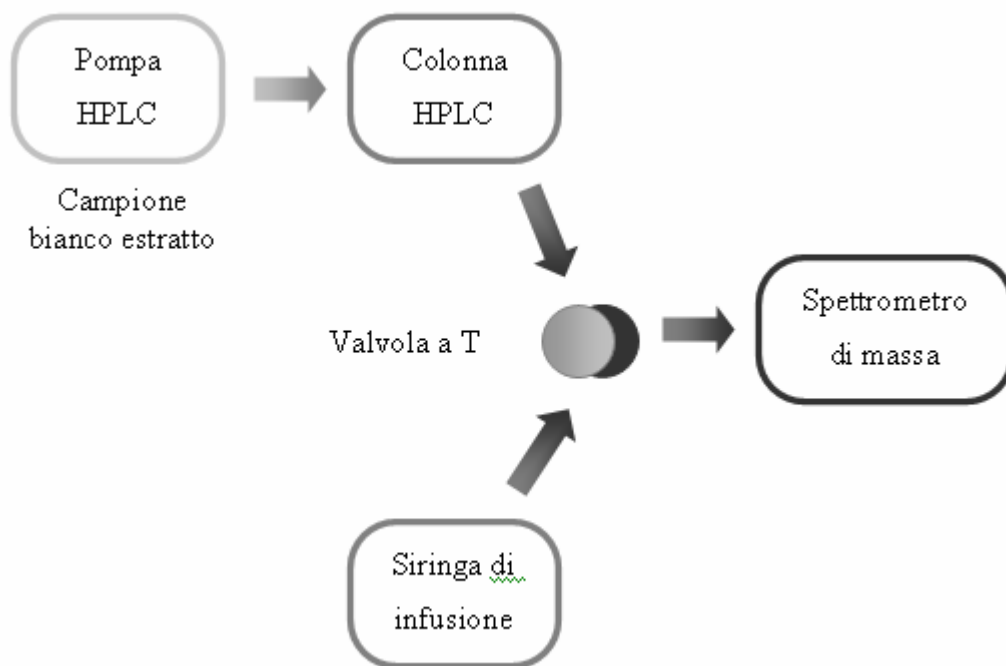


Figura 13: Schema della modalità di verifica della soppressione ionica della matrice (modificato da Antignac J.-P. et al., 2005).

3.3 DETERMINAZIONE DI FB₁, FB₂, HFB₁ E HFB₂ IN FEGATO DI MAIALE

3.3.1 Materiali

Campioni di fegato di maiale

La messa a punto e validazione della metodica per l'analisi delle fumonisine B₁ e B₂, e dei rispettivi metaboliti idrolizzati (HFB₁ o aminopentolo e HFB₂ o aminotetrolo), nel fegato di maiale è stata effettuata utilizzando il fegato di suini di razza mora romagnola provenienti dall'azienda agraria "La Vischia" di Moroncelli Maria Elena.

In tale azienda, impostata e condotta secondo i principi dell'agricoltura biodinamica, l'allevamento dei suini avviene per ciclo chiuso e con rimonta autoprodotta all'interno della stessa azienda. Gli animali vengono allevati al pascolo, e le uniche materie prime che ricevono come integrazione alimentare sono orzo, avena e favino.

La metodica, dopo essere stata sviluppata e validata, è stata quindi applicata all'analisi di 7 campioni di fegato di maiali allevati all'interno degli stabulari del Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna. A partire dalla quarta settimana di vita gli animali sono stati alimentati seguendo un programma di svezzamento basato sulla somministrazione di due differenti diete, una dieta di "fase 1" tra la 4^a e la 6^a settimana di vita e una dieta di "fase 2" tra la 6^a e la 10^a settimana di vita. Gli animali sono stati quindi macellati alla decima settimana di vita e il fegato prelevato e congelato a -20 ° C fino al momento dell'analisi. Il consumo medio giornaliero di mangime è risultato di 0,71 Kg al giorno per animale.

Entrambe le diete, di "fase 1" e di "fase 2", contenevano il 50 % di mais; gli ingredienti presenti e la composizione chimica di tali diete sono riportate in dettaglio nella Tabella 12. Sempre nella seguente tabella sono riportati i valori di contaminazione da fumonisina B₁ e B₂ rilevati nelle due formulazioni mangimistiche. Tali valori rientrano all'interno dei limiti riportati nella Raccomandazione CE n.576/2006: come già detto nel Paragrafo 1.2.5, per i mangimi destinati ai suini viene indicato un tenore massimo di contaminazione da FB₁ e FB₂ di 5 ppm.

Tabella 12: Ingredienti, composizione chimica e contaminazione da fumonisine delle diete di fase 1 e 2.

	DIETA DI FASE 1 (valore %)	DIETA DI FASE 2 (valore %)
INGREDIENTI		
Mais	50,00	50,00
Farina di estrazione di soia (48)	15,83	19,75
Siero dolce di latte	12,00	5,00
Orzo	5,00	16,94
Soia estrusa	5,00	-
Olio di soia	1,71	1,97
Proteine di patata	4,00	3,00
Crusca	3,55	-
Carbonato di calcio	-	0,80
Fosfato monocalcico	0,72	1,16
Calcio formiato	0,70	-
Cloruro di sodio	0,37	0,47
L-Lisina	0,33	0,24
DL-Metionina	0,15	0,08
L-Treonina	0,09	0,50
L-Triptofano	0,06	0,03
Vitamine e oligominerali	0,50	0,50
COMPOSIZIONE CHIMICA		
Sostanza secca (%)	90,16	89,30
Proteina grezza	19,76	17,34
Estratto etereo	3,80	4,87
Ceneri	5,38	4,86
Fibra grezza	2,82	3,05
Amido	36,5	42,4
CONTAMINAZIONE DA FUMONISINE		
FB ₁ + FB ₂ (ppm)	0,91	2,34

Prodotti chimici

Per la messa a punto e validazione del metodo sono stati utilizzati degli standards di FB₁ e FB₂ con una purezza rispettivamente del 98,0 % e del 99,0 % (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germania).

Gli standards di fumonisina idrolizzata (HFB₁ e HFB₂) sono stati ottenuti invece per idrolisi degli standard di FB₁ e FB₂ in accordo con la procedura descritta da Pagliuca e collaboratori (Pagliuca G. *et al.*, 2005). Per la produzione degli idrolizzati sono stati utilizzati dell'acido cloridrico fumante 37 % p.a. (Merk, Darmstadt, Germania) e dell'idrossido di potassio p.a. in pellets (Fluka, Buchs, Svizzera).

Come standard interno è stato utilizzato uno standard analitico OEKANAL[®] di FB₁ marcata (FB₁¹³C₃₄) (Riedel-de Haën, Seelze, Germania). La purezza di tale soluzione di fumonisina marcata (25 µg/mL in acetonitrile:acqua, 1:1, v:v) era del 97,8 %.

I solventi utilizzati per l'estrazione dei campioni erano di grado analitico ACS-ISO:

- metanolo (Merk, Darmstadt, Germania);
- acetonitrile (Merk, Darmstadt, Germania);
- esano (Merk, Darmstadt, Germania).

I solventi utilizzati per l'analisi in HPLC-MS/MS, erano di grado LC-MS:

- metanolo (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acetonitrile (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acido formico (Fluka, Buchs, Svizzera).

L'acqua demineralizzata per osmosi inversa (RO) usata per l'estrazione dei campioni, come anche l'acqua ultrapura (UP) impiegata per l'analisi HPLC-MS/MS, è stata prodotta da uno strumento per la produzione di acqua RO e UP *Human Power[®] I* (Human Corporation, Seul, Corea).

L'estrazione in fase solida dei campioni di fegato di maiale è stata effettuata su cartucce Waters Oasis[®] HLB 3cc della Waters Corporation (Milford, USA).

Il tampone acquoso di caricamento sulle cartucce SPE era quello utilizzato e descritto da Pagliuca e collaboratori (Pagliuca G. *et al.*, 2005). Per la produzione di tale tampone acquoso sono stati utilizzati l'acido acetico glaciale 100 % p.a. (Merk, Darmstadt, Germania) e la trietilamina 99,5 % p.a. (Fluka, Buchs, Svizzera).

3.3.2 Strumentazione

Ultraturrax

L'omogeneizzazione dei campioni è stata effettuata usando un Ultraturrax T 25 basic (IKA, Wilmington, USA).

Agitatore magnetico

I campioni di fegato di maiale omogeneizzati sono stati posti su un agitatore riscaldatore magnetico tipo ARE (VELP Scientifica, Milano, Italia).

Centrifuga

I campioni sono stati centrifugati con una centrifuga ALC 4239R (max. rpm 20000), dotata di rotore ALC A-180 (max. rpm 18000, max. carico 0,773 kg) (ALC International s.r.l., Milano, Italia).

Concentratore centrifugo

L'evaporazione dei campioni è stata effettuata mediante utilizzo di un concentratore centrifugo sotto vuoto. Il modello impiegato era un Univapo[®] 150 H (Uniequip, Martinsried, Germania).

Estrattore multiplo per SPE

Per l'estrazione in fase solida (SPE) è stato utilizzato un estrattore multiplo (Waters Corporation, Milford, USA), che permette di utilizzare fino a 20 cartucce contemporaneamente; tale strumento è dotato di un manometro ed una valvola per la regolazione della pressione interna.

pHmetro

Per il controllo dei valori di pH durante la reazione di preparazione degli idrolizzati delle fumonisine e per il controllo del valore di pH del tampone acquoso di caricamento sulle cartucce SPE è stato utilizzato un pHmetro 510 da banco digitale a microprocessore (Oakton, Vernon Hills, USA).

3.3.3 Condizioni HPLC-MS/MS

Condizioni HPLC

L'analisi è stata condotta in condizioni programmate ad un flusso di 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e la temperatura della colonna è stata mantenuta costante a 35 °C. La fase mobile A era costituita da acqua:acetonitrile = 90:10 (v:v) con 0,3 % di acido formico, mentre la fase mobile B era acetonitrile con 0,3 % di acido formico.

L'eluizione degli analiti è stata ottenuta grazie ad un gradiente binario tra la fase mobile A e la fase mobile B. Il programma del gradiente binario impiegato è riportato nella tabella sottostante (vedi Tabella 13).

La fase mobile è stata mandata in sorgente nell'intervallo di tempo tra 1,30 e 9,30 minuti del programma cromatografico. Nel primo minuto e mezzo del programma, come pure nella parte terminale (tra 9,30 e 18,00 minuti), la fase mobile è stata direttamente deviata verso lo scarico mediante azione di una "divert valve".

Tabella 13: Programma del gradiente della fase mobile.

<i>TEMPO (min.)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0,00	75	25
4,00	75	25
8,00	60	40
12,00	60	40
13,00	75	25
18,00	75	25

Condizioni MS/MS

La modalità di ionizzazione utilizzata era elettrospray positivo (ESI+). I parametri per lo spettrometro di massa utilizzati erano:

- voltaggio del capillare: 3,25 kV
- voltaggio dell'estrattore: 3,00 V
- temperatura della sorgente: 140 °C
- temperatura di desolvatazione: 400 °C
- flusso del gas del cono: 50 l/h
- flusso del gas di desolvatazione: 897 l/h

La modalità di analisi utilizzata era MRM (multiple reaction monitoring). Le transizioni precursore → prodotto tipiche di ciascun analita ed i relativi parametri di voltaggio del cono e di energia di collisione vengono riportati nella Tabella 14.

Tabella 14: *Transizioni e parametri MS/MS utilizzati per ciascun analita.*

ANALITA	IONE PRECURSORE (m/z)	IONI PRODOTTO (m/z)		VOLTAGGIO DEL CONO (V)	ENERGIA DI COLLISIONE (V)
		“Primary o quantifier ion”	“Secondary o qualifier ion”		
FB ₁	722,15	334,10	352,10	50	40
FB ₁ ¹³ C ₃₄	756,45	356,34	374,28	50	40
HFB ₁	406,10	370,12	388,12	31	20
FB ₂	706,32	336,33	318,34	50	40
HFB ₂	390,15	372,24	354,24	29	20

3.3.4 Estrazione degli analiti (FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂) dal fegato di maiale

È stato prelevato 1 g di fegato di maiale e prima di procedere con la procedura estrattiva è stato aggiunto lo standard interno FB₁¹³C₃₄.

Al campione venivano quindi aggiunti 6 mL di una miscela estraente composta da metanolo:acqua = 80:20 (v:v) e si procedeva alla omogeneizzazione dello stesso mediante utilizzo dell’ultraturrax.

Successivamente il campione veniva posto su agitatore magnetico per 20 minuti circa. Al termine di questa fase estrattiva il campione veniva centrifugato per 5 minuti a 3000 rpm a temperatura ambiente. Il surnatante, accuratamente separato dal deposito solido accumulatosi sul fondo della provetta, è stato quindi sottoposto ad un duplice lavaggio liquido-liquido con 6 mL di esano al termine del quale la fase acquosa veniva raccolta in una provetta e successivamente evaporata in Univapo[®].

Il campione veniva poi ripreso con 2 mL di un tampone acquoso con un pH di 3,4 e contenente il 2,0 % di acido acetico glaciale e lo 0,1 % di trietilamina.

Tale soluzione è stata quindi purificata mediante estrazione in fase solida sulle cartucce Waters Oasis[®] HLB. Prima del caricamento del campione le cartucce sono state preventivamente condizionate facendo passare 2mL di metanolo, seguiti da altri 2 mL di acqua. La fase di passaggio del campione è stata effettuata per gravità, in maniera tale da poter mantenere una velocità di flusso non superiore ad 1 goccia per secondo.

Terminato il caricamento, la cartuccia è stata lavata prima con 1 mL di una soluzione acqua:metanolo = 95:5 (v:v) e successivamente con 1 mL di una soluzione acqua:metanolo:acido acetico = 94:5:1 (v:v:v). Al termine di questa fase di lavaggio è stato creato il vuoto all'interno dell'estrattore multiplo, in maniera tale da allontanare completamente il liquido di lavaggio dalla cartuccia. E' stata quindi effettuata l'eluizione, caricando, sempre per gravità, 2 mL di metanolo.

L'eluato è stato quindi concentrato sotto flusso di azoto, riportando poi il volume della soluzione a 1 mL con una soluzione composta dal 75 % di fase mobile A e dal 25 % di fase mobile B (condizioni iniziali del programma cromatografico impiegato). Infine 10 µL dell'estratto sono stati iniettati nel sistema HPLC-MS/MS.

Uno schema riassuntivo della procedura estrattiva qui sopra elencata è riportato nella Figura 14.

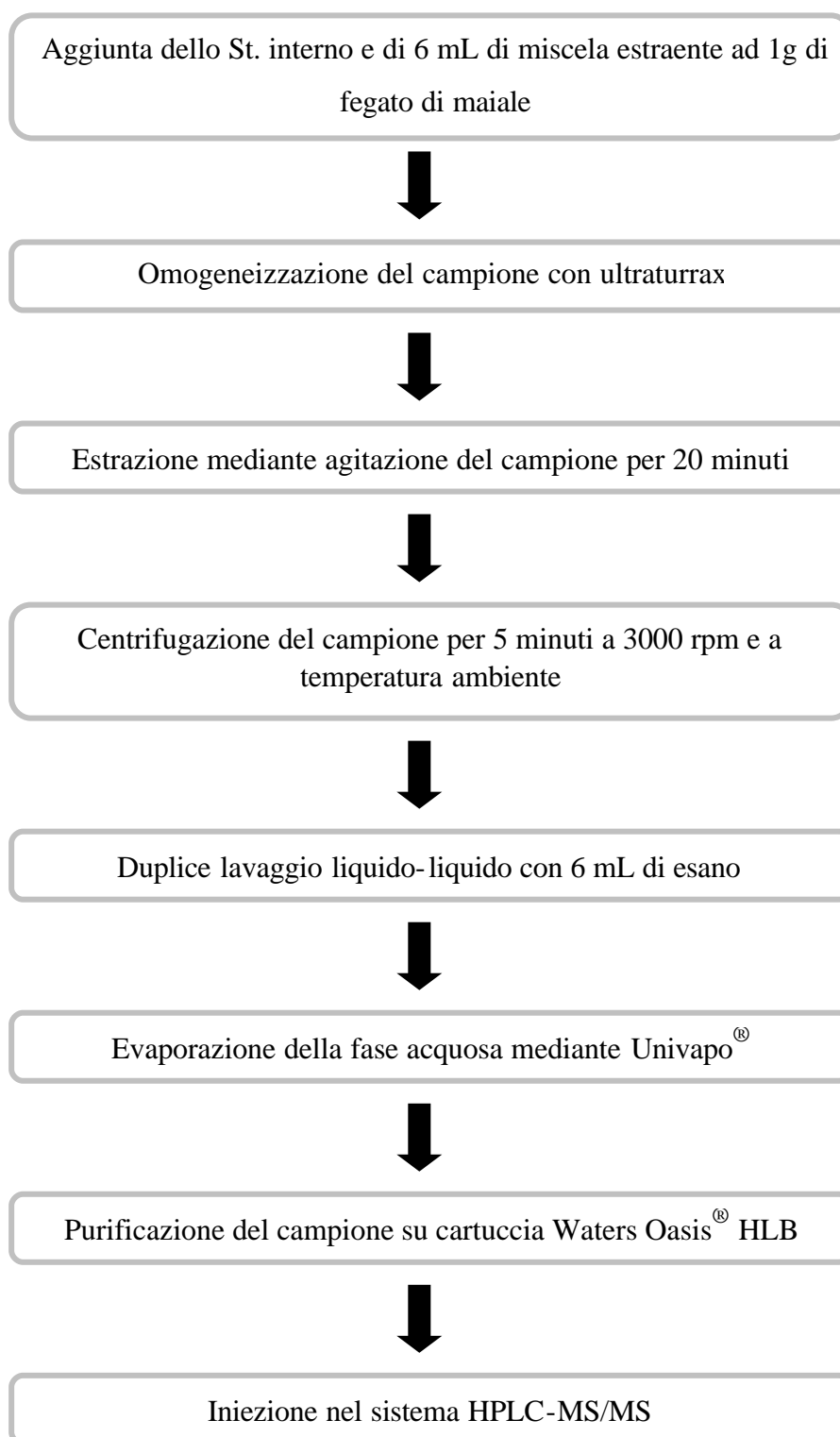


Figura 14: Schema della procedura estrattiva di FB_1 , FB_2 , HFB_1 e HFB_2 dal fegato di maiale.

3.3.5 Validazione del metodo

Preparazione delle soluzioni standard

Gli standards primari di FB₁ e FB₂, pari a 1 mg, sono stati entrambi solubilizzati in 100 mL di acqua:acetonitrile = 1:1 (v:v), ottenendo così due soluzioni a 10 ppm (stock solutions di FB₁ e FB₂).

Per la preparazione degli idrolizzati HFB₁ e HFB₂ è stata seguita la procedura adottata da Pagliuca e collaboratori (Pagliuca G. *et al.*, 2005). In particolare 20 mL di una soluzione di idrossido di potassio 1 M sono stati aggiunti a due soluzioni standard di FB₁ e FB₂ ottenute dissolvendo 1 mg di micotossina in 20 mL di metanolo.

Queste due soluzioni sono state incubate a 70 °C per circa un'ora. Al termine, la soluzione è stata raffreddata fino al raggiungimento della temperatura ambiente e il pH è stato aggiustato ad un valore di 4.5 mediante aggiunta di una soluzione HCl 2 M.

Le due soluzioni sono state quindi portate ad un volume di 100 mL con metanolo fino al raggiungimento di una concentrazione finale di 5,6 ppm per l'HFB₁ e di 5,5 ppm per l'HFB₂.

Le concentrazioni finali delle soluzioni degli idrolizzati sono state calcolate tenendo in considerazione i pesi molecolari di FB₁ e FB₂ e dei rispettivi idrolizzati.

La fumonisina B₁ infatti presenta un peso molecolare di 721,8 mentre l'HFB₁ di 405,0. La quantità di HFB₁ prodottasi è stata calcolata utilizzando la seguente proporzione:

$$1 \text{ mg di FB}_1 : 721,8 = X \text{ mg di HFB}_1 : 405,0 \quad X = 0,56$$

Idrolizzando 1 mg di FB₁ si ottengono quindi 0,56 mg di HFB₁ che disciolti in 100 mL danno una soluzione di 5,6 ppm.

Lo stesso calcolo vale anche per FB₂. Il peso molecolare della FB₂ è di 705,8 mentre quello della HFB₂ è di 389,0. Quindi:

$$1 \text{ mg di FB}_2 : 705,8 = X \text{ mg di HFB}_2 : 389,0 \quad X = 0,55$$

Idrolizzando 1 mg di FB₂ si ottengono quindi 0,55 mg di HFB₂ che disciolti in 100 mL danno una soluzione di 5,5 ppm.

La completezza della reazione di idrolisi è stata verificata mediante un'analisi HPLC-FL (cromatografia liquida accoppiata ad un detector fluorimetrico) nelle condizioni analitiche utilizzate da Pagliuca e collaboratori (Pagliuca G. *et al.*, 2005).

Le soluzioni di HFB₁ e HFB₂ così ottenute sono state quindi sottoposte ad un passaggio di purificazione su cartuccia Waters Oasis[®] HLB prima dell'utilizzo delle stesse nel sistema HPLC-MS/MS. La procedura di purificazione su cartuccia SPE e, in particolare, le condizioni di caricamento, lavaggio ed eluizione impiegate, sono uguali a quelle impiegate per la purificazione dei campioni (vedi Paragrafo 3.3.4).

La stock solution di fumonisina marcata (FB₁ ¹³C₃₄) è stata ottenuta solubilizzando 100 µL di standard OEKANAL[®] (25 µg/mL) in 5 mL di acqua:acetonitrile = 1:1 (v:v), ottenendo così una soluzione con una concentrazione finale di 0.5 ppm.

Verifica della linearità della risposta strumentale

Per verificare la linearità della risposta strumentale è stata costruita una curva di taratura utilizzando delle soluzioni standard di riferimento di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ a titolo noto (0 ppb - 5 ppb - 10 ppb - 30 ppb - 50 ppb - 80 ppb - 100 ppb), contenenti tutte un quantitativo fisso di IS (Standard Interno) e cioè 30 ppb di FB₁ ¹³C₃₄.

Tutte queste soluzioni standard di riferimento sono state preparate a partire da una Working Solution (WS) ad 1 ppm, ottenuta per diluizione delle singole stock solutions di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂. In particolare in un matraccio graduato da 10 mL sono stati aggiunti:

- 1 mL di stock solution di FB₁ a 10 ppm;
- 1 mL di di stock solution di FB₂ a 10 ppm;
- 1,786 mL di stock solution di HFB₁;
- 1,820 mL di stock solution di HFB₂.

Si è poi portato a volume con la fase mobile nelle condizioni iniziali del programma di gradiente cromatografico (75 % di fase mobile A e 25 % di fase mobile B).

Le soluzioni standard di riferimento sono state quindi ottenute diluendo un certo quantitativo di WS ed un quantitativo fisso di IS in 1 mL di fase mobile (75 % di fase mobile A e 25 % di fase mobile B), in maniera tale da ottenere le concentrazioni elencate sopra. Per quanto riguarda il quantitativo fisso di standard interno aggiunto, in tutte le soluzioni sono stati diluiti 60 µL della stock solution di FB₁ ¹³C₃₄ a 0,5 ppm, in

maniera tale da ottenere una concentrazione finale in 1 mL di 30 ppb di fumonisina marcata.

Nella schema seguente si trova l'indicazione precisa del volume di WS utilizzata per poter ottenere le soluzioni standard di riferimento citate sopra

Volume di WS (1 ppm) da diluire in 1 mL di fase mobile	Concentrazione dello Standard di riferimento
0 µL	0 ppb
5 µL	5 ppb
10 µL	10 ppb
30 µL	30 ppb
50 µL	50 ppb
80 µL	80 ppb
100 µL	100 ppb

Accuratezza

I campioni di fegato utilizzati per la validazione del metodo analitico sono stati precedentemente analizzati al fine di escludere la presenza degli analiti di interesse.

L'accuratezza del metodo è stata valutata analizzando campioni di fegato di maiale fortificati mediante aggiunta di una quantità fissa di IS (FB₁ ¹³C₃₄) e di differenti concentrazioni note di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ (10 ppb – 30 ppb – 50 ppb).

In tutti i campioni sono stati aggiunti 60 µL della stock solution di FB₁ ¹³C₃₄ a 0,5 ppm per ottenere un livello di fortificazione di 30 ppb di standard interno.

Per fortificare il fegato di maiale con gli analiti di interesse è stata utilizzata la soluzione standard WS a 1 ppm secondo questo schema:

10 µL di WS a 1 ppm in 1 g di fegato	➡	Fegato fortificato a 10 ppb
30 µL di WS a 1 ppm in 1 g di fegato	➡	Fegato fortificato a 30 ppb
50 µL di WS a 1 ppm in 1 g di fegato	➡	Fegato fortificato a 50 ppb

Si è deciso di analizzare i campioni di fegato fortificati in 3 giorni consecutivi, come riassunto nella tabella seguente (vedi Tabella 15). In questo modo per ciascun livello di fortificazione è stato possibile valutare la variabilità intragiornaliera ma anche intergiornaliera. Inoltre ciascun campione è stato iniettato due volte.

Tabella 15: Schema delle analisi effettuate in 3 giorni consecutivi.




	<i>GIORNO 1</i>	<i>GIORNO 2</i>	<i>GIORNO 3</i>
	4 campioni bianchi	4 campioni bianchi	4 campioni bianchi
	4 campioni a 10 ppb	4 campioni a 10 ppb	4 campioni a 10 ppb
	4 campioni a 30 ppb	4 campioni a 30 ppb	4 campioni a 10 ppb
	4 campioni a 50 ppb	4 campioni a 50 ppb	4 campioni a 50 ppb
<i>Totale del giorno</i>	<i>16 campioni</i>	<i>16 campioni</i>	<i>16 campioni</i>
<i>Totale</i>	<i>48 campioni</i>		

I dati ottenuti dall'iniezione di tutti i campioni di fegato fortificato sono stati utilizzati per la costruzione delle rette di taratura in matrice degli analiti presi in considerazione. In particolare tali rette di tarature sono state ottenute mettendo in ascissa i valori corrispondenti al livello di fortificazione (10 ppb – 30 ppb – 50 ppb) ed in ordinata il rapporto tra i punti area dell'analita considerato e i punti area dello standard interno (FB₁ ¹³C₃₄). I dati relativi alla validazione del metodo (accuratezza e precisione), come pure i dati relativi alla quantificazione degli analiti nei campioni incogniti, sono stati ottenuti utilizzando le rette di taratura in matrice.

Precisione

Per valutare la precisione del metodo messo a punto sono stati utilizzati gli stessi valori ottenuti per calcolare l'accuratezza, confrontandoli con quelli degli standard di riferimento.

Di seguito vengono riportate le concentrazioni in matrice rapportate alle corrispondenti concentrazioni degli standard di riferimento:

10 ppb in matrice		10 ppb standard
30 ppb in matrice		30 ppb standard
50 ppb in matrice		50 ppb standard

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Al fine di valutare la purezza dei solventi utilizzati per l'estrazione e l'analisi cromatografica, e al fine di escludere la possibilità di eventuali interferenze derivanti dal processo estrattivo, è stata eseguita una prova "in bianco". In tale prova tutti i passaggi della metodica analitica sono stati applicati ad 1 g di acqua invece che alla matrice fegato.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Al fine di valutare la soppressione ionica dovuta ad eventuali interferenti presenti nella matrice è stata effettuata un'analisi cromatografica di un campione di fegato bianco infondendo contemporaneamente e direttamente nello spettrometro di massa una soluzione standard mista di FB₁, FB₁ marcata, FB₂, HFB₁e HFB₂ (il procedimento è stato in precedenza già schematizzato nella Figura 13).

3.4 DETERMINAZIONE DI FB₁ E FB₂ IN ALIMENTI SECCHI COMPLETI E COMPLEMENTARI PER CANE

3.4.1 Materiali

Campioni di alimenti secchi completi e complementari per cane

I campioni di alimenti secchi completi e complementari per cani analizzati nel corso di tale lavoro sperimentale sono stati prodotti in Europa ed acquistati in negozi al dettaglio di Bologna. Il campionamento è stato effettuato in maniera tale da coprire differenti fasce di mercato spaziando da prodotti di bassa, media ed alta qualità. In particolare sono stati raccolti 32 campioni di mangime secco completo e 9 campioni di mangime secco complementare.

Tutti i campioni sono stati macinati e conservati a -20 °C prima dell'analisi strumentale. Per la messa a punto e validazione delle procedure d'estrazione sono stati scelti un mangime complementare a base di riso soffiato ed un mangime completo ad elevato tenore proteico e con una bassa percentuale di mais.

Prodotti chimici

Per la messa a punto e validazione del metodo sono stati utilizzati degli standards di FB₁ e FB₂ con una purezza rispettivamente del 98,0 % e del 99,0 % (Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Germania).

I solventi utilizzati per l'estrazione dei campioni erano di grado analitico ACS-ISO:

- metanolo (Merk, Darmstadt, Germania);
- acetonitrile (Merk, Darmstadt, Germania);
- esano (Merk, Darmstadt, Germania).

I solventi utilizzati per l'analisi in HPLC-MS/MS, erano di grado LC-MS:

- metanolo (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acetonitrile (Riedel-de Haën, Seelze, Germania);
- acido formico (Fluka, Buchs, Svizzera).

L'acqua demineralizzata per osmosi inversa (RO) usata per l'estrazione dei campioni, come anche l'acqua ultrapura (UP) impiegata per l'analisi HPLC-MS/MS, è stata prodotta da uno strumento per la produzione di acqua RO e UP *Human Power*[®] I (Human Corporation, Seul, Corea).

Per l'estrazione e purificazione della fumonisina B₁ e B₂ da alimenti secchi completi e complementari per cane sono state usate le colonnine a immunoaffinità Fumoniprep[®] R-Biopharm Rhône Ltd. (Glasgow, Scozia).

Il tampone fosfato salino (PBS) utilizzato per le fasi di caricamento e di lavaggio delle colonnine di immunoaffinità è stato prodotto sciogliendo le tavolette di PBS della Oxoid Ltd (Basingstoke, Inghilterra) in acqua distillata.

3.4.2 Strumentazione

Agitatore orbitale

L'agitazione dei campioni è stata effettuata su un agitatore orbitale Unimax 2010 (Heidolph Instruments CMBH & CO KG, Schwabach, Germania). Questo strumento consente di agitare un carico massimo di 10 Kg con un range di rotazioni variabili da 20 a 400 rpm.

Centrifuga

I campioni sono stati centrifugati con una centrifuga ALC 4239R (max. rpm 20000), dotata di rotore ALC A-180 (max. rpm 18000, max. carico 0,773 kg) (ALC International s.r.l., Milano, Italia).

Estrattore multiplo per SPE

Per l'estrazione in fase solida (SPE) è stato utilizzato un estrattore multiplo (Waters Corporation, Milford, USA), che permette di utilizzare fino a 20 cartucce contemporaneamente; tale strumento è dotato di un manometro ed una valvola per la regolazione della pressione interna.

3.4.3 Condizioni HPLC-MS/MS

Condizioni HPLC

L'analisi è stata condotta in condizioni programmate ad un flusso di 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ e la temperatura della colonna è stata mantenuta costante a 35 °C. La fase mobile A era costituita da acqua:acetonitrile = 90:10 (v:v) con 0,3 % di acido formico, mentre la fase mobile B era acetonitrile con 0,3 % di acido formico.

L'eluizione degli analiti è stata ottenuta grazie ad un gradiente binario tra la fase mobile A e la fase mobile B. Il programma del gradiente binario impiegato è riportato nella tabella sottostante (vedi Tabella 16).

Tabella 16: Programma del gradiente della fase mobile.

<i>TEMPO (min.)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>
0	75	25
4	75	25
8	40	60
12	40	60
13	75	25
21	75	25

Condizioni MS/MS

La modalità di ionizzazione utilizzata era elettrospray positivo (ESI+). I parametri per lo spettrometro di massa utilizzati erano:

- voltaggio del capillare: 3,25 kV
- voltaggio del cono: 50 V
- voltaggio dell'estrattore: 3,00 V
- temperatura della sorgente: 140 °C
- temperatura di desolvatazione: 400 °C
- energia di collisione: 40 V
- flusso del gas del cono: 50 l/h
- flusso del gas di desolvatazione: 897 l/h

La modalità di analisi utilizzata era MRM (multiple reaction monitoring). Le transizioni precursore → prodotto monitorate per la fumonisina B₁ erano 722,15 *m/z* → 334,10 *m/z* (Ione principale o “quantifier ion”) e 722,15 *m/z* → 352,10 *m/z* (Ione secondario o “qualifier ion”). Mentre per la fumonisina B₂ erano 706,32 *m/z* → 336,33 *m/z* (Ione principale o “quantifier ion”) e 706,32 *m/z* → 318,34 *m/z* (Ione secondario o “qualifier ion”).

3.4.4 Estrazione della FB₁ e FB₂ dagli alimenti secchi per cane

Sono state messe a punto due differenti metodiche di estrazione della FB₁ e FB₂ dagli alimenti secchi per cane, a seconda che si tratti di un mangime completo o di un mangime complementare.

Per quanto concerne i MANGIMI SECCHI COMPLEMENTARI i campioni sono stati processati come indicato qui di seguito. A 20 g di mangime macinato sono stati aggiunti 50 mL di una miscela estraente composta da acetonitrile:metanolo:acqua = 25:25:50 (v:v:v). Il campione è stato quindi posto su agitatore orbitale per 30 minuti al termine dei quali il campione è stato sottoposto ad una centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato filtrato attraverso filtro di carta Whatman n°4 mentre il rimanente solido è stato riestratto con altri 50 mL della soluzione d'estrazione, centrifugato e filtrato su filtro di carta come sopra. I surnatanti derivanti dalla prima estrazione e dalla seconda estrazione sono stati raccolti assieme. 10 mL di estratto sono stati quindi prelevati e diluiti con 40 mL di tampone fosfato salino (PBS). L'estratto così diluito è stato filtrato su filtro di carta Whatman n°4 ed un volume di 10 mL è stato quindi caricato su cartuccia di immunoaffinità Fumoniprep[®] mantenendo un flusso di 1-2 gocce per secondo. La cartuccia è stata quindi lavata con 20 mL di PBS ad una velocità di flusso abbastanza elevata (5 mL/minuto) creando il vuoto nella parte finale di questa fase allo scopo di allontanare completamente il liquido dalla cartuccia. Le fumonisine sono state eluite caricando per gravità 1,5 mL di metanolo. Durante il passaggio del metanolo attraverso la colonna è stato ripetuto per tre volte un processo di *backflushing* che consta nell'invertire il verso del flusso del solvente per garantire una più efficace denaturazione del legame tra la proteina anticorpale e le fumonisine. Dopo il passaggio

di metanolo la cartuccia è stata portata a secco prima del passaggio finale di 1,5 mL di acqua.

I 3 mL così ottenuti sono stati concentrati sotto flusso di azoto, riportando poi il volume della soluzione a 1 mL con acqua. 10 μ L dell'estratto sono stati quindi iniettati nel sistema HPLC-MS/MS.

La procedura estrattiva messa a punto per i MANGIMI SECCHI COMPLETI è molto simile a quella sopra descritta per i mangimi complementari. Nel caso dei mangimi completi è stato tuttavia necessario introdurre un'ulteriore passaggio di purificazione prima della diluizione dell'estratto con il tampone PBS. Più in particolare, dopo che i due estratti sono stati raccolti assieme, 20 mL di campione sono stati sottoposti ad un duplice lavaggio liquido-liquido con 20 mL di esano. Quindi 10 mL della fase acquosa sono stati diluiti come sopra con 40 ml di PBS e 10 mL di estratto diluito caricati sulla cartuccia di immunoaffinità Fumoniprep[®].

Nella figura seguente viene riportato uno schema riassuntivo della procedura d'estrazione delle fumonisine B₁ e B₂ dagli alimenti secchi per cani (vedi Figura 15).

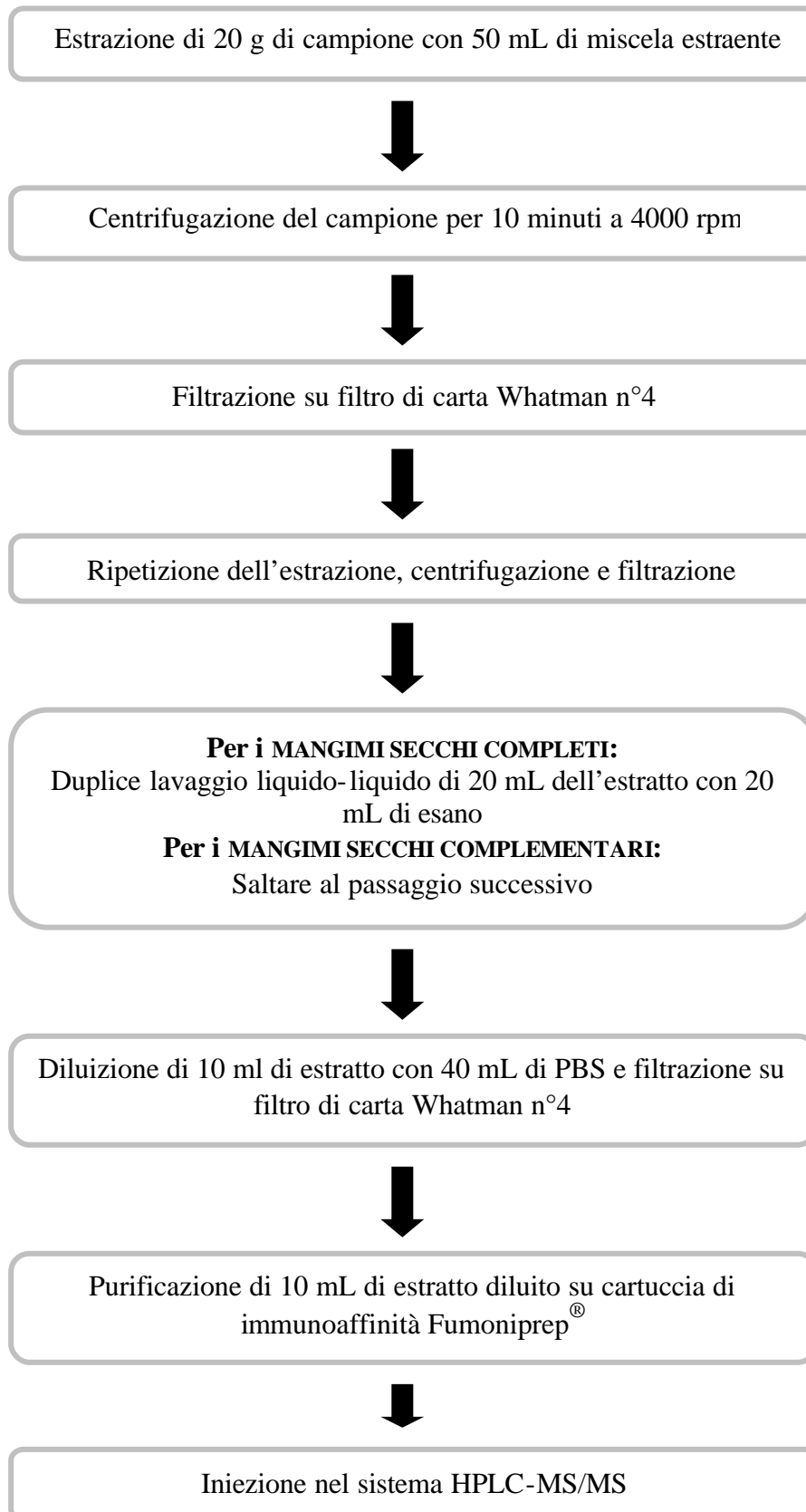


Figura 15: Schema della procedura estrattiva di FB₁ e FB₂ dal mangime secco per cani.

3.4.5 Validazione del metodo

Verifica della linearità della risposta strumentale

Gli standards primari di FB₁ e FB₂, pari a 1 mg, sono stati entrambi solubilizzati in 100 mL di acqua:acetonitrile = 1:1 (v:v), ottenendo così due soluzioni a 10 ppm (stock solutions di FB₁ e FB₂). Queste stock solutions sono state impiegate successivamente per la preparazione delle soluzioni standard di riferimento, nonché per la fortificazione dei campioni per le prove di accuratezza e precisione.

Per verificare la linearità della risposta strumentale è stata costruita una curva di taratura iniettando in triplicato sette soluzioni standard di riferimento contenenti concentrazioni note di FB₁ e FB₂ (0,005 – 0,025 – 0,04 – 0,2 – 0,4 – 1,5 – 2 ppm).

Tenendo in considerazione un fattore di concentrazione pari a 2,5 dovuto ai vari passaggi di preparazione del campione, le concentrazioni testate corrispondono ai seguenti livelli di contaminazione in matrice: 0,0125 – 0,0625 – 0,1 – 0,5 – 1 – 3,75 – 5 ppm.

Accuratezza

Come già accennato in precedenza, essendo state prese in considerazioni due differenti tipi di matrice (mangimi secchi per cane di tipo complementare e di tipo completo) è stato necessario mettere a punto e validare due differenti metodiche analitiche.

L'accuratezza dei metodi è stata valutata analizzando campioni di mangime complementare e campioni di mangime completo per cane fortificati con concentrazioni note di FB₁ e FB₂ (0,1 – 1 – 3,75 – 5 ppm).

Per tutte le fortificazioni sono state utilizzate le stock solutions di FB₁ e FB₂ a 10 ppm, secondo questo schema:





40 µL di St. a 10 ppm in 4 g di matrice	➡	Mangime fortificato a 0,1 ppm
400 µL di St. a 10 ppm in 4 g di matrice	➡	Mangime fortificato a 1 ppm
1500 µL di St. a 10 ppm in 4 g di matrice	➡	Mangime fortificato a 3,75 ppm
2000 µL di St. a 10 ppm in 4 g di matrice	➡	Mangime fortificato a 5 ppm

Per ciascun livello di fortificazione sono stati processati quattro replicati e ogni replicato è stato iniettato due volte.

Precisione

Per valutare la precisione del metodo messo a punto sono stati utilizzati gli stessi valori ottenuti per calcolare l'accuratezza, confrontandoli con quelli degli standard di riferimento.

Di seguito vengono riportate le concentrazioni in matrice rapportate alle corrispondenti concentrazioni di standard:

0,1 ppm in matrice		0,04 ppm standard
1 ppm in matrice		0,4 ppm standard
3,75 ppm in matrice		1,5 ppm standard
5 ppm in matrice		2 ppm standard

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Al fine di valutare la purezza dei solventi utilizzati per l'estrazione e l'analisi cromatografica ed escludere la possibilità di eventuali interferenze derivanti dal processo di estrazione e purificazione del campione è stata eseguita una prova "in bianco". In tale prova sono stati ripercorsi tutti i passaggi della metodica analitica, applicandoli però a 20 g di acqua invece che alla matrice pet foods.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Al fine di valutare la soppressione ionica dovuta ad eventuali interferenti presenti nella matrice un campione di mangime complementare bianco, ed uno di mangime completo bianco, sono stati analizzati mentre in contemporanea veniva infusa nello spettrometro di massa una soluzione standard mista di FB₁ e FB₂ (il procedimento è stato in precedenza già schematizzato nella Figura 13).

3.5 NORME DI SICUREZZA E PRESCRIZIONI AMBIENTALI

Durante il lavoro in laboratorio sono state rispettate le norme dettate dalle legge vigente, il Decreto Legislativo 81/2008 testo unico sulla salute e sicurezza sul lavoro, nonché le norme di sicurezza stabilite all'interno del Servizio di Prove di Igiene e Ispezione degli Alimenti, del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVPA) dell'Università di Bologna.

In linea generale tutte le operazioni di laboratorio sono state svolte sotto cappa aspirante, indossando i dispositivi di protezione individuale (guanti, camice, occhiali da laboratorio).

Tutti i rifiuti tossico-nocivi e di tipo sanitario, prodotti nel corso delle diverse fasi della ricerca, sono stati smaltiti in conformità alla legislazione vigente e in base alle norme di sicurezza stabilite all'interno del Servizio di Prove di Igiene e Ispezione degli Alimenti, del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale (DSPVPA) dell'Università di Bologna.

Tutti i materiali e le attrezzature entrate in contatto con gli standard di fumonisine e rispettivi prodotti idrolizzati sono stati opportunamente decontaminati. La decontaminazione consisteva in porre i materiali in un bagno al 10 % di ipoclorito di sodio per almeno un'ora. Successivamente veniva aggiunto un 5 % di acetone lasciando i materiali a bagno per un'altra ora minimo. Dopo la decontaminazione i materiali da smaltire venivano smaltiti in maniera idonea, mentre la vetreria riutilizzabile veniva accuratamente lavata e risciacquata prima del successivo utilizzo.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

Sono state messe a punto e validate differenti metodiche estrattive, purificative ed analitiche per la determinazione di fumonisine in matrici di origine animale.

Le matrici di origine animale, come già ricordato in precedenza, presentano delle criticità dal punto di vista analitico, in virtù del loro maggior contenuto di composti di interferenti di natura proteica e lipidica. La messa a punto delle procedure estrattive e purificative ottimali, è stata effettuata tenendo in attenta considerazione le caratteristiche di ciascuna matrice e le finalità dell'analisi.

In particolare sono state sviluppate e validate metodiche per la determinazione di FB₁ in latte bovino, per la determinazione di FB₁, FB₂ e relativi idrolizzati, HFB₁ e HFB₂, in fegato di maiale, ed infine per la determinazione di FB₁ e FB₂ in alimenti secchi completi e complementari per cani.

Per l'identificazione e la quantificazione delle fumonisine è stata scelta la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata a spettrometria di massa con triplo quadrupolo (MS-MS). Questa tecnica è caratterizzata, infatti, da elevata sensibilità e specificità, consentendo la rilevazione di concentrazioni di fumonisine anche molto basse e l'identificazione non ambigua dell'analita in matrici complesse, quali quelle di origine animale.

L'identificazione degli analiti è stata effettuata per confronto con i picchi cromatografici, generati dagli ioni precursore/prodotto, ottenuti dall'iniezione nel sistema HPLC-MS/MS delle soluzioni standard.

Condizioni necessarie per l'identificazione degli analiti sono state:

- Corrispondenza del tempo di ritenzione tra picco da determinare e picco dello standard;
- Presenza di due specifiche transizioni di massa (ioni prodotto) per ciascun ione precursore preso in considerazione;

- Il rapporto ionico, tra i due ioni prodotto, del picco da determinare deve corrispondere al rapporto ionico del picco dello standard.

I metodi messi a punto risultano adeguati per l'individuazione di sostanze appartenenti alla categoria B della Direttiva 96/23/CE (tra cui le micotossine) e soddisfano i requisiti richiesti dalla Decisione CE n. 657/2002, decisione che stabilisce le performance di rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati analitici.

La Decisione CE n. 657/2002 stabilisce che per i metodi di conferma sia necessario un numero minimo di 3 punti di identificazione. Le condizioni messe a punto nei metodi analitici sviluppati permettono di superare questo requisito minimo, consentendo il raggiungimento di 4 punti di identificazione. La tecnica HPLC-MS/MS consente infatti di acquisire 1 punto di identificazione per lo ione precursore e 1,5 punti di identificazione per ciascun ione prodotto.

Come per il Capitolo precedente, anche il Capitolo 4 verrà suddiviso in tre differenti Paragrafi che riguarderanno le differenti metodiche analitiche messe a punto. In particolare si troverà il Paragrafo 4.1 relativo alla "Determinazione di FB₁ in latte bovino", il Paragrafo 4.2 sulla "Determinazione di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ in fegato di maiale" ed infine il Paragrafo 4.3 sulla "Determinazione di FB₁ e FB₂ in alimenti secchi completi e complementari per cane".

4.1 DETERMINAZIONE DI FB₁ IN LATTE BOVINO

4.1.1 Messa a punto del metodo

Parametri MS/MS

Per l'ottimizzazione dei parametri di massa è stata effettuata una infusione diretta di una soluzione di fumonisina B₁ standard a 1 ppm in acetonitrile e acqua (50:50, v:v).

Per le caratteristiche della molecola della fumonisina, la modalità di ionizzazione ottimale è risultata l'elettrospray positivo (ESI+) in soluzione acida, sfruttando la protonazione del gruppo amminico.

La Figura 16 riporta la frammentazione totale della molecola.

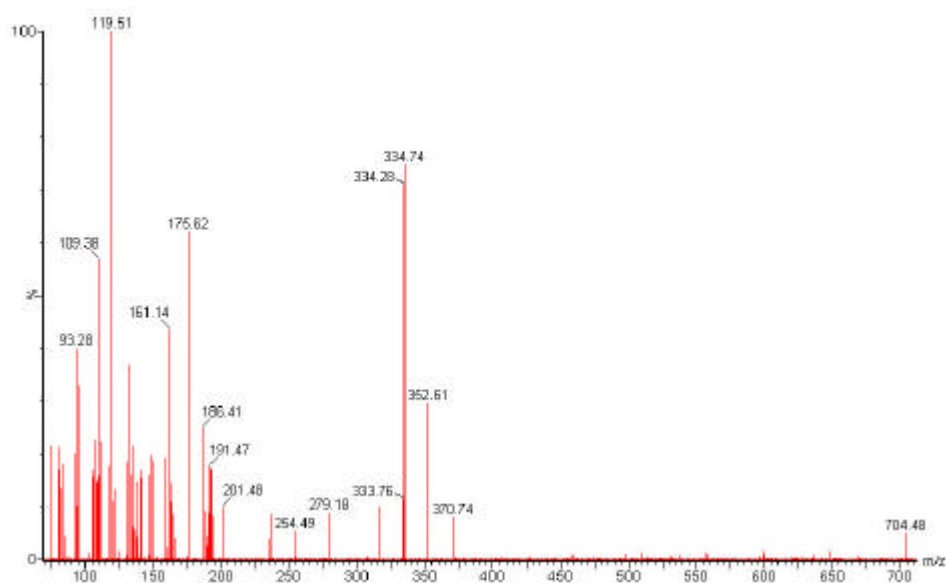


Figura 16: Frammentazione totale della FB₁ in modalità di ionizzazione ESI+.

E' stato quindi messo a punto un metodo di massa in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring) avvalendosi sia dei dati disponibili in letteratura sia dei parametri emersi dal rapporto di auto-tune dello strumento.

Questa modalità permette una identificazione sicura dell'analita, selezionando nel primo quadrupolo (Q1) lo ione precursore e nel terzo (Q3) gli ioni prodotto ottenuti dalla frammentazione avvenuta per collisione con argo n nel secondo quadrupolo (Q2), come si vede nello schema sottostante (Figura 17).

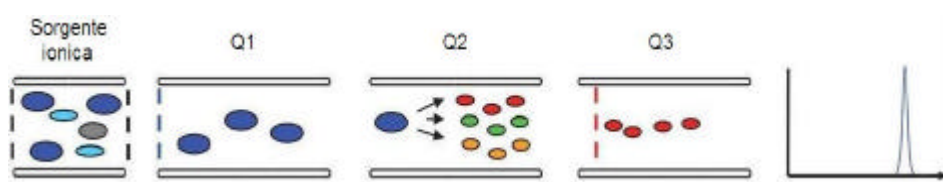


Figura 17: Generazione degli ioni diagnostici utilizzati nella modalità MRM.

I valori utilizzati per le analisi sono quelli riportati nel paragrafo 3.2.3.

I due ioni prodotto della fumonisina B₁, scelti per l'analisi in modalità MRM, sono stati il 352,10 ed il 334,10, derivanti dalla perdita di un gruppo tricarballilico e di una molecola d'acqua dallo ione molecolare 722,15 (ione precursore); come si vede in figura 16, questi due ioni sono infatti i più abbondanti tra quelli ad alto peso molecolare. Inoltre è stato calcolato il rapporto tra l'intensità degli ioni prodotto (ion ratio), che è risultato essere di 1,29.

Infine la transizione utilizzata per la quantificazione ("primary o quantifier ion") è stata 722,15 m/z → 334,10 m/z , essendo quella più intensa.

Condizioni di HPLC

Partendo dai dati raccolti in letteratura si è deciso di provare due diverse colonne a fase inversa: Waters XTerra C₁₈ (5 µm - 2,1 x 150 mm) e Waters XTerra RP8 (3,5 µm - 2,1 x 100 mm). Su entrambe le colonne sono state testate differenti condizioni analitiche, sia isocratiche che programmate.

I parametri cromatografici ottimali per la fumonisina B₁ standard per ottenere un picco con una buona simmetria, un breve tempo di ritenzione e una buona ionizzazione prevedevano una fase mobile costituita da acqua:acetonitrile = 90:10 con 0,3 % acido formico (A) e acetonitrile con 0,3 % di acido formico (B) in condizioni isocratiche e, come fase stazionaria, una colonna Waters XTerra MS C₁₈ con un flusso di 300 µL/min, termostata a 35 °C.

E' stato necessario utilizzare una fase mobile acida per ottimizzare la ionizzazione della fumonisina B₁, fondamentale nell'analisi tramite spettrometria di massa.

Nella figura seguente viene riportato un cromatogramma di una soluzione standard di FB₁ a 50 ppb ottenuto nelle condizioni analitiche messe a punto (Figura 18).

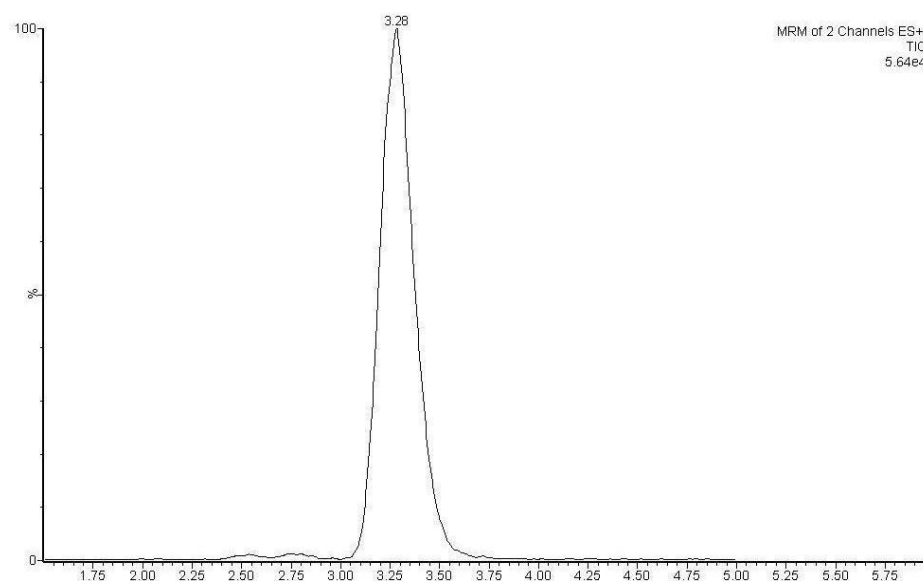


Figura 18: Cromatogramma di uno standard FB₁ a 50 ppb

Per l'analisi dei campioni di latte è stato deciso di impostare un gradiente in modo da portare la fase organica fino all'80 %, così da eluire completamente eventuali interferenti presenti nell'estratto purificato.

Durante la messa a punto della procedura di estrazione si sono verificati importanti problemi di trascinamento della fumonisina B₁ da un campione al successivo e differenti soluzioni di lavaggio dell'ago dell'HPLC, come pure differenti fasi mobili, sono state testate al fine di ridurre tale problema. L'aggiunta di acido formico nella soluzione di lavaggio dell'ago (metanolo con 1 % di acido formico), come pure nelle fasi mobili cromatografiche (contenenti una percentuale di acido dello 0,03 %), ha consentito di contrastare il fenomeno del trascinamento

Metodica estrattiva

Nonostante la tecnica HPLC-MS/MS sia altamente selettiva e sensibile non va trascurata la fase di purificazione dell'analita, in considerazione anche della complessità della matrice in oggetto e del suo possibile effetto negativo sulla ionizzazione degli analiti (vedi la sezione "Valutazione della soppressione ionica della matrice" del paragrafo 4.1.1).

Tra i pochissimi lavori riportati in letteratura, riguardanti la determinazione di FB₁ nel latte, alcuni utilizzano colonne ad immunoaffinità (Scott P.M. *et al.*, 1994; Scarano G. *et al.*, 2001; Spotti M. *et al.* 2001), altri cartucce SPE (Maragos C.M. e Richard J.L., 1994; Sørensen L.K. e Elbæk T.H., 2005), come già descritto nel paragrafo 1.2.7.

Le colonne ad immunoaffinità, sfruttando la specificità degli anticorpi monoclonali, permettono un clean-up altamente selettivo e allo stesso tempo molto rapido dell'analita dalla matrice, a differenza di altre tecniche di purificazione, che risultano più indaginose, come appare chiaro dai lavori presi in esame.

Come detto, il vantaggio nell'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità è la loro capacità di essere molto selettive verso la molecola oggetto di analisi. Va però sottolineato che queste colonnine vengono principalmente commercializzate per la purificazione di matrici vegetali, quali cereali ed in particolar modo mais, e non matrici di origine animale, spesso più complesse, come il latte.

I lavori pubblicati in letteratura che utilizzano le colonnine di immunoaffinità per l'estrazione di micotossine dal latte (Scott. P.M. *et al.*, 1994; Scarano G. *et al.*, 2001) suggeriscono un passaggio di centrifugazione per eliminare il più possibile la componente grassa e la diluizione del latte prima del caricamento sulle colonnine, al fine di impedire un intasamento del sistema.

Sia la centrifugazione del latte che il caricamento, il lavaggio e l'eluizione delle colonnine ad immunoaffinità sono stati passaggi che hanno portato a risultati soddisfacenti fin dalle prime prove.

Durante la messa a punto sono state inoltre valutate due diverse marche di colonnine ad immunoaffinità (Vicam FumoniTest[®] e R-Biopharm Rhône Fumoniprep[®]): i risultati, emersi dalle prove effettuate utilizzando la medesima metodica su ambedue le colonnine, hanno evidenziato prestazioni soddisfacenti per entrambi i prodotti. Pertanto la scelta di utilizzare le Vicam è stata determinata principalmente dal fattore economico. Il punto più critico della messa a punto del metodo di estrazione è stato la desolvatazione successiva all'eluizione dalla colonnina ad immunoaffinità. Nonostante numerosi lavori riportino buoni recuperi desolvando completamente l'eluato sotto azoto e riprendendo il residuo in volumi di metanolo nell'ordine di 0,2 ml (Scarano, G. *et al.*, 2001; Pagliuca G. *et al.*, 2005), le analisi effettuate utilizzando questo passaggio hanno portato ad una perdita di più del 50 % dell'analita. Per questo motivo sono state effettuate numerose prove modificando vari parametri:

- il solvente utilizzato per risolubilizzare l'analita (metanolo, acqua, acetonitrile, miscele di acqua e metanolo, miscele di acqua e acetonitrile acidificate con acido formico);
- la temperatura durante la fase di evaporazione;
- il materiale delle provette (differenti tipi di plastiche, vetro);
- la tecnica di desolvatazione (sotto flusso di azoto ed evaporatore rotante).

In nessun caso, però, è stato riscontrato un aumento significativo dei recuperi ottenuti: pertanto si è ritenuto opportuno, invece di far evaporare completamente il solvente, ridurre soltanto parzialmente il volume, concentrando da 3 ml iniziali a 1 ml. In questo modo si è avuto un netto incremento dei recuperi, a scapito di una lieve perdita di sensibilità, dovuta alla maggior diluizione finale (passando da 0,2 ml inizialmente ipotizzati a 1 ml). Durante queste prove, inoltre, è risultata essere determinante anche la composizione della fase in cui viene solubilizzato l'analita al momento dell'analisi in HPLC-MS/MS: infatti, analizzando soluzioni standard di fumonisina aventi uguali concentrazioni ma solubilizzate in solventi differenti (metanolo, metanolo:acqua = 50:50, metanolo:acqua = 90:10), si ottiene una risposta quantitativa via via crescente, come si può vedere nella Figura 19.

Confrontando i dati ottenuti è quindi emerso che concentrazioni di metanolo nel solvente maggiori del 20 % riducono sensibilmente l'entità della ionizzazione.

Per questa ragione tutte le soluzioni standard utilizzate presentavano percentuali di metanolo inferiori al 20 %; per quanto riguarda invece i campioni, l'evaporazione sotto azoto per ridurre il volume da 3 ml a 1 ml eliminava tutto il metanolo presente, data la sua maggiore volatilità rispetto all'acqua.

La fase di estrazione messa a punto, tenendo conto di tutti gli aspetti discussi, consente una purificazione dell'analita selettiva, rapida e non particolarmente complessa.

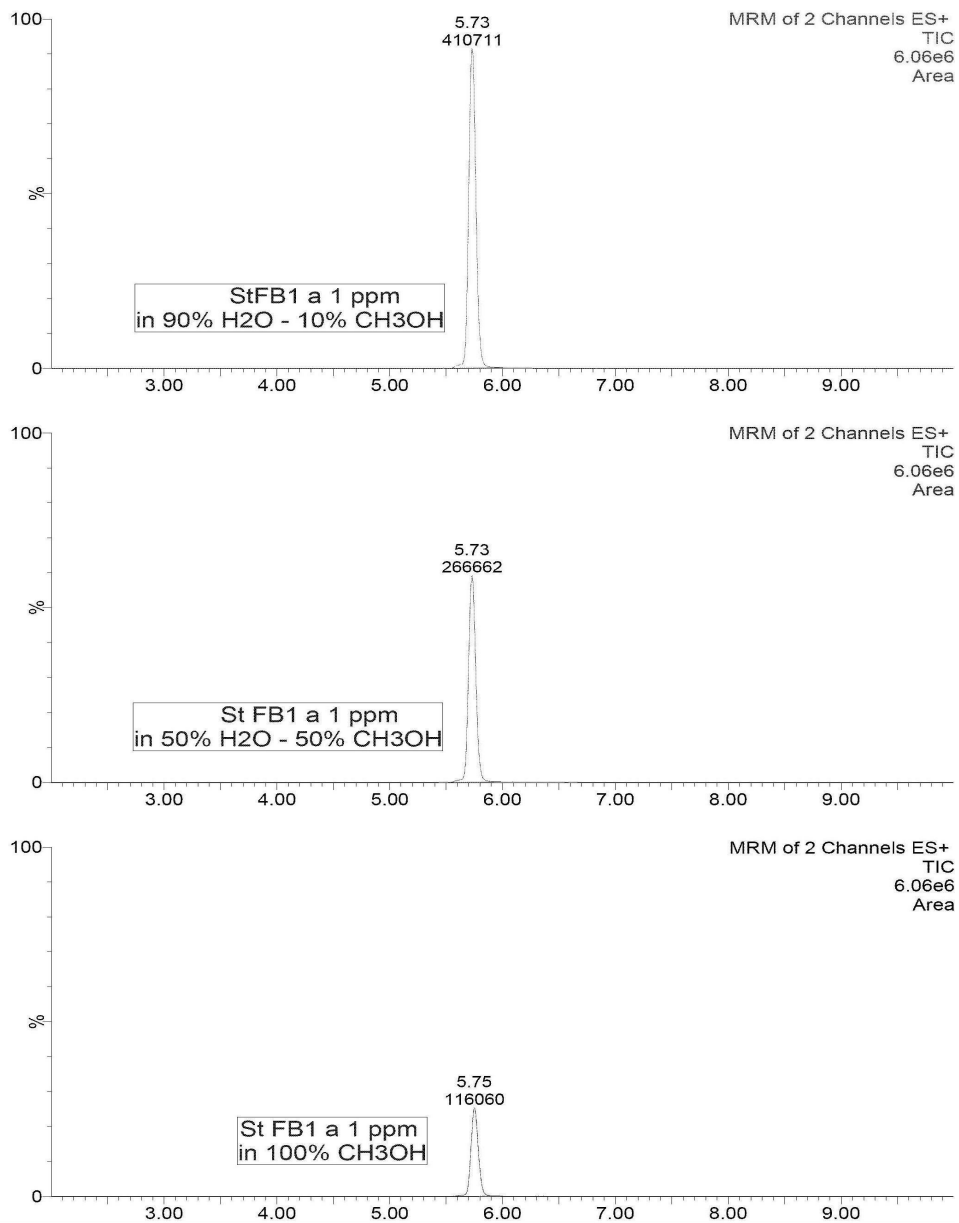


Figura 19: *Variazione della risposta al variare della composizione del solvente utilizzato.*

4.1.2 Validazione del metodo

Verifica della linearità della risposta strumentale

Per accertare la linearità tra la risposta strumentale e la concentrazione è stata costruita una curva di taratura utilizzando le soluzioni standard a titolo noto precedentemente preparate (vedi paragrafo 3.2.5).

Le quattro diverse soluzioni sono state iniettate sei volte ciascuna: in Tabella 17 sono riportati i rispettivi punti area.

Tabella 17: Dati relativi alla curva di taratura della FB_1 standard.

<i>ppb</i>	<i>PUNTI AREA</i>	<i>MEDIA</i>
0,5	52.250	51.415
	53.104	
	60.508	
	53.358	
	42.669	
	46.598	
2,5	307.221	291.246
	322.324	
	310.276	
	304.853	
	288.676	
	214.123	
5	674.212	582.114
	690.537	
	631.003	
	618.633	
	491.241	
	387.057	
50	6.925.104	6.829.705
	7.321.501	
	7.191.920	
	6.810.111	
	6.421.963	
	6.307.630	

L'elaborazione dei dati ottenuti ha evidenziato una linearità di risposta dello strumento più che soddisfacente (vedi Figura 20), con un coefficiente di regressione (r^2) maggiore di 0,99.

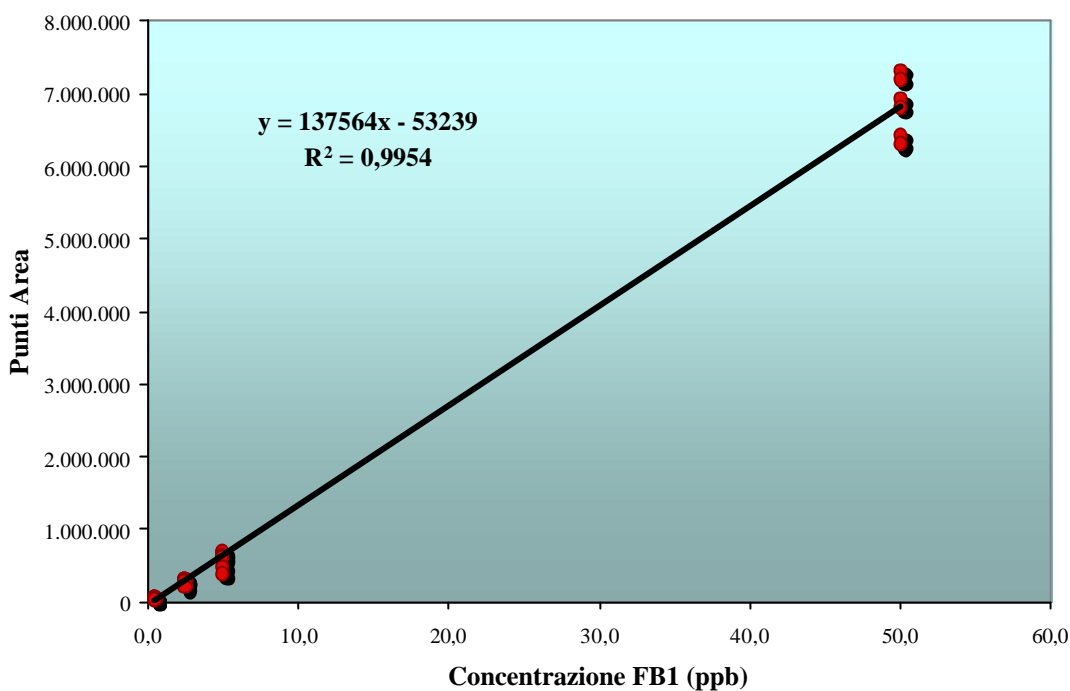


Figura 20: Curva di taratura della FB₁ standard

Accuratezza

Confrontando i dati dei campioni di latte fortificati con FB₁ (come descritto nel paragrafo 3.2.5) con quelli ottenuti iniettando i relativi standard, sono state calcolate le percentuali di recupero dell'analita (vedi Tabella 18). I valori sono risultati molto soddisfacenti anche a concentrazioni basse.

Il recupero della FB₁ è variato tra 76,3 % e 94,4 %: ciò evidenzia che le perdite di analita nelle varie fasi del metodo sono ridotte.

In particolare, il recupero medio è stato dell'**84,3 %**, risultato superiore alla maggior parte dei lavori presenti in letteratura (Maragos C.M. e Richard J.L., 1994; Scott P.M. *et al.*, 1994; Spotti M. *et al.*, 2001; Scarano G. *et al.*, 2001; Sørensen L.K. e Elbæk T.H., 2005). Tale valore rientra ampiamente in quelli (compresi tra 70 e 110 %) suggeriti dal progetto europeo *Standard, Measuring and Testing (SMT)* per quanto riguarda le specifiche dei metodi per la determinazione delle micotossine in differenti matrici alimentari (Gilbert J. e Anklam E., 2002).

Tabella 18: Percentuali di recupero di FB_1 .

<i>ppb</i>	<i>PUNTI AREA</i>	<i>MEDIA</i>	<i>RECUPERO</i>
<i>0,1</i>	53.665	48.241	94,4 %
	46.585		
	45.427		
	50.989		
	50.615		
	41.900		
	47.818		
	48.928		
<i>0,5</i>	214.796	222.263	76,3%
	214.989		
	211.182		
	234.300		
	212.563		
	241.801		
	217.494		
	230.981		
<i>1</i>	529.046	495.687	85,2 %
	546.888		
	499.251		
	520.458		
	492.143		
	474.517		
	437.277		
	465.913		
<i>10</i>	5.961.347	5.546.028	81,2 %
	5.546.030		
	6.069.050		
	6.075.773		
	5.250.758		
	5.435.138		
	4.942.550		
	5.087.580		

I valori ottenuti dall'analisi dei campioni di latte fortificato prove effettuate sono stati poi utilizzati per la costruzione di una retta di taratura in matrice, il cui coefficiente di regressione è risultato soddisfacente ($r^2 > 0,99$) e simile a quello ottenuto con le soluzioni standard (vedi Figura 21). Questo dato sottolinea ulteriormente l'efficienza della metodica.

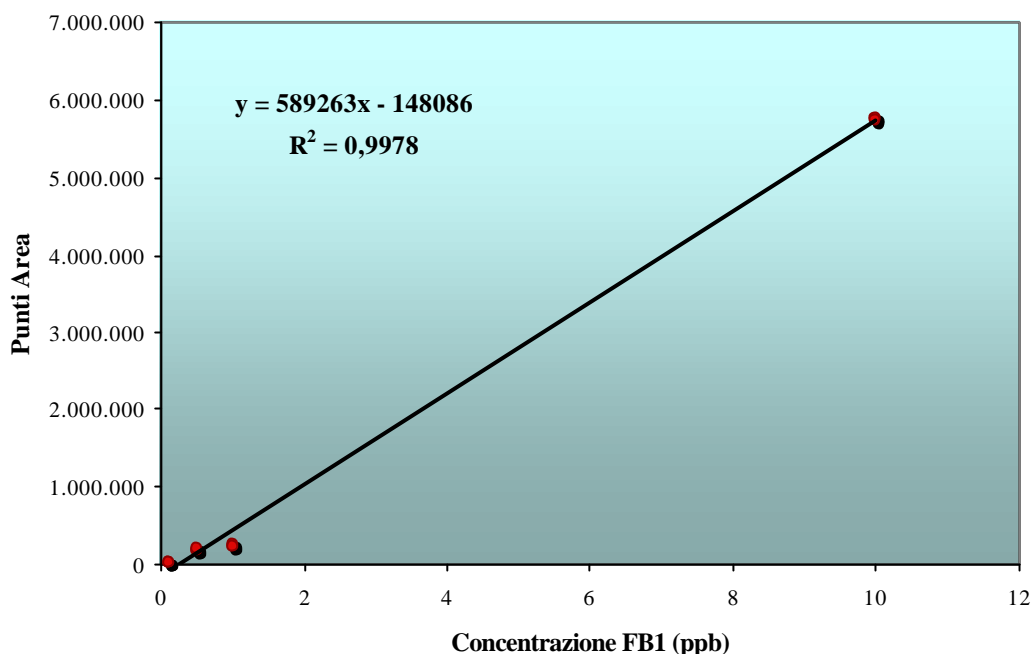


Figura 21: Curva di taratura della FB₁ in matrice.

Precisione

I punti area ottenuti dall'analisi dei campioni fortificati sono stati utilizzati per determinare la precisione del metodo, espressa come deviazione standard relativa percentuale (%RSD) (vedi Tabella 19). Il valore medio di %RSD è stato **7,1 %**.

Tabella 19: Deviazione standard relativa percentuale.

<i>ppb</i>	<i>MEDIA</i>	<i>DEV. STD.</i>	<i>%RSD</i>
0,1	48.241	3.667	7,6
0,5	222.263	11.655	5,2
1	495.687	36.094	7,3
10	5.546.028	447.296	8,1

In questa prova è stata valutata anche la capacità di ottenere risultati ripetibili all'interno della stessa giornata e in tre giornate consecutive, come riportato nel paragrafo 3.2.5. Elaborando i risultati si sono ottenuti i valori di deviazione standard relativa riportati nelle Tabelle 20 e 21.

Confrontando i valori intra ed inter-giornalieri si evidenziano valori di deviazione standard relativa percentuale media molto simili, pari rispettivamente al **5,3 %** e al **5,3 %**: possiamo quindi concludere che la metodica mostra una buona ripetibilità.

Tabella 20: Variazioni intra-giornaliere.

<i>ppb</i>	<i>MEDIA intra-giornal.</i>	<i>DEV. STD.</i>	<i>%RSD</i>
0,1	47.613	3452	7,3
0,5	218.817	10.470	4,8
1	467.463	22.894	4,9
10	5.179.007	212.149	4,1

Tabella 21: Variazioni inter-giornaliere.

<i>ppb</i>	<i>MEDIA inter-giornal.</i>	<i>DEV. STD.</i>	<i>%RSD</i>
0,1	48.577	1.776	3,6
0,5	223.412	4.243	1,9
1	505.095	35.492	7,0
10	5.737.588	486.923	8,5

I valori di deviazione standard relativa percentuale (%RSD) ottenuti rientrano all'interno dei criteri di rendimento suggeriti dal progetto europeo *Standard, Measuring and Testing (SMT)* per quanto riguarda le specifiche dei metodi per la determinazione delle micotossine in differenti matrici alimentari (Gilbert J. e Anklam E., 2002). Secondo tale progetto la ripetibilità intralaboratorio, espressa come %RSD, deve essere inferiore al 20 %.

La Decisione CE n. 657/2002, relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, per concentrazioni inferiori a 10 ppb non stabilisce uno specifico valore di RSD %, bensì suggerisce che esso debba essere il più basso possibile.

I valori da noi ottenuti sono tutti ampiamente inferiori al 20 % e ciò attesta e conferma la buona ripetibilità della metodica messa a punto.

Limiti di quantificazione (LOQ) e di rilevazione (LOD)

Il limite di quantificazione (LOQ) per la metodica sviluppata secondo le modalità precedentemente descritte è risultato essere di **0,1 ng/g (ppb)**. Questo valore corrisponde al più basso livello di fortificazione dei campioni utilizzati per le prove di precisione ed accuratezza (vedi Figura 22).

Il limite di rilevazione (LOD), calcolato invece come la concentrazione di analita a cui corrisponde un segnale pari a 3 volte il rumore di fondo, è di **0,003 ng/g (ppb)**.

Confrontando questi valori con quelli dei pochi lavori disponibili che hanno valutato la presenza di FB_i nel latte, va evidenziato come questi avessero LOQ sensibilmente più elevati, compresi tra 1 e 50 ppb (Maragos C.M. e Richard J.L., 1994; Richard J.L. *et al.*, 1996; Scott P.M. *et al.*, 1994; Spotti M. *et al.*, 2001; Scarano G. *et al.*, 2001). Soltanto l'unico lavoro recente (Sørensen L.K. e Elbæk T.H., 2005) presenta un limite di quantificazione comparabile con quello della metodica messa a punto (0,2 ppb).

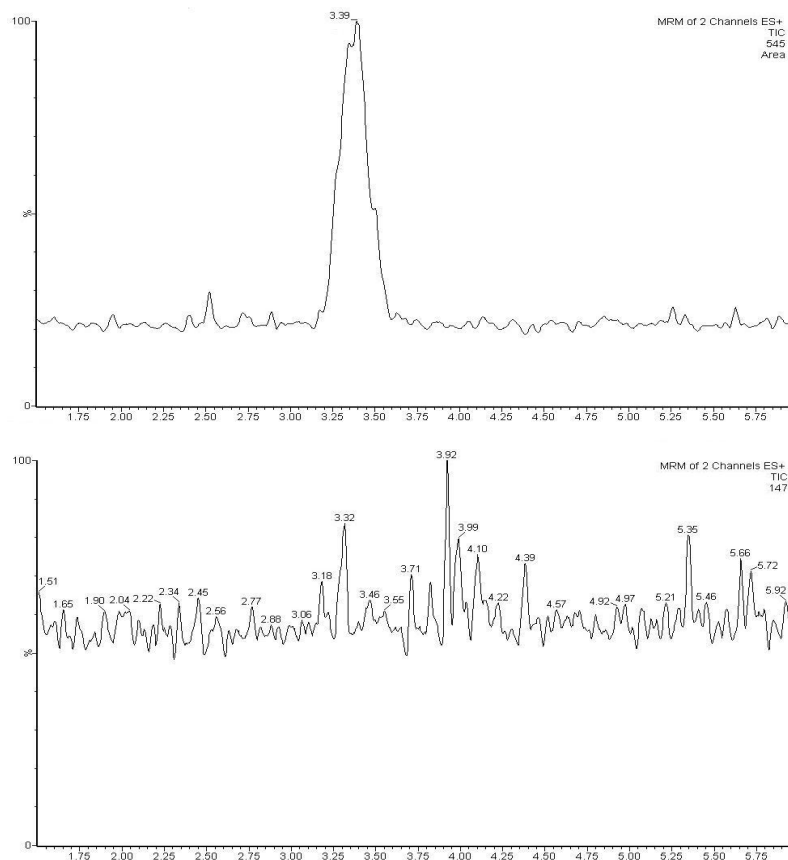


Figura 22: Cromatogrammi di latte fortificato a 0,1 ppb e latte non fortificato (bianco).

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Nei cromatogrammi ottenuti dalla prova cosiddetta in “bianco” non si nota alcun picco interferente: ciò conferma la purezza dei solventi utilizzati per l'estrazione e per l'analisi cromatografica ed esclude inoltre un effetto di contaminazione crociata dovuta alle colonnine di immunoaffinità.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Al fine di valutare l'effetto di soppressione ionica dato dalla matrice è stata condotta una prova schematizzata in precedenza nella Figura 13.

Dal cromatogramma riportato qui di seguito si può notare un leggero effetto di soppressione del segnale tra 1,00 e 1,80 minuti (vedi Figura 23). La stabilità della corrente ionica registrata al tempo di ritenzione specifico della FB₁ ($T_R = 3,28$ minuti) prova invece l'assenza di interferenze nella ionizzazione in grado di disturbare la determinazione analitica della fumonisina B₁.

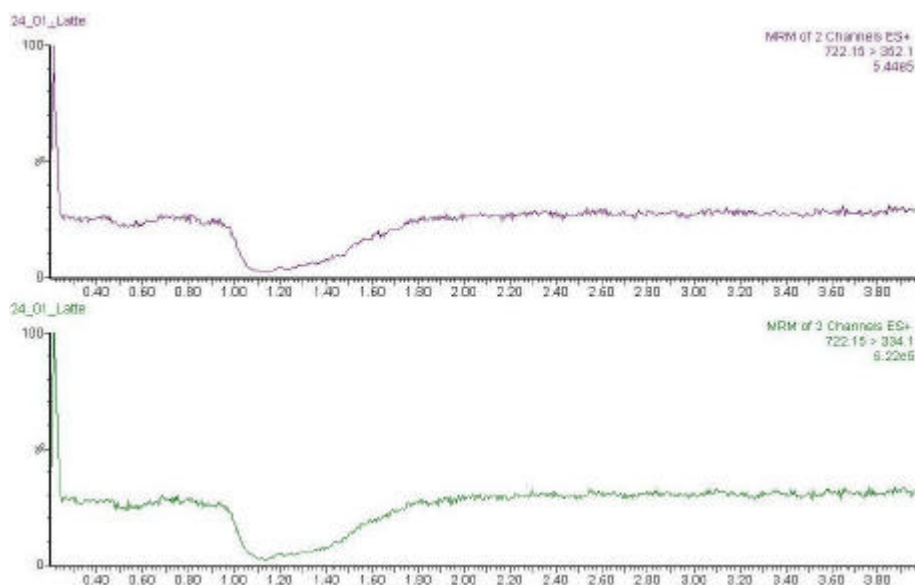


Figura 23: Soppressione ionica della matrice.

4.1.3 Analisi dei campioni

Allo scopo di verificare nella pratica l'efficienza della metodica messa a punto, sono stati analizzati alcuni campioni di diversi tipi di latte commerciale (vedi paragrafo 3.2.1).

Quasi tutti i campioni di latte presi in esame sono risultati essere contaminati con concentrazioni di fumonisina comprese tra 0,26 e 0,43 ppb.

Nella Tabella 22 sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 22: *Dati ottenuti dall'analisi dei campioni di latte.*

<i>CAMPIONE</i>	<i>CONCENTRAZIONE FB₁</i> <i>(ppb)</i>
Crudo A	0,32
Fresco intero A	Non rilevata
Fresco intero B	0,26
Fresco intero C	0,38
Alta Qualità A	Non rilevata
Alta Qualità B	0,26
Alta Qualità C	0,32
Alta Qualità D	0,43
Biologico A	0,28
Biologico B	0,38

Questi dati acquistano ancora più valore se confrontati con i risultati ottenuti dai precedenti lavori, sia su latte commerciale che su latte proveniente da bovine alimentate con mangimi contaminati sperimentalmente: soltanto in uno studio americano è stato rilevato un campione contaminato su 155 presi in esame (Maragos C.M. e Richard J.L., 1994).

Va però considerato che le metodiche in questione hanno quasi tutte limiti di quantificazione decisamente più alti (tra 1 e 50 ppb) di quella messa a punto in questo lavoro, pertanto non sarebbero in grado di rilevare le concentrazioni di questi campioni.

Questi dati preliminari e statisticamente non significativi, che devono essere confermati dall'analisi di un numero più cospicuo di campioni, mettono comunque in evidenza una possibile contaminazione del latte da parte della fumonisina B₁.

La possibile presenza di fumonisina B₁ nel latte è da tenere in considerazione anche alla luce della possibile interazione tossicologica con effetti sinergici tra le diverse micotossine contemporaneamente presenti in un alimento (Gelderblom W.C.A. *et al.*, 2002).

Infine, è interessante notare come il livello medio di contaminazione rilevato nei campioni analizzati (**0,26 ppb**) risulti in accordo con il livello medio determinato mediante una simulazione statistica effettuata con il metodo "Monte Carlo" da Coffey R. e collaboratori (2009). In tale studio è stato infatti calcolato un valore medio di contaminazione di FB₁ nel latte di **0,36 ppb**.

Nella Figura 24 vengono riportati i cromatogrammi di due campioni di latte analizzati.

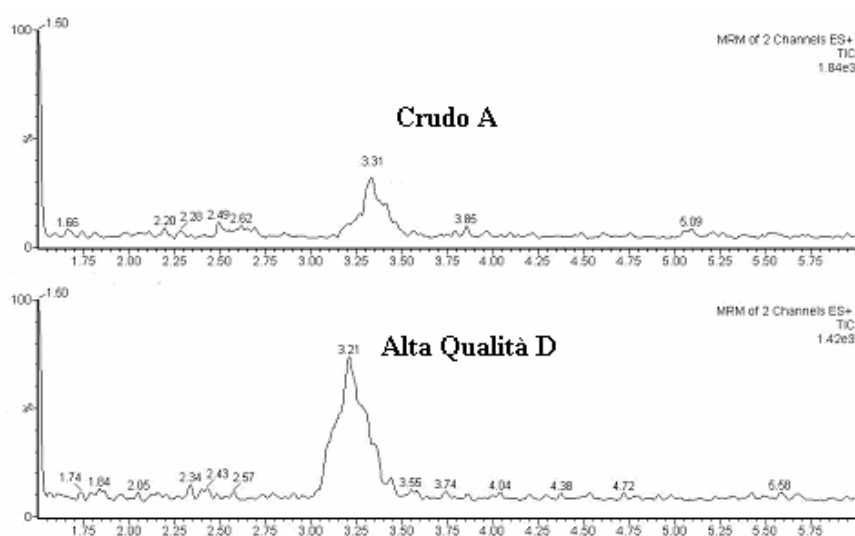


Figura 24: Cromatogrammi dei campioni di latte "Crudo A" e "Alta Qualità D".

Durante l'analisi dei campioni si è osservato anche un picco attribuibile presumibilmente alla fumonisina B₂, il che fa supporre una contaminazione dei campioni di latte presi in esame anche da parte di questa micotossina. Sarebbe pertanto utile rendere la metodica applicabile anche alla determinazione di FB₂ ed FB₃, cosa peraltro di facile realizzazione dal momento che le colonnine ad immunoaffinità utilizzate sono specifiche anche per queste molecole.

4.2 DETERMINAZIONE DI FB₁, FB₂, HFB₁ E HFB₂ IN FEGATO DI MAIALE

4.2.1 Messa a punto del metodo

Parametri MS/MS

L'ottimizzazione dei parametri di massa è stata effettuata mediante infusione diretta di soluzioni standard di tutti gli analiti presi in considerazione. La modalità di ionizzazione ottimale è risultata l'elettrospray positivo (ESI+) in soluzione acida.

Per quanto riguarda la fumonisina B₁ vale quanto detto nella sezione "Parametri MS/MS" nel paragrafo 4.1.1, relativo alla messa a punto della metodica analitica per la determinazione della FB₁ nel latte.

I parametri di massa della fumonisina marcata (FB₁¹³C₃₄) sono stati invece determinati mediante infusione diretta di una soluzione standard a 1,25 ppm in acetonitrile e acqua (50:50, v:v). Per la fumonisina B₂ è stata infusa una soluzione standard a 0,5 ppm in acetonitrile e acqua (50:50, v:v).

Le Figure 25 e 26 riportano la frammentazione totale delle molecole di FB₁¹³C₃₄ e FB₂.

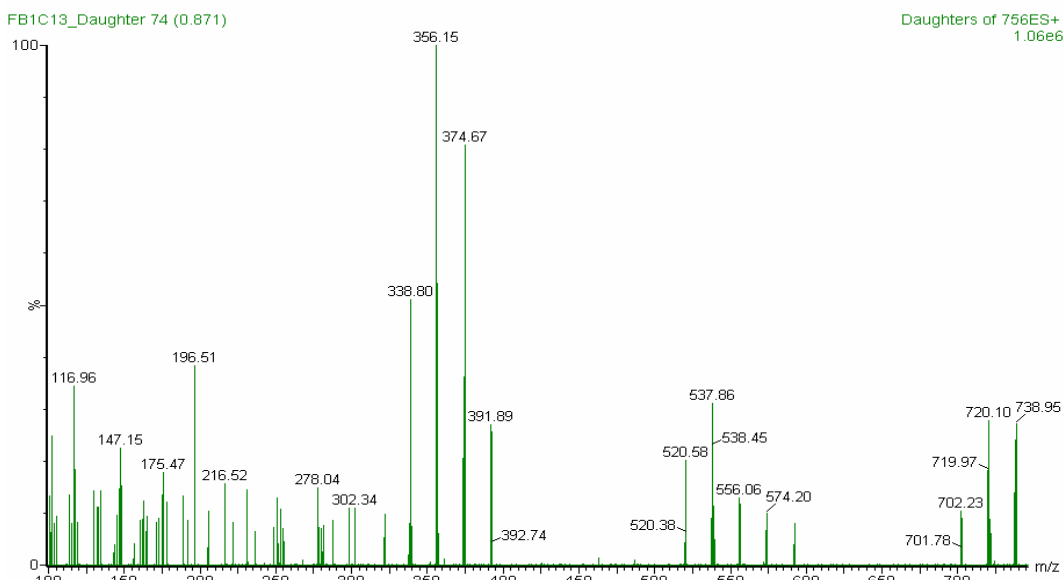


Figura 25: Frammentazione totale della FB₁¹³C₃₄ in modalità di ionizzazione ESI+.

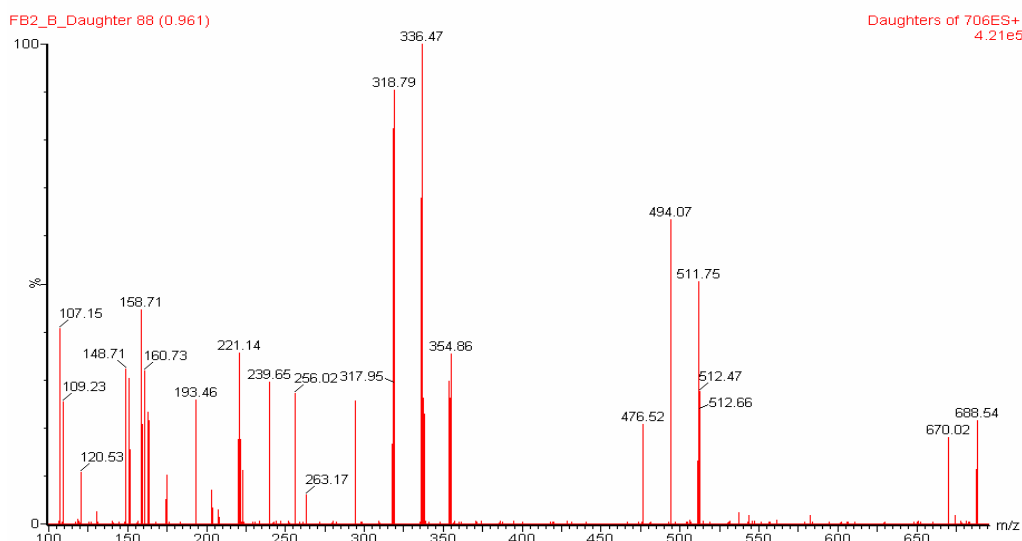


Figura 26: Frammentazione totale della FB₂ in modalità di ionizzazione ESI+.

L'ottimizzazione dei parametri di massa degli idrolizzati HFB₁ e HFB₂ è stata effettuata per infusione diretta delle soluzioni standard ottenute come descritto nel paragrafo 3.3.5 e purificate su cartuccia Waters Oasis[®] HLB. La scelta di effettuare questo passaggio di purificazione su colonnina SPE è stata dettata dalla presenza di sali derivanti dalla reazione di idrolisi. Questi sali mostravano infatti un forte effetto di soppressione ionica, impedendo la ionizzazione degli analiti e l'ottimizzazione dei parametri di massa. Le Figure 27 e 28 riportano la frammentazione totale delle molecole di HFB₁ e HFB₂.

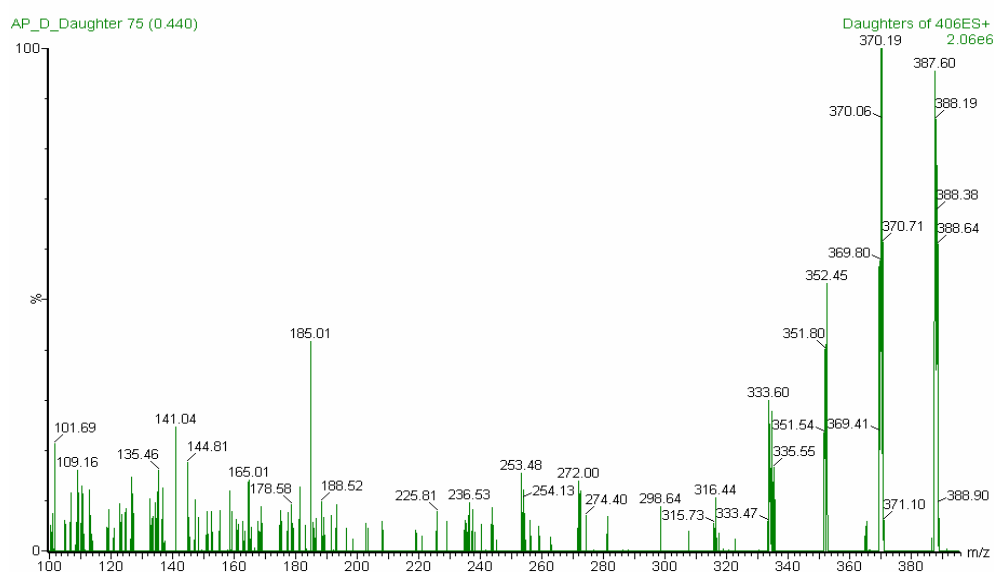


Figura 27: Frammentazione totale della HFB₁ in modalità di ionizzazione ESI+.

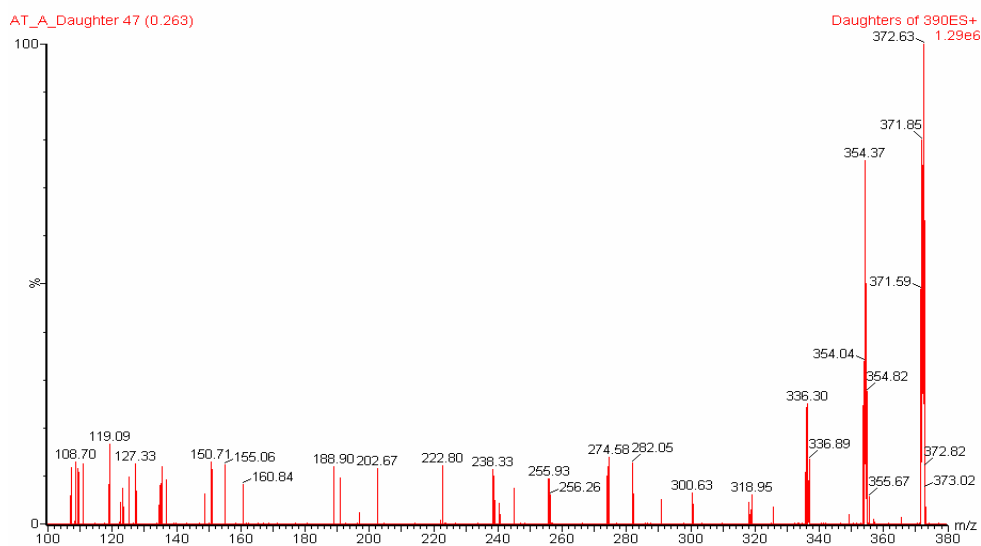


Figura 28: Frammentazione totale della HFB₂ in modalità di ionizzazione ESI+.

Per ciascun analita è stato messo a punto un metodo di massa in modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring), avvalendosi sia dei dati disponibili in letteratura sia dei parametri emersi dal rapporto di auto-tune dello strumento.

I valori utilizzati per le analisi sono quelli riportati nella Tabella 14 del paragrafo 3.3.3. Gli spettri di frammentazione delle fumonisine B₁, B₁ marcata e B₂ sono caratterizzati da ioni prodotto derivanti dalla perdita dei gruppi tricarballylici e dalla perdita di molecole di acqua (vedi Tabella 23).

Tabella 23: Frammentazione delle fumonisine B₁, B₁ marcata e B₂.

ANALITA	IONE PRECURSORE	IONI PRODOTTO (m/z)		ION RATIO
	(m/z) [M+H] ⁺	[M+H-2 TCA-H ₂ O] ⁺	[M+H-2 TCA-2 H ₂ O] ⁺	
FB ₁	722,15	352,10	334,10	1,29
FB ₁ ¹³ C ₃₄	756,45	374,28	356,34	1,19
FB ₂	706,32	336,33	318,34	1,60

Le transizioni utilizzate per la quantificazione (“primary o quantifier ions”) sono riportate in Tabella 23 con il colore rosso. Nella tabella si trova anche il rapporto tra l’intensità degli ioni prodotto (Ion Ratio).

Per quanto riguarda gli idrolizzati HFB₁ e HFB₂, gli spettri sono caratterizzati da ioni prodotto che originano invece dalla perdita di molecole d’acqua (vedi Tabella 24).

Tabella 24: Frammentazione degli idrolizzati HFB₁ e HFB₂.

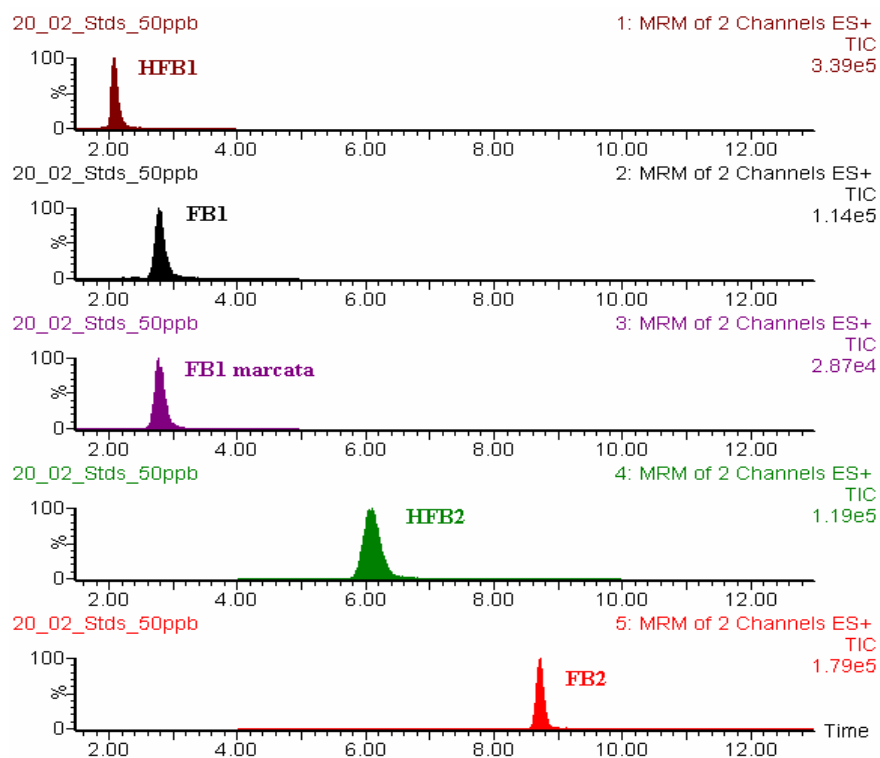
ANALITA	IONE		IONI PRODOTTO (m/z)		ION RATIO
	PRECURSORE (m/z)	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-2 H ₂ O] ⁺	
HFB ₁	406,10		370,12	388,12	1,20
HFB ₂	390,15		372,24	354,24	1,09

Anche in questa tabella le transizioni utilizzate per la quantificazione (“primary o quantifier ions”) sono riportate in colore rosso e viene anche riportato il rapporto tra l’intensità degli ioni prodotto (Ion Ratio).

Condizioni di HPLC

I parametri cromatografici riportati nel paragrafo 3.3.3 hanno permesso una separazione ottimale di tutti gli analiti presi in esame in un tempo d’analisi di circa 9 minuti. L’utilizzo di fasi mobili acide ha consentito una buona ionizzazione degli analiti.

In Figura 29 vengono riportati i cromatogrammi della soluzione standard di riferimento a 50 ppb di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂, con 30 ppb di Standard Interno (FB₁¹³C₃₄).

**Figura 29:** Cromatogrammi dello standard di riferimento a 50 ppb.

I tempi di ritenzione caratteristici di ciascun analita nelle condizioni cromatografiche sviluppate sono riportati nella seguente tabella (vedi Tabella 25).

Tabella 25: Tempi di ritenzione (T_R) nelle condizioni cromatografiche sviluppate.

ANALITA	TEMPO DI RITENZIONE (T_R)
	(min)
HFB ₁	2,07
FB ₁	2,80
FB ₁ ¹³ C ₃₄	2,80
HFB ₂	6,10
FB ₂	8,80

La scelta di deviare verso lo scarico la parte iniziale e finale del programma cromatografico è stata dettata dall'esigenza di non inserire in sorgente composti interferenti, derivanti dalla matrice, che potessero sporcare il capillary e il cono, diminuendo quindi l'efficacia della sorgente stessa.

Metodica estrattiva

Nonostante l'elevata sensibilità e specificità della spettrometria di massa la purificazione degli analiti rappresenta una fase di cruciale importanza nella preparazione del campione.

I pochi lavori pubblicati in letteratura per la determinazione di fumonisine in tessuti di derivazione animale prevedono un passaggio purificativo su cartucce a scambio anionico (cartucce SAX) (Thakur R. A. e Smith S. J., 1996; Meyer K. *et al.*, 2003; Fodor J. *et al.*, 2006) o su cartucce di immunoaffinità (Tardieu D. *et al.*, 2008), come già detto in precedenza nel paragrafo 1.2.7.

Le colonnine di immunoaffinità, sfruttando la specificità degli anticorpi monoclonali, permettono un clean-up altamente selettivo per le fumonisine, ma non sono adatte alla purificazione dei composti di idrolisi. Lo stesso dicasi per le cartucce a scambio anionico. Queste cartucce sono infatti indicate per la purificazione di composti debolmente anionici, come la fumonisina B₁, ma non risultano efficaci per la purificazione dei prodotti di idrolisi. Nei prodotti di idrolisi mancano infatti i gruppi

anionici carbossilici responsabili dell'interazione con le cariche ioniche della fase stazionaria.

Thakur R. A. e Smith J. S. (1996) hanno sviluppato una metodica per la determinazione di FB₁, FB₂ e rispettivi prodotti d'idrolisi, ma il procedimento analitico è piuttosto complicato e lungo. Il campione deve essere infatti caricato su una colonnina SAX e le soluzioni di lavaggio che derivano da questo passaggio purificativo devono essere ulteriormente purificate su un altro tipo di colonnina impaccata con un differente polimero (Amberlite XAD), in grado di trattenere i prodotti di idrolisi.

Il metodo sviluppato e messo a punto da Pagliuca e collaboratori (2005), che si basa su un passaggio purificativo su cartucce di tipo Oasis HLB[®] (Waters Corporation, Milford, USA), consente invece la determinazione contemporanea della FB₁ e della HFB₁ dal fegato di maiale. Il polimero che caratterizza la fase solida di questo tipo di cartucce presenta sia una porzione idrofila che una lipofila, ed ha dimostrato una efficace capacità di legame non solo per la fumonisina B₁, ma anche per il suo prodotto di idrolisi HFB₁ (Pagliuca G. *et al.*, 2005).

Per tale motivo si è deciso di utilizzare le cartucce Oasis HLB[®] anche nel presente lavoro, applicando ed adattando la metodica messa a punto da Pagliuca e collaboratori (2005) alla estrazione, separazione e purificazione non solo di FB₁ e HFB₂, ma anche di FB₂, HFB₂ e fumonisina B₁ marcata.

La procedura analitica messa a punto ed elencata nel dettaglio nel paragrafo 3.3.4, consente un'estrazione e purificazione degli analiti presi in esame efficace, selettiva, rapida e non particolarmente complessa.

Come già visto in precedenza in riferimento alla metodica analitica per la determinazione della FB₁ nel latte, un punto critico del procedimento estrattivo è risultato essere la fase di desolvatazione del campione prima dell'iniezione nel sistema HPLC-MS/MS. Anche in questo caso sono state ottenute percentuali di recupero maggiori evitando di portare totalmente a secco il campione eluito dalla cartuccia Oasis HLB[®]. I 2 mL di metanolo eluiti dalla colonnina sono stati infatti posti in un matraccio graduato da 1 mL e lentamente concentrati sotto flusso di azoto. Il campione è stato quindi portato al volume finale di 1 mL per aggiunta di soluzione mobile alle condizioni iniziali del programma cromatografico impiegato.

4.2.2 Validazione del metodo

Verifica della linearità della risposta strumentale

Per verificare la linearità della risposta strumentale sono state iniettate nel sistema HPLC-MS/MS le soluzioni standard di riferimento di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ alle seguenti concentrazioni: 0 ppb – 5 ppb – 10 ppb – 30 ppb – 50 ppb – 80 ppb – 100 ppb tutte contenenti 30 ppb di standard interno FB₁ ¹³C₃₄.

Queste soluzioni sono quelle preparate come indicato nella sezione “Verifica della linearità della risposta strumentale” del paragrafo 3.3.5.

Ciascuna soluzione standard di riferimento è stata iniettata sei volte. L’elaborazione dei dati ottenuti ha evidenziato una linearità di risposta dello strumento più che soddisfacente per tutti gli analiti presi in considerazione: i valori di r^2 sono risultati infatti tutti maggiori di 0,99. Nella figura successiva vengono riportate le curve di taratura di tutti gli analiti presi in esame (Figura 30).

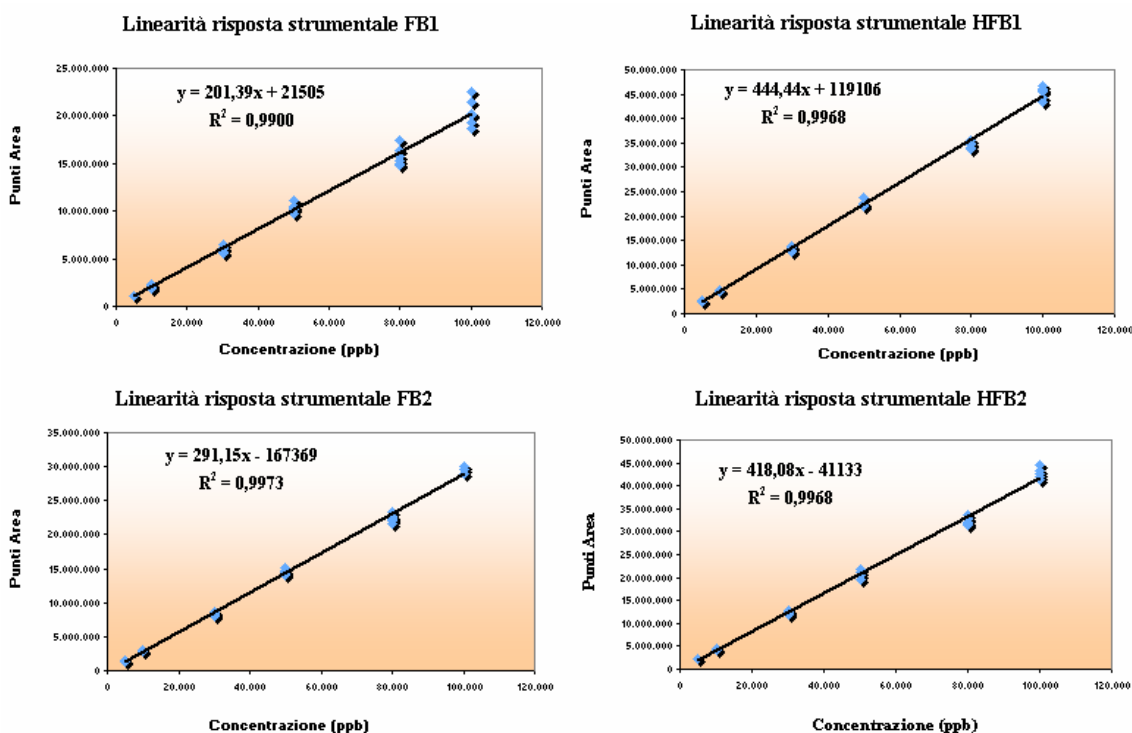


Figura 30: Curve di taratura degli standard di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂.

Accuratezza

Per la validazione del metodo sono stati usati campioni di fegato di maiale in cui è stata in precedenza accertata l'assenza degli analiti presi in considerazione.

Prima di tutto sono stati analizzati alcuni campioni di fegato acquistati in normali punti vendita al dettaglio, ma tali campioni hanno mostrato delle tracce, seppur lievi, di contaminazione da fumonisine. Si è deciso quindi di testare campioni di animali allevati secondo i principi della agricoltura biodinamica. Tali campioni sono risultati effettivamente privi di tracce di fumonisine e derivati; questo in virtù del fatto che gli animali da cui provenivano tali campioni sono stati allevati al pascolo e non hanno mai assunto mais, materia prima a forte rischio di contaminazione da fumonisine e che comunemente viene somministrata ai suini allevati in maniera tradizionale.

In Figura 31 vengono riportati i cromatogrammi ottenuti iniettando un campione di fegato di maiale allevato secondo i principi dell'agricoltura biodinamica.

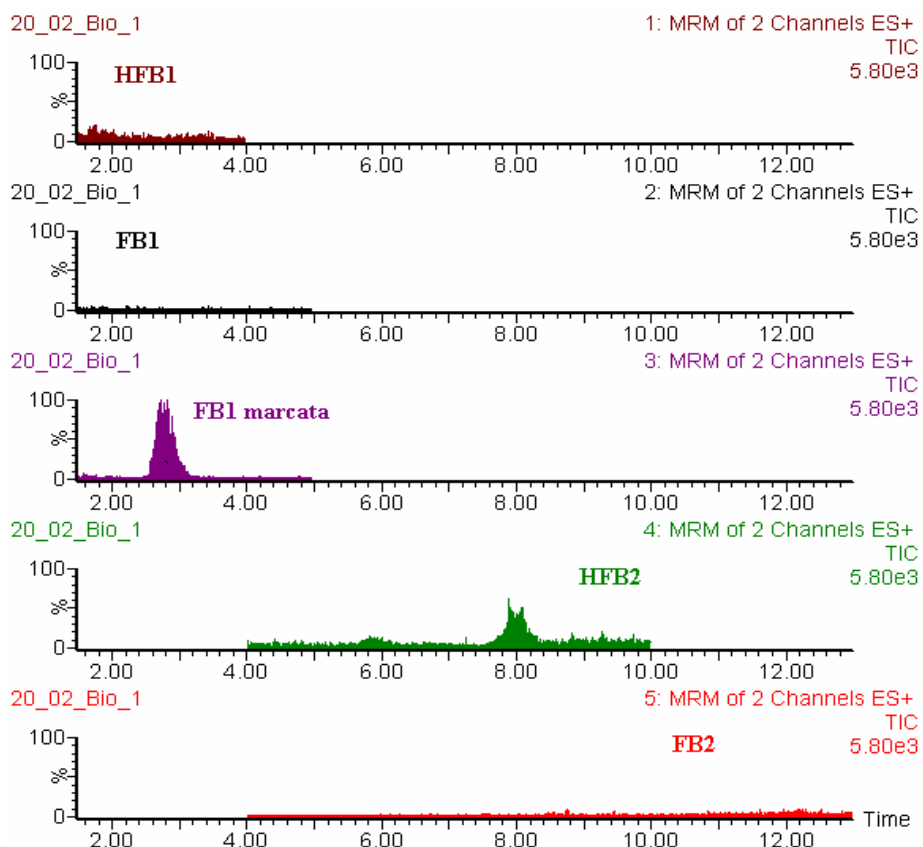


Figura 31: Cromatogrammi del fegato di maiale usato per la validazione.

Nella Figura 31 si notano il picco della fumonisina marcata, volutamente aggiunta al campione come standard interno, ed un altro nella traccia relativa all'aminotetrolo, picco che però non è riferibile alla HFB₂. Questo picco, osservabile in tutti i campioni di fegato analizzati, rappresenta infatti un'interferente in quanto manca di una delle transizioni caratteristiche della HFB₂ e poiché presenta un tempo di ritenzione diverso da quello caratteristico della HFB₂ (T_R = 6,10 minuti).

I campioni di fegato di maiale, in cui è stata accertata l'assenza degli analiti d'interesse, sono stati quindi fortificati come riportato nel Paragrafo 3.3.5.

I dati ottenuti dall'iniezione dei campioni fortificati ai tre differenti livelli di contaminazione di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂, contemporaneamente fortificati con una quantità fissa di FB₁ ¹³C₃₄, sono stati utilizzati per la costruzione delle rette di taratura in matrice. In particolare tali rette di tarature sono state ottenute mettendo in ascissa i valori corrispondenti al livello di fortificazione (10 ppb – 30 ppb – 50 ppb) ed in ordinata il rapporto tra i punti area dell'analita ed i punti area dello standard interno (FB₁ ¹³C₃₄).

I coefficienti di regressione ottenuti sono risultati sufficientemente soddisfacenti (r² > 0,95) (vedi Figura 32).

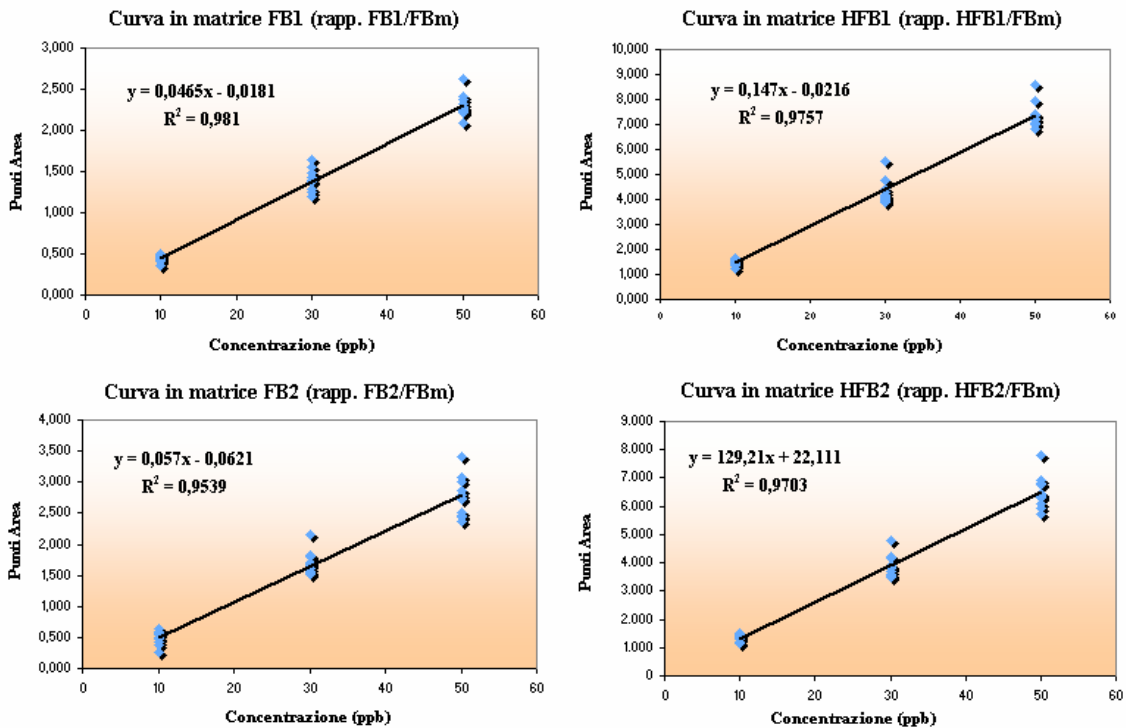


Figura 32: Curve di taratura in matrice di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂.

Confrontando i dati ottenuti dall'iniezione dei campioni di fegato fortificato con quelli ottenuti iniettando i relativi standard di riferimento (come descritto nel Paragrafo 3.3.5), è stata valutata e calcolata l'accuratezza della metodica analitica. In Tabella 26 vengono riportate le percentuali di stima della concentrazione reale.

Tabella 26: Capacità di stima della concentrazione reale di FB_1 , FB_2 , HFB_1 , HFB_2 ai diversi livelli di fortificazione.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE			STIMA PERCENTUALE DELLA CONCENTRAZIONE
	10 ppb	30 ppb	50 ppb	
FB_1	99,5 %	100,3 %	99,9 %	99,9 %
HFB_1	101,3 %	99,1 %	100,2 %	100,2 %
FB_2	95,3 %	103,0 %	99,0 %	99,1 %
HFB_2	100,9 %	99,4 %	100,2 %	100,2 %

La metodica consente una stima molto accurata della concentrazione reale: le percentuali misurate variano infatti da un minimo di **99,1 %** ad un massimo di **100,2 %**. La gran parte dei metodi simili presenti in letteratura, in cui la quantificazione degli analiti avviene mediante uso di uno standard esterno, presenta un'accuratezza inferiore rispetto alla metodica qui presentata. Le percentuali di recupero riportate in tali lavori variano infatti dal 60 al 96 % (Thakur R. A. e Smith S. J., 1996; Meyer K. *et al.*, 2003; Tardieu D. *et al.*, 2008). La migliore capacità di stima del presente metodo è da ricondurre all'utilizzo dello standard interno. Lo standard interno è una molecola che normalmente non è presente nei campioni da analizzare e che possiede proprietà fisico-chimiche simili a quelle degli analiti di interesse. L'aggiunta dello standard interno ai campioni e alle soluzioni standard di riferimento consente, quindi, di superare la normale variabilità associata alle fasi di estrazione e purificazione, compensando l'effetto di una possibile perdita degli analiti.

Precisione

I punti area ottenuti dall'analisi dei campioni fortificati sono stati utilizzati per determinare la precisione del metodo, espressa come deviazione standard relativa percentuale (%RSD) (vedi Tabella 27). I valori medi di %RSD sono risultati compresi tra **8,0 %** e **13,0 %**.

Tabella 27: Deviazione standard relativa percentuale (%RSD) di FB₁, FB₂, HFB₁, HFB₂ ai diversi livelli di fortificazione.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE			VALORE MEDIO DI % RSD
	10 ppb	30 ppb	50 ppb	
FB ₁	8,8	9,6	5,6	8,0
HFB ₁	7,1	10,8	6,5	8,1
FB ₂	18,2	10,0	10,7	13,0
HFB ₂	9,1	9,6	8,4	9,0

In questa prova è stata valutata anche la capacità di ottenere risultati ripetibili all'interno della stessa giornata e in tre giornate consecutive, come riportato nel Paragrafo 3.3.5. Elaborando i risultati, sono stati ottenuti i valori di deviazione standard relativa riportati nelle Tabelle 28 e 29.

Tabella 28: Variazioni intra-giornaliere.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE			VALORE MEDIO DI % RSD
	10 ppb	30 ppb	50 ppb	
FB ₁	7,0	9,2	5,4	7,2
HFB ₁	7,2	9,4	6,0	7,5
FB ₂	17,1	6,8	7,2	10,4
HFB ₂	8,6	7,8	7,1	7,8

Tabella 29: Variazioni inter-giornaliere.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE			VALORE MEDIO DI % RSD
	10 ppb	30 ppb	50 ppb	
FB ₁	6,1	0,9	2,2	3,1
HFB ₁	3,2	5,5	2,7	3,8
FB ₂	2,4	6,9	9,7	6,3
HFB ₂	4,4	6,1	4,7	5,1

I valori medi di deviazione standard relativa intra-giornaliera variano da un minimo di **7,2 %** ad un massimo di **10,4 %**. Mentre i valori di deviazione standard relativa inter-giornalieri variano dal **3,1 %** al **6,3 %**.

I valori di deviazione standard relativa percentuale (%RSD) ottenuti rientrano all'interno dei criteri di rendimento indicati nella Decisione CE n. 657/2002. Secondo tale Decisione la deviazione standard relativa percentuale, nell'intervallo di concentrazioni comprese tra 10 e 100 ppb, non deve superare il 23%.

I valori di RSD % da noi ottenuti sono tutti inferiori a 23 % e ciò attesta e conferma la buona ripetibilità della metodica messa a punto.

Limiti di quantificazione (LOQ) e di rilevazione (LOD)

Il limite di quantificazione (LOQ) per la metodica sviluppata secondo le modalità precedentemente descritte è risultato essere di **10 ng/g (ppb)**. Questo valore corrisponde al più basso livello di fortificazione dei campioni utilizzati per le prove di precisione ed accuratezza. Nella seguente figura vengono riportati i cromatogrammi ottenuti dall'analisi di un fegato fortificato con 10 ppb di FB₁, FB₂, HFB₁ e HFB₂ (vedi Figura 33).

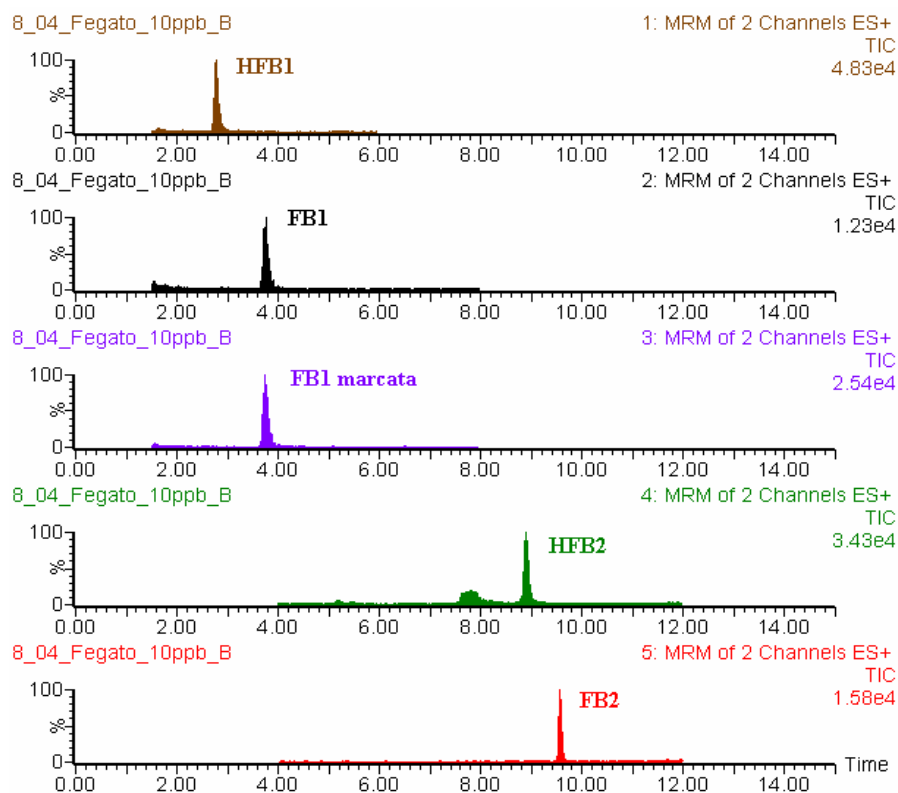


Figura 33: Fegato di maiale al più basso livello di fortificazione (10 ppb).

Il limite di rilevazione (LOD), calcolato invece come la concentrazione di analita a cui corrisponde un segnale pari a 10 volte il rumore di fondo, è di **0,05 ng/g (ppb)**.

Confrontando questi valori con quelli dei pochi lavori disponibili che hanno valutato la presenza di fumonisine nei prodotti carnei si può notare come questi avessero dei valori di LOQ e LOD più elevati (Thakur R. A. e Smith J. S., 1996; Tardieu D. *et al.*, 2008). Soltanto il lavoro basato sulla spettrometria di massa (Meyer K. *et al.*, 2003) presenta un limite di quantificazione uguale a quello della metodica messa a punto (10 ppb).

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Nei cromatogrammi ottenuti dalla prova in bianco non si nota alcun picco interferente: ciò conferma la purezza dei solventi e l'assenza di eventuali interferenti derivanti dal procedimento estrattivo impiegato.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Nei cromatogrammi ottenuti analizzando contemporaneamente un campione di fegato bianco e una soluzione standard mista di FB₁, FB₁ marcata, FB₂, HFB₁ e HFB₂ la corrente ionica registrata ai tempi di ritenzione dei vari analiti risulta essere stabile. Questo esclude la presenza di composti interferenti derivanti dalla matrice che determinano effetto di soppressione ionica.

4.2.3 Analisi dei campioni

Allo scopo di verificare nella pratica l'efficienza della metodica messa a punto, sono stati analizzati sette campioni di fegato di maiale (vedi paragrafo 3.3.1).

Tutti i campioni analizzati sono stati prelevati da suini macellati alla decima settimana di vita ed alimentati per due settimane con un mangime contenente 0.91 ppm di FB₁ e FB₂, e per le ultime quattro settimane di vita con un mangime con 2.34 ppm di FB₁ e FB₂.

Nella Tabella 30 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi di questi campioni di fegato di maiale.

La fumonina B₁ è stata quantificata in 5 dei 7 campioni analizzati in un range di concentrazioni comprese tra 15,76 e 42,52 ppb, mentre negli altri 2 è stata rilevata solo

in tracce (concentrazioni inferiori al limite di quantificazione o LOQ). La fumonisina B2 è stata invece rilevata in tracce in 5 dei sette campioni analizzati.

Per quanto riguarda i prodotti di idrolisi, in un solo caso si sono riscontrati livelli quantificabili di HFB₁, mentre in nessun altro campione è stato possibile evidenziare la presenza di HFB₁ e HFB₂ nemmeno in tracce (concentrazioni inferiori al limite di rilevazione o LOD).

Tabella 30: *Dati ottenuti dall'analisi dei campioni di fegato di maiale.*

CAMPIONE	CONCENTRAZIONE ANALITI (ppb)			
	FB₁	HFB₁	FB₂	HFB₂
Fegato 1	22,05	-	-	-
Fegato 2	15,76	-	Tracce	-
Fegato 3	42,52	-	Tracce	-
Fegato 4	35,61	-	Tracce	-
Fegato 5	Tracce	-	Tracce	-
Fegato 6	24,15	-	Tracce	-
Fegato 7	Tracce	17,36	-	-

Questi dati sono da considerarsi preliminari e, non essendo statisticamente significativi, dovrebbero essere confermati dall'analisi di un più cospicuo numero di campioni. Tali dati mettono in evidenza, tuttavia, la possibile presenza di residui di fumonisine e derivati in prodotti carni derivati da suini allevati in maniera tradizionale.

In tutti i campioni è stato possibile evidenziare la presenza, in tracce o in concentrazioni quantificabili, di almeno uno degli analiti presi in considerazione.

In 6 campioni su 7 è stato possibile effettuare la quantificazione di almeno un analita tra quelli presi in considerazione, e le concentrazioni riscontrate in questi campioni non erano trascurabili, essendo superiori a 15,76 ppb.

Nei campioni presentanti tracce di fumonisine o derivati il segnale analitico registrato è risultato essere ben al di sopra del limite di rilevazione della metodica (0,05 ppb), ma non essendo compreso all'interno della curva di calibrazione in matrice non è stato possibile effettuare una esatta quantificazione degli analiti.

Nelle figure seguenti sono riportati i cromatogrammi di due campioni di fegato di suino analizzati (vedi Figura 34 e Figura 35).

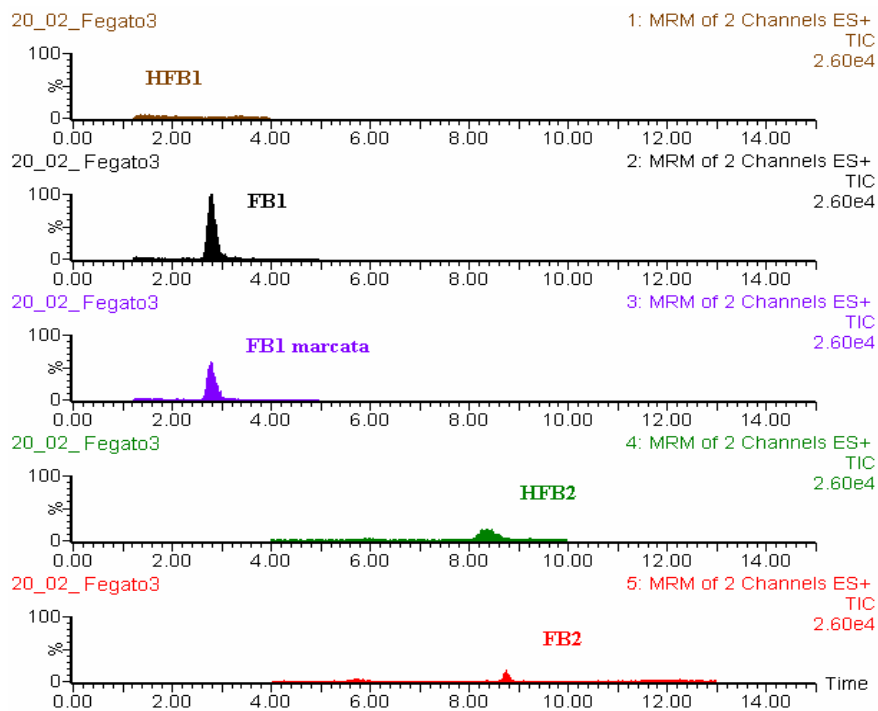


Figura 34: Campione “Fegato 3” contenente 42,52 ppb di FB_1 .

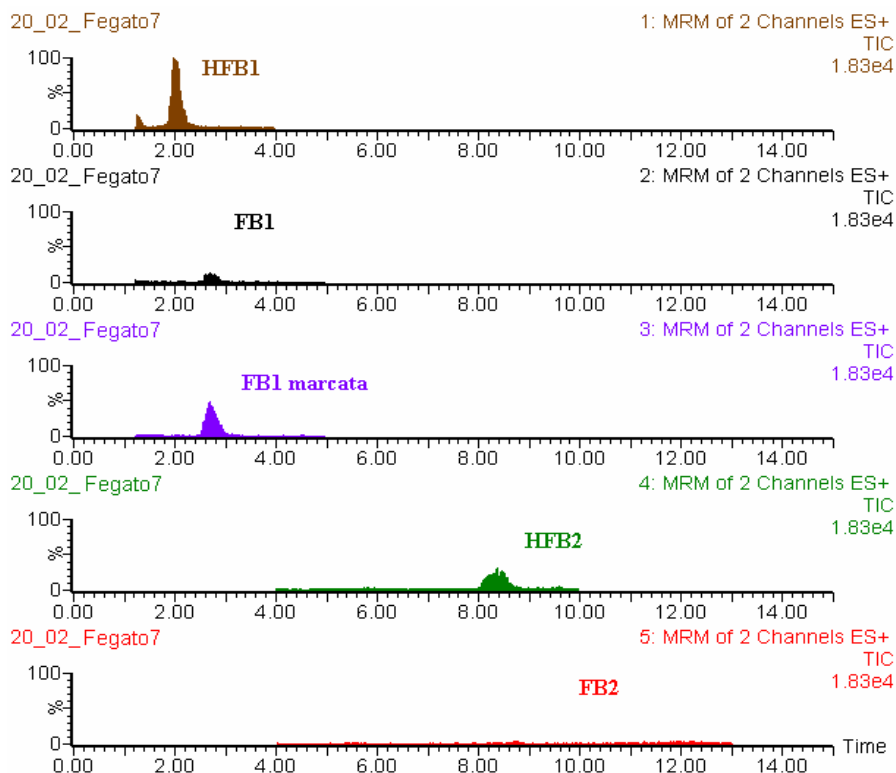


Figura 35: Campione “Fegato 7” contenente 17,36 ppb di HFB_1 .

I dati emersi dal presente lavoro si rivelano ancor più interessanti se confrontati con quelli ottenuti da lavori analoghi, ma precedenti. Le concentrazioni medie di FB₁, rilevate nel fegato di maiale da Meyer K. e collaboratori (2003), si aggirano attorno ai 231,0 ppb ± 163,0 ppb (media ± deviazione standard) e quelle riportate da Fodor J. e colleghi (2006) sono in media 99,4 ppb ± 37,5 ppb. In questi due lavori gli animali sono stati tuttavia nutriti con diete a forte contaminazione da fumonisine: nel primo caso gli animali hanno assunto 100 mg di FB₁ al giorno per 10 giorni (Meyer K. *et al.*, 2003), mentre nel secondo 50 mg di FB₁ e 20 mg di FB₂ per 20 giorni (Fodor J. *et al.*, 2006). Nel presente lavoro, invece, gli animali sono stati alimentati con mangimi a bassa concentrazione di fumonisine (0,91 ppm nel mangime di “fase1” e 2,34 ppm in quello di “fase2”) e, considerando il consumo medio giornaliero di mangime (0,71 Kg al giorno), gli animali hanno sicuramente assunto dosi inferiori di fumonisine rispetto alle ricerche condotte precedentemente.

I dati ottenuti nel presente lavoro mettono in luce, quindi, una possibile persistenza di fumonisine e derivati nei prodotti carnei suini, anche se provenienti da animali alimentati con mangimi il cui livello di contaminazione da fumonisine risulta inferiore al limite di 5 ppm imposto dalla legge (Raccomandazione CE n.576/2006).

4.3 DETERMINAZIONE DI FB₁ E FB₂ IN ALIMENTI SECCHI COMPLETI E COMPLEMENTARI PER CANE

4.3.1 Messa a punto del metodo

Parametri MS/MS

L'ottimizzazione dei parametri di massa è stata effettuata mediante infusione diretta delle soluzioni standard di fumonisina B₁ e B₂ a 1 ppm in acetonitrile e acqua (50:50, v:v). La modalità di ionizzazione ottimale è risultata l'elettrospray positivo (ESI+) in soluzione acida.

I parametri riguardanti la fumonisina B₁ sono gli stessi di quelli illustrati nella sezione "Parametri MS/MS" nel paragrafo 4.1.1, relativo alla messa a punto della metodica analitica per la determinazione della FB₁ nel latte. Mentre per la fumonisina B₂ vale quanto illustrato nella sezione "Parametri MS/MS" del paragrafo 4.2.1, relativo alla messa a punto della metodica per la determinazione di fumonisine in fegato di maiale.

Condizioni di HPLC

Differenti gradienti binari sono stati testati e le condizioni cromatografiche che sono risultate ottimali, in termini di buona ritenzione e separazione di entrambi gli analiti in un breve tempo di analisi, sono quelle riportate nella sezione "Condizioni HPLC" del Paragrafo 3.4.3.

Dopo l'eluizione della fumonisina B₁ e della fumonisina B₂ la colonna è stata equilibrata alle condizioni iniziali per almeno 8 minuti al fine di prevenire un eventuale trascinarsi degli analiti da un campione al successivo.

L'aggiunta di acido formico alle fasi mobili cromatografiche si è reso necessario al fine di ottimizzare la ionizzazione delle fumonisine B₁ e B₂, fondamentale nell'analisi tramite spettrometria di massa.

La presenza di acido formico nella fasi mobili, come pure nella fase di lavaggio dell'ago dell'HPLC, ha permesso di prevenire l'eventuale trascinarsi degli analiti da un campione al successivo.

Metodica estrattiva

In letteratura è possibile trovare alcuni lavori scientifici che riportano metodi analitici per la determinazione di micotossine nel pet food, ma la maggior parte di tali metodiche sono specifiche per la determinazione di aflatossine ed ocratossine (Scudamore K. A. *et al.*, 1997; Razzazi E. *et al.*, 2001; Sharma M. e Marquez C., 2001; Penido Maia P. e Pereira Bastos de Siqueira M. E., 2002; Pena B. S. D. *et al.*, 2008). Pochi lavori presentano invece dei metodi per la determinazione delle fumonisine (Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993; Scudamore K. A. *et al.*, 1997; Martins M. L., *et al.*, 2003).

Nessuno di questi metodi analitici specifici per la determinazione di micotossine nel pet food si basa sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa. Tutti questi lavori si basano invece sulla separazione cromatografica e determinazione fluorimetrica dopo derivatizzazione con OPA (orto-ftaldialdeide). In questi lavori ad una prima fase estrattiva segue un'accurata fase purificativa del campione, in maniera tale che composti derivanti dalla matrice interferiscano con la reazione di derivatizzazione con OPA e con la successiva determinazione fluorimetrica degli OPA derivati.

Nei sopracitati metodi d'analisi delle fumonisine nel pet food, la purificazione del campione viene effettuata su colonne ad immunoaffinità (Scudamore K. A. *et al.*, 1997) o su altri tipi di cartucce SPE (Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993; Martins M. L., *et al.*, 2003).

Come già detto in precedenza, il clean-up del campione risulta di fondamentale importanza anche quando si adotti una tecnica analitica altamente specifica e sensibile come l'HPLC-MS/MS. Il vantaggio nell'utilizzo di colonnine ad immunoaffinità risiede nella elevata selettività e specificità degli anticorpi monoclonali verso le molecole oggetto di analisi. Proprio per queste loro caratteristiche si è deciso di impiegare le colonnine ad immunoaffinità per il clean-up dei campioni di mangimi secchi per cani prima della loro iniezione nel sistema HPLC-MS/MS.

Per quanto riguarda invece le fasi estrattive precedenti al clean-up, due procedure estrattive, leggermente differenti, sono state messe a punto a seconda del tipo di matrice preso in esame: mangime secco complementare o mangime secco completo (vedi Paragrafo 3.4.4).

Entrambe le procedure presentano una prima fase comune in cui al campione viene aggiunta una miscela estraente composta da acetonitrile:metanolo:acqua = 25:25:50 (v:v:v); l'estrazione viene quindi effettuata mediante agitazione su agitatore orbitale.

La miscela estraente sopra citata ha consentito di ottenere percentuali di recupero maggiori rispetto ad altre miscele contenenti solo acetonitrile:acqua (80:20, v:v) o metanolo:acqua (50:50, v:v). Questo ha riconfermato quanto già riportato in letteratura. In uno studio comparativo, effettuato su matrici contenenti mais, è stato osservato infatti che miscele acquose di acetonitrile garantiscono generalmente recuperi migliori rispetto a miscele acquose di metanolo (De Girolamo A. *et al.*, 2001). In presenza però di matrici particolarmente complesse l'utilizzo dell'acetonitrile può talora portare alla formazione di una interfase separativa, in tal caso l'estrazione migliora sensibilmente utilizzando una miscela mista di acqua, acetonitrile e metanolo (Solfrizzo M. *et al.*, 2001).

Anche il tipo di metodo estrattivo è in grado di influenzare i valori di recupero e nel presente lavoro si è scelto di utilizzare un agitatore meccanico con piano oscillante al posto di un agitatore a piastra magnetica, in accordo con quanto già detto nel Paragrafo 1.2.7 e dimostrato da De Girolamo e collaboratori (2001).

Per quanto riguarda i campioni di mangime secco completo è stato necessario prevedere un ulteriore passaggio estrattivo-purificativo, in virtù della maggior complessità di questo tipo di matrice. Questi mangimi presentano, infatti, un più alto tenore proteico e lipidico rispetto ai mangimi di tipo complementare.

L'effettuare un duplice lavaggio liquido-liquido con esano ha consentito di ottenere un estratto privo di composti interferenti di natura lipidica. L'eliminazione della componente grassa si è resa necessaria soprattutto ai fini dell'impedire l'intasamento delle cartucce di immunoaffinità.

Le procedure analitiche messe a punto, sia per i mangimi complementari che per i mangimi completi, hanno permesso un'efficiente estrazione e purificazione degli analiti in tempi piuttosto rapidi ed in maniera non particolarmente complessa.

Come già visto in precedenza, anche nel caso dei mangimi secchi per cane un punto critico del procedimento estrattivo è risultato essere la fase di desolvatazione del campione prima dell'iniezione nel sistema HPLC-MS/MS. Anche in questo caso sono state ottenute percentuali di recupero maggiori evitando di portare totalmente a secco il campione eluito dalla cartuccia ad immunoaffinità. I 3 mL di eluato sono stati posti in

un matraccio graduato da 1 mL e lentamente concentrati sotto flusso di azoto. Il campione è stato quindi portato al volume finale di 1 mL per aggiunta di soluzione mobile alle condizioni iniziali del programma cromatografico impiegato.

4.3.2 Validazione del metodo

Verifica della linearità della risposta strumentale

Per verificare la linearità della risposta strumentale sono state iniettate nel sistema HPLC-MS/MS sette soluzioni standard di riferimento di FB₁ e FB₂ alle seguenti concentrazioni: 0,005 ppm – 0,025 ppm – 0,04 ppm – 0,2 ppm – 0,4 ppm – 1,5 ppm – 2 ppm.

Tenendo in considerazione un fattore di concentrazione pari a 2,5 e dovuto ai vari passaggi di preparazione del campione, le concentrazioni testate corrispondono ai seguenti livelli di contaminazione in matrice: 0,0125 – 0,0625 – 0,1 – 0,5 – 1 – 3,75 – 5 ppm.

Queste soluzioni sono quelle preparate come indicato nella sezione “Verifica della linearità della risposta strumentale” del Paragrafo 3.4.5.

Ciascuna soluzione standard di riferimento è stata iniettata in triplicato. L’elaborazione dei dati ottenuti ha evidenziato una linearità di risposta dello strumento più che soddisfacente sia per la FB₁ che per la FB₂, con valori di r^2 sono superiori a 0,99. Nella figura successiva vengono riportate le curve di taratura ottenute (Figura 36).

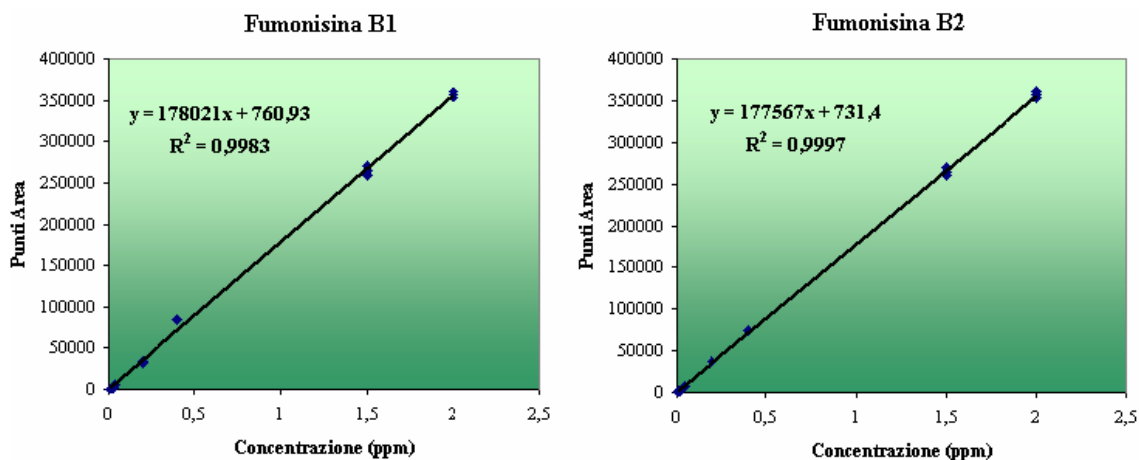


Figura 36: Curve di taratura della FB₁ e della FB₂ standard.

Accuratezza

Come già detto in precedenza, sono stati presi in considerazione due differenti tipi di mangime secco per cane (formulazioni di tipo complementare e formulazioni di tipo completo) e per tale motivo è stato quindi necessario mettere a punto e validare due differenti metodiche analitiche.

Per la validazione dei metodi sono stati individuati e selezionati un campione di mangime complementare ed uno di mangime completo in cui è stata precedentemente accertata l'assenza della fumonisina B₁ e B₂.

Caratteristica peculiare di entrambi i campioni usati per la validazione era lo scarso contenuto di mais, cereale a più alto rischio di contaminazione da fumonisine. Il campione di mangime completo presentava un elevato tenore proteico, a prova della maggior presenza in esso di matrici carnee a scapito di matrici di origine vegetale, mentre il mangime complementare presentava un'elevata percentuale di riso a scapito del mais.

I campioni di mangime secco per cane scelti per la validazione sono stati quindi fortificati come riportato nel Paragrafo 3.4.5.

L'accuratezza dei metodi è stata valutata analizzando campioni di mangime complementare e campioni di mangime completo per cane fortificati alle seguenti concentrazioni di FB₁ e FB₂ 0,1 ppm, 1 ppm, 3,75 ppm e 5 ppm.

I dati ottenuti dall'iniezione dei campioni fortificati sono stati utilizzati per la costruzione delle rette di taratura in matrice: sia per i mangimi complementari, che per i mangimi completi sono stati calcolati coefficienti di regressione soddisfacenti ($r^2 > 0,98$) per entrambi gli analiti presi in considerazione (vedi Figura 37 e Figura 38).

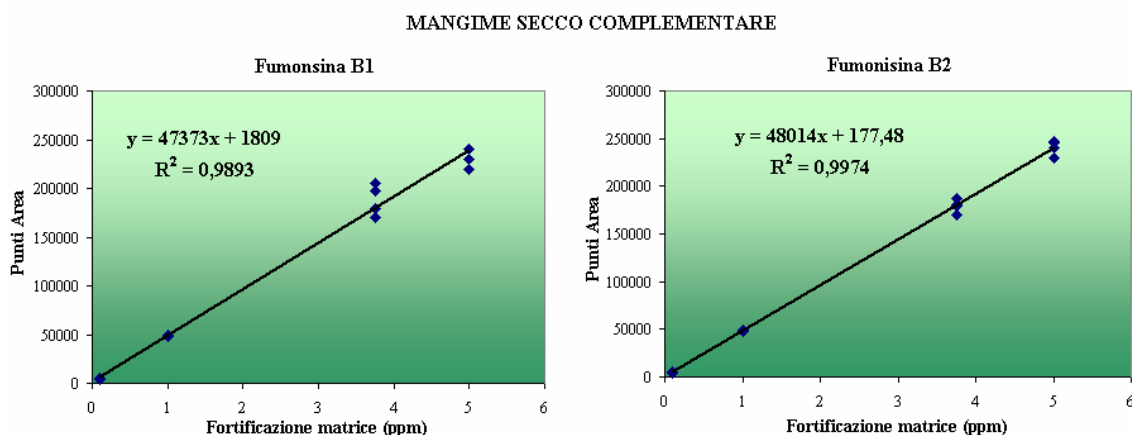


Figura 37: Curve di taratura in matrice di FB₁ e FB₂ (mangime secco complementare).

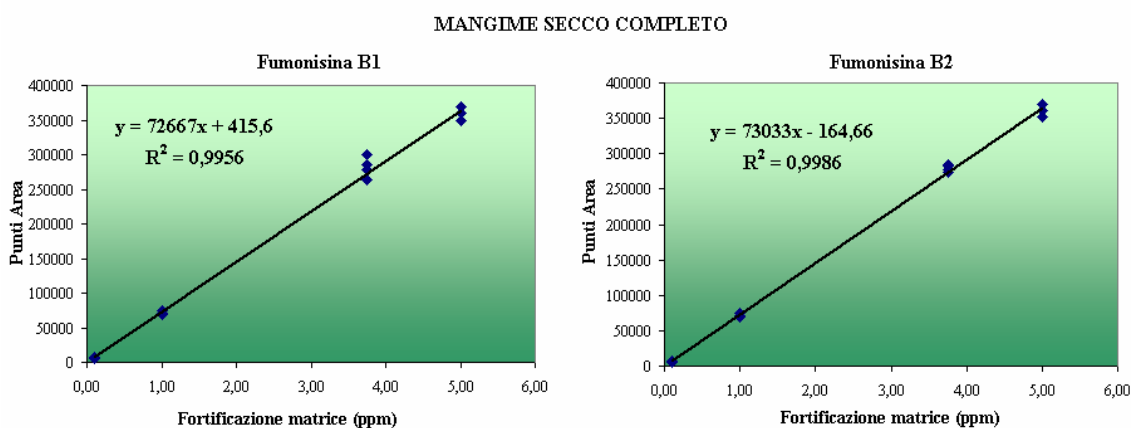


Figura 38: Curve di taratura in matrice di FB₁ e FB₂ (mangime secco completo).

Confrontando i dati ottenuti dall'iniezione dei campioni di mangime secco per cane con quelli ottenuti iniettando i relativi standard di riferimento (come descritto nel Paragrafo 3.4.5), sono state calcolate le percentuali di recupero della fumonisin B₁ e B₂.

In Tabella 30 vengono riportate le percentuali di recupero calcolate nel mangime di tipo complementare ai vari livelli di fortificazione.

Tabella 30: Percentuali di recupero della FB₁ e della FB₂ calcolate per il mangime secco complementare.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE				RECUPERO MEDIO
	0,1 ppm	1 ppm	3,75 ppm	5 ppm	
FB ₁	107,3 %	99,0 %	100,1 %	102,1 %	102,1 %
FB ₂	95,5 %	93,2 %	98,7 %	96,4 %	95,9 %

In Tabella 31 sono riportate le percentuali di recupero calcolate nel mangime di tipo completo ai vari livelli di fortificazione.

Tabella 31: Percentuali di recupero della FB₁ e della FB₂ calcolate per il mangime secco completo.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE				RECUPERO MEDIO
	0,1 ppm	1 ppm	3,75 ppm	5 ppm	
FB ₁	113,0	98,3 %	100,1 %	104,3 %	104,0 %
FB ₂	98,6 %	90,5 %	99,3 %	100,7 %	97,3 %

I valori di recupero medio ottenuti sono più che soddisfacenti e variano da un minimo di **95,9 %** ad un massimo di **104,0 %**. Tali valori rientrano ampiamente in quelli (compresi tra 70 e 110 %) suggeriti dal progetto europeo *Standard, Measuring and Testing (SMT)* per quanto riguarda le specifiche dei metodi per la determinazione delle micotossine in differenti matrici alimentari (Gilbert J. e Anklam E., 2002).

Risulta difficoltoso effettuare dei confronti con i pochi lavori analoghi presenti in letteratura. In un lavoro, ad esempio, vengono riportate delle percentuali di recupero ottenute però su una matrice differente dal pet food (Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993), mentre in un altro articolo non vengono per nulle indicate le percentuali di recupero caratteristiche della metodica (Martins M. L., 2003).

Solo nel lavoro svolto da Scudamore K.A. e collaboratori (1997) si trova un'indicazione precisa dei valori di recupero delle fumonisine nel pet food. In particolare vengono dichiarate delle percentuali di recupero medio del 94 % per la fumonisina B₁ e del 67 % per la fumonisina B₂.

Precisione

La precisione dei due metodi analitici è stata determinata dai dati ottenuti analizzando i campioni di mangime complementare e i campioni di mangime completo per cane fortificati. La precisione è stata espressa come deviazione standard relativa percentuale (%RSD) e i valori ottenuti oscillano tra **4,3 %** e **6,8 %** (vedi Tabelle 32 e 33).

In Tabella 32 vengono riportati i valori riguardanti il mangime secco di tipo complementare, mentre la Tabella 33 indica i dati relativi al mangime di tipo completo.

Tabella 32: Deviazione standard relativa (%RSD) della FB₁ e della FB₂ nel mangime secco complementare.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE				VALORE MEDIO DI %RSD
	0,1 ppm	1 ppm	3,75 ppm	5 ppm	
FB ₁	10,4	1,2	8,6	6,9	6,8
FB ₂	6,1	2,9	5,7	5,9	5,1

Tabella 33: Deviazione standard relativa (%RSD) della FB₁ e della FB₂ nel mangime secco completo.

ANALITA	LIVELLO DI FORTIFICAZIONE				VALORE MEDIO DI
	0,1 ppm	1 ppm	3,75 ppm	5 ppm	%RSD
FB ₁	4,1	3,5	5,4	4,2	4,3
FB ₂					4,8

I valori di deviazione standard relativa percentuale ottenuti in entrambi i tipi di matrice sono più che soddisfacenti e soddisfano ampiamente i criteri di rendimento indicati nella Decisione CE n. 657/2002. Secondo tale Decisione la deviazione standard relativa percentuale, per concentrazioni attorno ad 1 ppm, non deve superare il 16%.

I valori di RSD % da noi ottenuti sono tutti inferiori a 16 % e ciò attesta e conferma la buona ripetibilità delle metodiche messe a punto.

Limiti di quantificazione (LOQ) e di rilevazione (LOD)

I limiti di quantificazione (LOQ) della FB₁ e della FB₂ sono risultati essere di **0,1 µg/g (ppm)** sia per la metodica relativa al mangime di tipo complementare, che per quella specifica per le formulazioni di tipo completo. Questo valore corrisponde al più basso livello di fortificazione dei campioni utilizzati per le prove di precisione ed accuratezza, ed è quindi un valore che non si tiene conto anche della procedura di estrazione. Inoltre tale LOQ rappresenta una contaminazione di ben 50 volte più bassa rispetto al valore guida di 5 ppm, indicato dalla Comunità Europea per la somma di fumonisina B₁ e B₂ nel pet food (vedi Tabella 7) (Raccomandazione CE n.576/2006).

Nella seguente figura vengono riportati i cromatogrammi ottenuti dall'analisi di un campione di mangime complementare fortificato con 0,1 ppm di FB₁ e FB₂ e di un campione di mangime completo ad analogo fortificazione (vedi Figura 39).

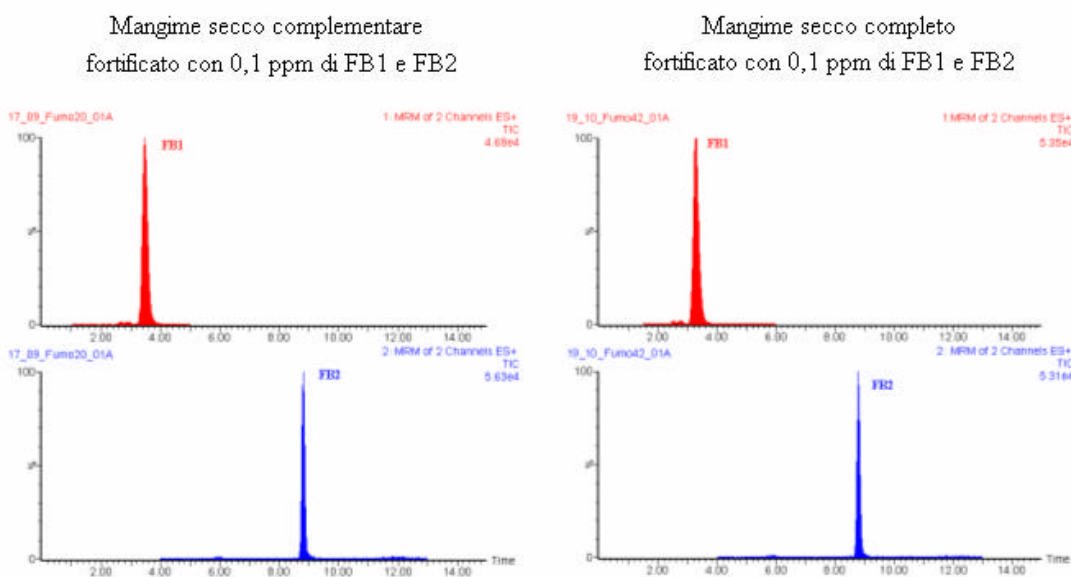


Figura 39: Campioni di mangime secco per cane utilizzati per la validazione delle metodiche.

I limiti di rilevazione (LOD) della FB₁ e della FB₂, calcolati invece come la concentrazione di analita a cui corrisponde un segnale pari a 10 volte il rumore di fondo, sono risultati essere di **0,05 ng/g (ppb)**.

Confrontando questi valori con quelli dei pochi lavori disponibili che hanno valutato la presenza di fumonisine nei mangimi per cane si può notare come questi avessero dei valori di LOD più elevati, compresi tra 3 e 200 ppb (Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993; Scudamore K. A. *et al.*, 1997; Martins M. L., 2003).

Controllo della purezza dei solventi impiegati

Nei cromatogrammi ottenuti dalla prova in bianco non si nota alcun picco interferente: ciò conferma la purezza dei solventi e l'assenza di eventuali interferenti derivanti dal procedimento estrattivo impiegato.

Valutazione della soppressione ionica della matrice

Nei cromatogrammi ottenuti analizzando contemporaneamente la matrice (un campione di mangime complementare bianco ed uno di mangime completo bianco) insieme ad una soluzione standard di FB₁ e FB₂ la corrente ionica registrata ai tempi di ritenzione

caratteristici dei due analiti è risultata essere stabile. Questo permette di escludere la presenza di composti interferenti aventi effetto di soppressione ionica.

4.3.3 Analisi dei campioni

I metodi analitici, sviluppati secondo le modalità precedentemente descritte, sono stati testati ed applicati all'analisi di 41 campioni di mangime secco per cane (9 di mangime complementare e 32 di mangime completo).

I risultati analitici ottenuti sono sintetizzati nella seguente tabella, dove i dati riguardanti i campioni di mangime di tipo completo vengono suddivisi in base al loro valore di mercato in categoria "premium" e categoria "standard" (vedi Tabella 34).

Tabella 34: Dati ottenuti dall'analisi dei campioni di mangime secco per cane.

CAMPIONI DI MANGIME	N°	N° CAMPIONI POSITIVI (%)				
		LOD<FB ₁ <LOQ	FB ₁ =LOQ	LOD<FB ₂ <LOQ	FB ₂ =LOQ	FB ₁ +FB ₂ =5 ppm
Completo premium	16	2 (12 %)	14 (88 %)	5 (31 %)	11 (69%)	0 (0%)
Completo standard	16	7 (44 %)	9 (56 %)	7 (44 %)	9 (56 %)	1 (6 %)
Complementare	9	6 (67 %)	3 (33 %)	6 (67 %)	3 (33 %)	1 (11 %)
<i>Totale</i>	<i>41</i>	<i>15 (37 %)</i>	<i>26 (63 %)</i>	<i>18 (44 %)</i>	<i>23 (56 %)</i>	<i>2 (5 %)</i>

Tracce di fumonisina B₁ e di fumonisina B₂ sopra il limite LOD sono state rilevate in tutti i campioni analizzati. Il 63 % dei campioni ha mostrato un livello di contaminazione da FB₁ quantificabile e nel 56 % si è riscontrata una contaminazione da FB₂ sopra il limite LOQ.

Il valore guida di 5 ppm, indicato dalla Raccomandazione CE n.576/2006, è stato superato in due campioni: un campione di mangime completo "standard" ha mostrato un livello di contaminazione totale di fumonisine di 5,19 ppm, mentre in un campione di mangime complementare si sono rilevati 8,80 ppm.

Nella figura seguente si trovano i cromatogrammi dei due campioni di mangime secco per cane nei quali il livello di contaminazione da fumonisine è risultato superiore al valore guida indicato dalla Comunità Europea (vedi Figura 40).

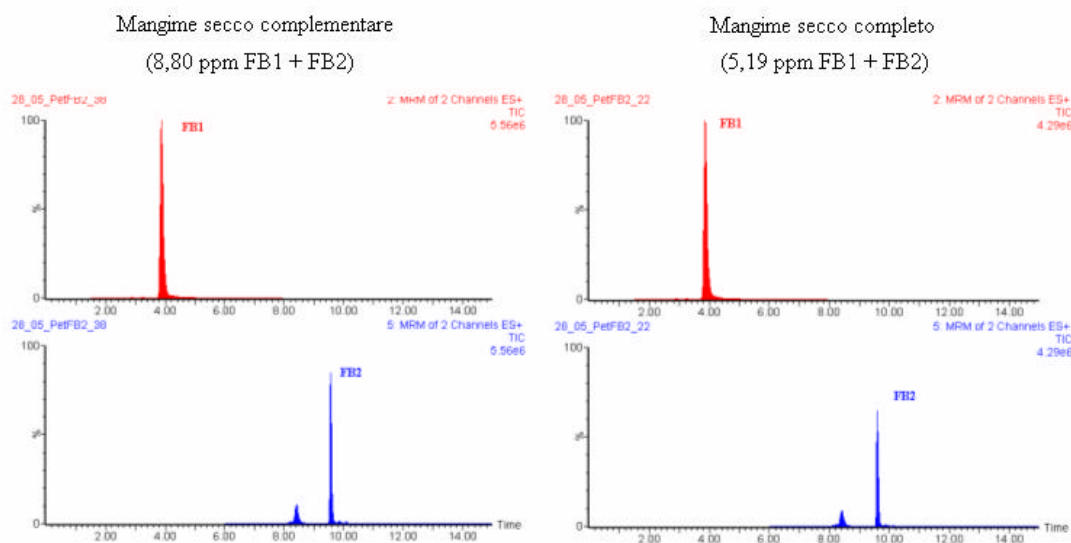


Figura 40: Cromatogrammi dei due campioni di mangime per cane naturalmente contaminati.

I livelli di contaminazione rilevati sono risultati estremamente variabili in tutti i tipi di pet food.

I più alti livelli di contaminazione sono stati riscontrati nei campioni di mangime di tipo complementare. Tra i campioni di mangime completo, le formulazioni “*standard*” hanno mostrato generalmente una contaminazione media da fumonisine più elevata rispetto alle formulazioni “*premium*”.

Le concentrazioni medie di FB₁ e FB₂ ed i range di contaminazione sono riportati nella seguente tabella (vedi Tabella 35).

Tabella 35: Dati ottenuti dall’analisi dei campioni di mangime secco per cane.

CAMPIONI DI MANGIME	FB ₁		FB ₂	
	CONCENTRAZIONE MEDIA (ppm) E % RSD	RANGE DI CONTAMINAZIONE (ppm)	CONCENTRAZIONE MEDIA (ppm) E % RSD	RANGE DI CONTAMINAZIONE (ppm)
Completo premium	0,49 (87 %)	0,12 – 1,32	0,53 (109 %)	0,11 – 1,73
Completo standard	1,98 (51 %)	0,80 – 3,41	0,89 (55 %)	0,29 – 1,78
Complementare	3,23 (78 %)	0,85 – 5,87	1,59 (81 %)	0,38 – 2,93
<i>Totale</i>	<i>1,31 (105 %)</i>	<i>0,12 – 5,87</i>	<i>0,80 (89 %)</i>	<i>0,11 – 2,93</i>

Le concentrazioni medie di fumonisina B₁ e B₂, rilevate nei 41 campioni di mangime secco per cane sono risultate essere rispettivamente di 1,31 ppm e 0,80 ppm.

Confrontando questi dati con quelli presenti in letteratura, si può notare come le concentrazioni medie da noi ottenute risultino essere generalmente più elevate (vedi Tabella 36).

Va però sottolineato che le ricerche che hanno valutato la presenza di fumonisine nel mangime secco per cane non sono particolarmente recenti e sono state svolte su un numero di campioni più esiguo (Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993; Scudamore K. A. *et al.*, 1997; Martins M. L., *et al.*, 2003). Oltretutto, i metodi analitici utilizzati in tali lavori mancano di una specifica validazione su questo tipo di matrice e sono basati sulla separazione cromatografica e rilevazione fluorimetrica dei composti derivatizzati con OPA (orto-ftaldialdeide), la cui instabilità nel tempo è ampiamente nota e documentata (Pagliuca G. *et al.*, 2005).

L'utilizzo di uno spettrometro di massa di tipo quadrupolare ha permesso, invece, un'affidabile determinazione delle fumonisine senza necessitare nessuna derivatizzazione.

Tabella 36: *Dati riguardanti la contaminazione da fumonisine in mangime per cane presenti in letteratura.*

RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO	N° CAMPIONI ANALIZZATI	N° POSITIVI	ANALITI	CONCENTRAZIONI MEDIE RILEVATE (ppm)
Scudamore K. A. <i>et al.</i> , 1997	9	1	FB ₁	0,11
			FB ₂	0,03
Hopmans E. C. e Murphy P. A., 1993	2	2	FB ₁	1,12
			FB ₂	0,12
Martins M. L. <i>et al.</i> , 2003	20	3	FB ₁	0,02

L'estrema variabilità dei range di contaminazione da noi riscontrati nel pet food, evidenziabile anche dagli elevati valori di % RSD riportati in Tabella 35, è attribuibile a svariati fattori.

In primis bisogna ricordare la quantità di mais e sottoprodotti del mais presenti nella formulazione mangimistica: maggiore è la quantità di cereale impiegata, maggiore è la possibilità di avere elevate concentrazioni di fumonisina nel prodotto finale.

I mangimi di tipo complementare sono composti generalmente da una miscela di uno o più cereali, e molto spesso nella formulazione si trova proprio il mais, alimento a

forte rischio di contaminazione da fumonisine. Anche nei mangimi di tipo completo è spesso presente una quantità attorno al 60 % di cereali e prodotti dei cereali, ma tale quantità risulta comunque inferiore rispetto a quella presente nei mangimi di tipo complementare.

Il livello di contaminazione da fumonisine nel pet food è chiaramente influenzato non solo dalla quantità di mais presente nelle materie prime, ma anche dalla qualità di tali cereali.

Per la produzione di mangimi per cane vengono talora impiegati anche gli scarti della lavorazione del mais, noti come “*corn screenings*”, che originano dal processo di cernita e pulitura di grosse partite di mais.

I *corn screenings* sono, quindi, composti da una mistura di semi rotti, pula, polvere, semi di piante infestanti e altro materiale estraneo. Come si può facilmente comprendere, il prezzo di questi scarti del mais è estremamente basso, ragione per cui l'industria del pet food talora utilizza i *corn screenings* per la produzione di mangimi secchi per animali da compagnia. Il basso livello di qualità di questa materia prima si accompagna spesso ad elevati valori di contaminazioni da micotossine (Brera C. *et al.*, 2004; Castells M. *et al.*, 2008). Uno studio di monitoraggio, condotto tra il 1988 e il 1991 su mais e prodotti del mais, ha messo in evidenza che la concentrazione di fumonisine nel *corn screenings* può arrivare ad essere 10 volte più alta rispetto al cereale tale e quale (Murphy P. A. *et al.*, 1993).

Le maggiori contaminazioni riscontrate nelle formulazioni “*standard*”, rispetto alle formulazioni “*premium*” dei mangimi completi, sono proprio indice di come la qualità delle materie prime impiegate condizioni il livello di contaminazione finale da fumonisine. Il basso valore di mercato delle formulazioni “*standard*” suggerisce la possibile presenza in esse di ingredienti di scarsa qualità (come ad esempio i *corn screenings*), mentre l'elevato valore di mercato delle formulazioni “*premium*” indica una più accurata scelta delle materie prime.

Altri fattori che possono essere concausa dell'estrema variabilità dei range di contaminazione riscontrati sono tutti quei processi e trattamenti che le materie prime subiscono nel corso del processo produttivo del pet food. In primis, tra questi trattamenti va ricordato il processo di cottura-estrusione a cui sono sottoposti i mangimi secchi per cane. Come già detto nel Paragrafo 1.1.4, la capacità di bonifica di tale processo può variare consistentemente da valori molto modesti fino a riduzioni della

contaminazione anche del 100 %. Temperatura finale del processo, grado di umidità dell'impasto, eventuale presenza di zuccheri, velocità di progressione delle coclee sono i fattori che sembrano maggiormente coinvolti nella variabilità della contaminazione del prodotto finale (Castells M. *et al.*, 2005; Jouany J. P., 2007; Scudamore K. A. *et al.*, 2008; Voss K. A. *et al.*, 2008).

I metodi HPLC-MS/MS messi a punto hanno dimostrato di essere un approccio affidabile, sensibile e selettivo per il controllo delle contaminazioni da fumonisina B₁ e B₂ nei mangimi secchi completi e complementari per cane, come raccomandato dall'Unione Europea (Raccomandazione CE n.576/2006).

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Le fumonisine costituiscono un gruppo di metaboliti tossici di recente scoperta, prodotti da funghi del genere *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. All'interno di questa classe di micotossine, la fumonisina B₁ è la più comune e la più pericolosa da un punto di vista tossicologico. Non vanno comunque dimenticate le altre fumonisine minori, quali la fumonisina B₂ e B₃, come pure i metaboliti e i prodotti di idrolisi delle fumonisine, quali l'aminopentolo e l'aminotetrolo, composti dotati anch'essi di azione tossica.

Questo tipo di micotossine è ampiamente diffuso a livello mondiale e frequentemente contamina il mais, gli alimenti ed i mangimi contenenti tale cereale. Il mais rappresenta, quindi, una fonte diretta di esposizione alle fumonisine per l'uomo, ma, costituendo parte fondamentale della dieta di un gran numero di animali da reddito, rende anche possibile il fenomeno del *carry-over*, ossia il trasferimento di tali micotossine nei prodotti di origine animale.

Numerosi studi sono stati condotti al fine di valutare e monitorare il livello di contaminazione da fumonisine nel mais, e nei prodotti contenenti mais, e la maggior parte delle metodiche analitiche, presenti in letteratura, sono state specificatamente sviluppate e messe a punto per le matrici di origine vegetale.

Poco è invece noto sulla presenza di fumonisine nei prodotti di origine animale e sul rischio che l'uomo corre assumendo questi alimenti.

La maggior parte degli studi di deplezione residuale, effettuati al fine di valutare il fenomeno del *carry-over*, sono stati condotti somministrando, ad animali in perfetto stato di salute, dosi di fumonisine estremamente elevate, lontane dalle normali condizioni di campo. In queste condizioni non si valuta, quindi, l'entità del *carry-over* quando gli animali sono sottoposti a dosi inferiori di micotossine, e non si tiene conto dell'effetto che l'esposizione alle fumonisine produce su animali che non godono di un perfetto stato di salute. In condizioni di alterazione della situazione fisiologica si può,

infatti, avere un coinvolgimento patologico anche degli organi emuntori dell'organismo, ed assistere quindi ad un aumentato passaggio e trasferimento delle tossine nei prodotti di origine animale (Meyer K. *et al.*, 2003; Fink-Gremmels J., 2008).

Per poter valutare il tasso di esposizione umana alle fumonisine, conseguente all'ingestione di alimenti di origine animale ottenuti in normali condizioni agro-zootecniche, si rende più che mai necessario disporre di metodiche analitiche specifiche per questo tipo di matrici, che consentano di determinare in maniera affidabile ed inequivocabile concentrazioni anche molto basse di tali micotossine.

La spettrometria di massa, accoppiata alla cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC-MS/MS), rappresenta, a tale proposito, la tecnica di elezione.

Negli ultimi dieci anni si è assistito ad un aumento consistente dell'impiego di tali metodiche per l'analisi di conferma, quali-quantitativa, della presenza di svariati residui e contaminanti negli alimenti. La definizione di limiti massimi residuali (MRL) sempre più stringenti e cautelativi per il consumatore (Regolamento CE n. 2377/90), e la definizione di criteri di rendimento per i metodi analitici da impiegare nel controllo degli alimenti (Decisione della Commissione Europea n. 2002/657/EC), hanno contribuito notevolmente alla crescente popolarità che tale tecnica analitica sta acquisendo nel campo della sicurezza alimentare.

La spettrometria di massa riesce, infatti, a rispondere alle esigenze di sensibilità, specificità ed affidabilità che una metodica analitica deve possedere per poter fungere da metodo di conferma per l'analisi di residui o contaminati negli alimenti. Oltretutto, con lo sviluppo di nuovi analizzatori di massa e di nuove sorgenti ioniche, le metodiche HPLC-MS/MS riescono a rispondere anche alle esigenze di velocità e rapidità, che molto spesso sono necessarie nel campo del controllo degli alimenti. Proprio per questa loro velocità di trasmissione e rielaborazione dei dati, tali metodiche vengono infatti definite come tecniche "*high throughput*".

In letteratura, sono sempre più numerose le pubblicazioni relative all'utilizzo della spettrometria di massa, accoppiata alla cromatografia liquida, in metodiche multiresiduali per il controllo contemporaneo di decine, o addirittura centinaia, di analiti (Schumacher R. *et al.*, 2008).

Numerosi metodi multiresiduali, specifici per la determinazione delle micotossine, tra cui anche le fumonisine, sono stati sviluppati e validati per l'analisi di matrici di origine vegetale (Cavaliere C. *et al.*, 2005; Sulyok M. *et al.*, 2006; Lattanzio V. M. T. *et al.*,

2007). Pochi, invece, sono i metodi HPLC-MS/MS che sono stati appositamente sviluppati e validati per l'analisi delle fumonisine in alimenti di origine animale, matrici particolarmente critiche e difficoltose dal punto di vista analitico (Meyer K. *et al.*, 2003; Sørensen L. K. e Elbæk T. H., 2005).

Scopo di questa tesi sperimentale è stato proprio quello di valutare la versatilità e le potenzialità della spettrometria di massa nell'analisi di fumonisine in differenti alimenti e matrici di origine animale.

Nel corso di tale lavoro sono state, infatti, messe a punto e validate differenti metodiche analitiche per la determinazione di FB₁ in latte bovino, per la determinazione di FB₁, FB₂ e relativi idrolizzati (HFB₁ e HFB₂) in fegato di maiale, ed infine per la determinazione di FB₁ e FB₂ in alimenti secchi completi e complementari per cani.

Le procedure messe a punto sono state attentamente studiate e pianificate in virtù delle caratteristiche della matrice in esame, nonché tenendo in considerazione il numero e il tipo di analiti da determinare. Per tale ragione, differenti tecniche estrattive, purificative e separative sono state testate e sperimentate, fino alla definizione delle condizioni ottimali di preparazione del campione. Le procedure messe a punto hanno, infatti, permesso una rapida, semplice, ma efficace estrazione, purificazione e separazione degli analiti in esame.

L'attenta ed accurata procedura di preparazione del campione, abbinata all'elevata sensibilità e specificità della spettrometria di massa, hanno consentito di raggiungere buoni risultati analitici in tutte le matrici animali testate. In seguito all'individuazione delle condizioni ottimali d'analisi si è proceduto, quindi, alla validazione delle metodiche, ed i parametri di validazione ottenuti sono risultati ottimi in termini di sensibilità, accuratezza e precisione, soddisfacendo pienamente i criteri di rendimento previsti dalla Decisione della Commissione Europea n. 2002/657/EC, nonché quelli richiesti dal progetto europeo *Standard, Measuring and Testing (SMT)* (Gilbert J. e Anklam E., 2002).

In tutte le matrici di origine animale prese in considerazione, gli analiti sono stati determinati e quantificati in maniera non ambigua anche a concentrazioni molto basse. I limiti di quantificazione raggiunti, per tutte le metodiche sviluppate, sono risultati infatti inferiori rispetto a quelli di altri lavori condotti in condizioni analoghe, ma con metodiche di rilevazione differenti.

I metodi sviluppati e validati sono stati quindi applicati ad alcuni campioni commerciali o ad alcuni campioni che facevano parte di progetti di ricerca del servizio di prova di Igiene e Tecnologia Alimentare del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale dell'Università di Bologna.

Nonostante i dati ottenuti siano da considerarsi del tutto preliminari, e privi di significatività dal punto di vista statistico, mettono comunque in evidenza la possibile presenza di queste micotossine anche nei prodotti di origine animale. Da ciò deriva, quindi, la necessità di pianificare un monitoraggio sulla loro possibile presenza negli alimenti di origine animale destinati al consumo umano.

I metodi messi a punto e validati nel corso del presente lavoro ben si presterebbero ad essere impiegati in questi piani di monitoraggio, ricordando però che le performances di rendimento di tali metodi sono garantite solo per il tipo di matrice e per il tipo di analiti presi in considerazione durante la validazione. Volendo, quindi, applicare tali metodiche a matrici di alimentari di tipo differente, è necessario riconfermare le performances di rendimento effettuando una nuova messa a punto e validazione sulla matrice in esame.

I buoni risultati da noi ottenuti sulle matrici prese in esame (latte bovino, fegato suino e mangimi secchi per cane) fanno presupporre la buona applicabilità delle metodiche anche ad altri alimenti, confermando quindi l'ottima versatilità e le potenzialità della spettrometria di massa, accoppiata alla cromatografia liquida, nell'analisi di fumonisine. Parte dei risultati di questo lavoro sono stati oggetto di presentazioni a congressi, come il XIII Simposio Italo-Ungherese sulla spettrochimica sulla contaminazione ambientale e sicurezza alimentare (Gazzotti T. *et al.*, 2008a) e il Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti (Gazzotti T. *et al.*, 2008b), ed inoltre sono stati utilizzati per la stesura di pubblicazioni (Gazzotti T. *et al.*, 2009).

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia la Fondazione Cassa di Risparmio in Bologna per il contributo economico concesso all'acquisto dello spettrometro di massa.

CAPITOLO 6

BIBLIOGRAFIA

Amodeo P. (2001): “Perché il progetto, quali i risultati, quali le problematiche”. In: Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento. Progetto regionale “Ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998”. Palazzo della regione Lombardia, 7 maggio 2001, pp. 7-27.

Amodeo P. (2002): “Inquinamento da micotossine: la situazione negli allevamenti da latte della Lombardia”. *Large Animals Review*, 5: 21-26.

Anklam E., Stroka J., Boenke A. (2002): “Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins”. *Food Control*, 13 (3): 173-183.

Antignac J.-P., de Wasch K., Monteau F., De Brabander H., Andre F., Le Bizec B. (2005): “The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis”. *Analytica Chimica Acta*, 529 (1-2): 129-136.

Bartolini R. (2002): “Come limitare le micotossine”. *Rivista di Suinicoltura*, 4: 83-85.

Battilani P. (2004): “Ferite alle cariossidi e umidità favoriscono i funghi aflatossigeni”. *L'Informatore Agrario, Speciale Aflatossine*, 14: 47.

Becker B. A., Pace L., Rottinghaus G. E., Shelby R., Misfeldt M., Ross M. S. (1995): "Effects of feeding Fumonisin B₁ to lactating sows and their suckling pigs". *American Journal of Veterinary Research*, 56: 1253-1258.

Bottarelli F. (1993): "Manuale di tossicologia veterinaria". Tep veterinaria, Piacenza, pp. 269-282.

Bouhet S., Hourcade E., Loiseau N., Fikry A., Martinez S., Roselli M., Galtier P., Mengheri E., Oswald I. P. (2004): "The mycotoxin fumonisin B₁ alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells". *Toxicological Sciences*, 77 (1): 165-171.

Brera C., Debegnach F., Grossi S., Miraglia M. (2004): "Effect os industrial processing on the distribution of fumonisin B₁ in dry milling corn fractions". *Journal of Food Protection*, 67 (6): 1261-1266.

Bullerman L. B. e Bianchini A. (2007): "Stability of mycotoxins during food processing". *International Journal of Food Microbiology*, 119: 140-146.

Caloni F., Spotti M., Auerbach H., Op den Camp H., Fink Gremmels J., Pompa G. (2000): "In vitro metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microflora". *Veterinary Research Communications*, 24 (6): 379-387.

CAST Council for Agricultural Science and Technology (2003): "Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems". Task force report n° 139, Ames, Iowa, USA.

Castells M., Marín S., Sanchis V., Ramos A. J. (2005): "Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing". *International Journal of Food Microbiology*, 123: 81-87.

Castells M., Marín S., Sanchis V., Ramos A. J. (2008): "Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review". *Food Additives and Contaminants*, 22 (2): 150-157.

Cavaliere C., Foglia P., Pastorini E., Samperi R., Laganà A. (2005): “Development of a multi residue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry”. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 19: 2085-2093.

Chiavaro E., Dall’Asta C., Galaverna G., Biancardi A., Gambarelli E., Dossena A., Marchelli R. (2001): “New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent”. *Journal of Chromatography A*, 937 (1-2): 31-40.

Coffey R., Cummins E., Ward S. (2009): “Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk”. *Food Control*, 20: 239-249.

Cornell J., Nelson M. M., Beighton P. (1983): “Neural tube defects in the Cape Town area, 1975-1980”. *South African Medical Journal*, 64 (3): 83-84.

Corticelli C., D’Imperio R. (2004): “Micotossine, in agguato in campo e allo stoccaggio”. *Agricoltura, Speciale Cereali*, settembre 2004: 68-70.

Cousin M. A. (2003): “Moulds in dairy products”. In: Roginsky H., Fuquay J.W., Fox P.F. (Eds) *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, New York, USA, pp. 2072-2078.

Deacon J. W. (1997): “Modern mycology”. Blackwell Science, Oxford, UK, III ed., pp. 1-28 e pp. 104-120.

De Angelis I., Friggè G., Raimondi F., Stamatì A., Zucco F., Caloni F. (2005): “Absorption of fumonisin B₁ and aminopentol on an in vitro model of intestinal epithelium: the role of P-glycoprotein”. *Toxicon*, 45: 285-291.

Decisione CE n. 657/2002 della Commissione del 12 agosto 2002 che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all’interpretazione dei risultati. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee*, 17 agosto 2002, L. 221/8.

Decreto Legislativo 81/2008 del 9 aprile 2008. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza del lavoro. Gazzetta ufficiale n. 101 del 30 aprile 2008 - Supplemento ordinario n. 108.

De Girolamo A., Solfrizzo M., Von Holst C., Visconti A. (2001): "Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maize-based food products". *Food Additives and Contaminants*, 18 (1): 59-67.

Derache R. (1988): "Tossicologia e sicurezza negli alimenti". Tecniche nuove, Milano, pp. 201-235.

Dilkin P., Zorzete P., Mallman C. A., Gomes J. D. F., Utiyama C. E., Oetting L. L., Corrêa B. (2003): "Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets". *Food Chemistry Toxicology*, 41 (10): 1345-1353.

Direttiva 96/23/CE della Commissione del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 23 maggio 1996, L 125/10.

Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 ottobre 2003 che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 1 novembre 2003, L 285/33.

Direttiva 2005/38/CE della commissione del 6 giugno 2005 relativa ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale del tenore di tossine di *Fusarium* nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 7 giugno 2005, L 143/18.

Dragoni I., Cantoni C., Vallone L., Papa A. (1997): “Muffe, alimenti e micotossicosi”. Città Studi edizioni, Milano, pp. 57-62 e 277-294.

EFSA (European Food Safety Authority) (2005): “Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed”. *The EFSA Journal*, 235: 1-32.

EU SCOOP (2003): European Commission SCOOP Task 3.2.10. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Subtask III: Fumonisins. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Brussels, 485-577. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf> Last access: 9 dicembre 2008.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2003): “Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed 2003”. In: FAO Food and Nutrition Paper 81. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5499e/y5499e00.pdf> Last access: 4 dicembre 2008.

FDA (Food and Drug Administration) (2001): “Guidance for industry: Fumonisin level in human food and animal feed”. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fumongu2.html> Last access: 9 dicembre 2008.

Fink-Gremmels J. (2008): “Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review”. *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 172-180.

Fodor J., Meyer K., Riedlberger M., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2006): “Distribution and elimination of fumonisin analogues in weaned piglets after oral administration of *Fusarium verticillioides* fungal culture”. *Food Additives and Contaminants*, 23 (5): 492-501.

Fodor J., Balogh K., Weber M., Mezes M., Kametler L., Posa R., Mamet R., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2008a): “Absorption, distribution and elimination of fumonisin B₁ metabolites in weaned piglets”. *Food Additives and Contaminants*, 25 (1): 88-96.

Fodor J., Bauer J., Horn P., Kovacs F., Kovacs M. (2008b): "Effects of different dietary fumonisin B₁ exposure on the toxin content of porcine tissues". *Italian Journal of Animal Science*, 4 (3): 73-78.

Fujimoto H. (2003): "Classification, occurrence and determination of mycotoxins". In: Roginsky H., Fuquay J.W., Fox P.F. (Eds) *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, New York, USA, pp. 2079-2087.

Gazzotti T., Zironi E., Lugoboni B., Grilli E., Piva A., Pagliuca G. (2008a): "Analysis of mycotoxins FB1, FB2, HFB1 and HFB2 in pig liver by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry". XIII Italian-Hungarian Symposium on spectrochemistry: environmental contamination and food safety, Bologna, 20-24 aprile 2008.

Gazzotti T., Lugoboni B., Zironi E., Barbarossa A., Giacometti F., Serraino A., Pagliuca G. (2008b): "Determinazione di fumonisin B₁ in latte mediante LC-MS/MS". XVIII Convegno Nazionale Associazione Italiana Veterinari Igienisti, Sabaudia, 11-13 giugno 2008.

Gazzotti T., Lugoboni B., Zironi E., Barbarossa A., Serraino A., Pagliuca G. (2009): "Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS". *Food Control*, *In press*.

Gelderblom W. C. A., Snyman S. D., Abel S., Lebepe-Mazur S., Smuts C. M., Van der Westhuizen L., Marasas W. F. O., Victor T. C., Knasmüller S., Huber W. (1996): "Hepatotoxicity and carcinogenicity of the fumonisins in rats. A review regarding mechanistic implications for establishing risk in humans". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392: 279-296.

Gelderblom W. C. A., Abel S., Smuts C. M., Marnewick J., Marasas W. F. O., Lemmer E. R., Ramljak D. (2001): "Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion". *Environmental Health Perspectives*, 109 (2): 291-300.

Gelderblom W. C. A., Marasas W. F. O., Lebepe-Mazur S., Swanevelder S., Vessey C. J., de la M Hall P. (2002): "Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*, 171 (2): 161-173".

Gilbert J. e Anklam E. (2002): "Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs". *Trends in Analytical Chemistry*, 21 (6-7): 468-486.

Gopee N. V., He Q., Sharma R. P. (2003): "Fumonisin B₁-induced apoptosis is associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor LLC-PK1 cells". *Chemical and Biological Interactions*, 146 (2): 131-145.

Govaris A., Roussi V., Koidis P. A., Botsoglou N. A. (2001): "Distribution and stability of aflatoxin M₁ during processing, ripening and storage of Teleme cheese". *Food Additives and Contaminants*, 18 (5): 437-443.

Gurung N. K., Rankins Jr D. L., Shelby R. A., Goel S. (1998): "Effects of fumonisin B₁-contaminated feeds on weanling angora goats". *Journal of Animal Science*, 76 (11): 2863-2870.

Haouet M. N. e Altissimi M. S. (2003): "Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale e umana". Webzine sanità pubblica veterinaria, n°18, febbraio 2003.
http://www.spvet.it/arretrati/numero_18/micot.html Last access: 1 dicembre 2008.

Hopmans E. C., Murphy P. A. (1993): "Detection of fumonisin B₁, B₂, B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1655-1658.

Hussein H. S., Brasel J. M. (2001): "Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals". *Toxicology*, 167 (2): 101-134.

Huwig A., Freimund S., Käppeli O., Dutler H. (2001): "Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents". *Toxicology Letters*, 122 (2): 179-188.

IARC (1993): “Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 56: some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Summary of data reported and evaluation”. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf> Last access: 28 novembre 08.

IARC (2002): “Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 82: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene”. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol82/mono82-7B.pdf> Last access: 28 novembre 08.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (2001): “Fumonisin”. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je03.htm> Last access: 7 dicembre 2008.

Jouany J. P. (2007): “Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds”. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 342-362.

Karuna R, Sashidhar R. B. (2008): “The mycotoxin fumonisin B₁ inhibits eukaryotic protein synthesis: in vitro and in vivo studies”. *Mycopathologia*, 165: 37-49.

Krska R., Welzig E., Boudra H. (2007): “Analysis of *Fusarium* Toxins in feed”. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 241-264.

Krska R., Crews C. (2008): “Significance, chemistry and determination of ergot alkaloids: A review”. *Food Additives and Contaminants*, 25 (6): 722-731.

Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinelli A., Sulyok M., MacDonald S., Crews C. (2008): “Mycotoxin analysis: an update”, *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 152-163.

Lattanzio V. M. T., Solfrizzo M., Powers S., Visconti A. (2007): "Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity clean-up". *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 21: 3253-3261.

Leblanc J. Ch., Tard A., Volatier J. L., Verger P. (2005): "Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from the 1st French Total Diet Study". *Food Additives and Contaminants*, 22(7): 652-672.

MacMahon B., Yen S. (1971): "Unrecognized epidemic of anencephaly and spina bifida". *Lancet*, 1 (7688): 31-33.

Makaula N. A., Marasas W. F., Badenhorst C. J., Bradshaw D., Swanevelder S. (1996): "Oesophageal and other cancer patterns in four selected districts of the Transkei, Southern Africa: 1985-1990". *African Journal of Health Science*, 3 (1): 11-15.

Maragos C. M., Richard J. L. (1994): "Quantitation and stability of fumonisin B₁ and B₂ in milk". *Journal of AOAC International*, 77 (5): 1162-1167.

Marasas W. F. O., Kellerman T. S., Gelderblom W. C. A., Coetzer J. A. W., Thiel P. G., Van der Lugt J. J. (1988): "Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*". *Onderstepoort Journal of Veterinarian Research*, 55 (4): 197-203.

Mari R. (1997): "Micotossine, un pericolo per l'allevamento". *Rivista di Avicoltura*, 3: 22-23.

Martins M. L., Martins H. M., Bernardo F. (2003): "Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food". *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98: 179-183.

Merril A. H. Jr, Cameron Sullards M., Wang E., Voss K. A., Riley R. T. (2001): "Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins". *Environmental Health Perspective*, 109 (2): 283-289.

Meyer K. Mohor K., Bauer J., Horn P., Kovacs M. (2003): "Residue formation of fumonisin B₁ in porcine tissues". *Food Additives and Contaminants*, 20 (7): 639-647.

Miller J. D. (2008): "Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges". *Food Additives and Contaminants*, 25 (2): 219-230.

Missmer S. A., Suarez L., Larsen R. D., Rothman K. J., Hendrick K. A. (2000): "Fumonisin and neural tube defects – Texas Department of Health preliminary results". Presented at the International Society of Environmental Epidemiology meeting, 22 August 2000, Buffalo, NY.

Munkvold G. P., Desjardins A. E. (1997): "Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence?". *Plant Disease*, 81 (6): 556-565.

Murphy P. A., Rice L. G., Ross P. F. (1993): "Fumonisin B₁, B₂ e B₃ content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 263-266.

Muscarella M., Lo Magro S., Nardiello D., Serino C., Palermo C., Centonze D. (2007): "Fumonisine FB₁ e FB₂ in prodotti alimentari a base di mais: ottimizzazione e validazione del metodo analitico mediante HPLC e rivelazione fluorimetrica con derivatizzazione postcolonna". XX Congresso Nazionale di Chimica Analitica, San Martino al Cimino (VT), 16-20 settembre 2007. <http://www.unitus.it/analitica07/Programma/Alimenti/Muscarella.pdf> Last access: 7 dicembre 2008.

Niderkorn V., Boudra H., Morgavi D. P. (2006): "Binding of *Fusarium* mycotoxins by fermentative bacteria in vitro". *Journal of Applied Microbiology*, 101 (4): 849-856.

Oswald I. P., Desautels C., Lafitte J., Fournout S., Peres S. Y., Odin M., Le Bars P., Le Bars J., Fairbrother J. M. (2003): "Mycotoxin fumonisin B₁ increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs". *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (10): 5870-5874.

Pagliuca G., Zironi E., Ceccolini A., Matera R., Serrazanetti G.P., Piva A. (2005): "Simple method for the simultaneous isolation and determination of fumonisin B₁ and its metabolite aminopentol-1 in swine liver by liquid chromatography-fluorescence detection". *Journal of Chromatography B*, 819 (1): 97-103.

Pavesi M., Palma A., Savoini G. (2004): "Abbattimento del tenore di aflatossina B₁ nella granella di mais: sperimentazione di un processo meccanico a basso costo". *Il Progresso Veterinario*, 1: 26-28.

Pena B. S. D., Vázquez B. D., Córdova I. A., Córdova J. C. A., Córdova J. M. S. (2008): "Determination of aflatoxins in commercial dog foods by immunoaffinity column". *Research Journal of Biological Sciences*, 3 (7): 772-774.

Penido Maia P. e Pereira Bastos de Siqueira M. E. (2002): "Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods". *Food Additives and Contaminants*, 19 (12): 1180-1183.

Pietri A. (1998): "Micotossine, la situazione odierna in Italia". *Rivista di Avicoltura*, 1/2: 32-38.

Pietri A. (2001): "Contaminazione di alimenti da aflatossine: risultati dello studio, aspetti pratici e proposte di controllo". In: Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento. Progetto regionale: Ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998. Palazzo della regione Lombardia, 7 maggio 2001, pp. 59-71.

Pietri A., Barnabucci U., Reyneri A., Visconti A. (2004): "Come prevenire le aflatossine nel latte". *L'Informatore Agrario*, 14: 49-50.

Prelusky D. B., Miller J. D., Trenholm H. L. (1996a): "Disposition of ¹⁴C-derived residues in tissues of pigs fed radiolabeled fumonisin B₁". *Food Additives and Contaminants*, 13 (2): 155-162.

Prelusky D. B., Trenholm H. L., Rotter B. A., Miller J. D., Savard M. E., Yeung J. M., Scott P. M. (1996b): "Biological fate of fumonisins in food producing animals". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392: 265-278.

Raccomandazione CE n. 576/2006 della Commissione del 17 agosto 2006 sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 23 agosto 2006, L 229/7.

Razzazi E., Böhm J., Grajewski J., Szczepaniak K., Kübber-Heiss A. J., Iben C. H. (2001): "Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85: 212-216.

Regolamento CE n. 2377/90 del Consiglio del 26 giugno 1990 che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 18 agosto 1990, L 224/1.

Regolamento CE n. 1525/1998 della Commissione del 16 luglio 1998 che modifica il regolamento CE n. 194/97 che stabilisce tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 17 luglio 1998, L 201/43.

Regolamento CE n. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 16 marzo 2001, L 77/1.

Regolamento CE n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 1 febbraio 2002, L 31/1.

Regolamento CE n. 472/2002 della Commissione del 12 marzo 2002 che modifica il regolamento CE n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee, 16 marzo 2002, L 75/18.

Regolamento CE n. 1425/2003 della Commissione dell'11 agosto 2003 recante modifica del regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda la patulina. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 12 agosto 2003, L 203/1.

Regolamento CE n. 2174/2003 della Commissione del 12 dicembre 2003 che modifica il regolamento CE n. 466/2001 per quanto concerne le aflatossine. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 13 dicembre 2003, L 326/12.

Regolamento CE n. 683/2004 della Commissione del 13 aprile 2004 che modifica il regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 15 aprile 2004, L 106/3.

Regolamento CE n. 123/2005 della Commissione del 26 gennaio 2005 che modifica il regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda l'ocratossina A. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 28 gennaio 2005, L 25/3.

Regolamento CE n. 183/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 gennaio 2005 che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 8 febbraio 2005, L 35/1.

Regolamento CE n. 856/2005 della commissione del 6 giugno 2005 che modifica il regolamento CE n. 466/2001 per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 7 giugno 2005, L143/3.

Regolamento CE n. 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea, 9 marzo 2006, L70/12.

Regolamento CE n. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 20 dicembre 2006, L 364/5.

Regolamento CE n. 1126/2007 della Commissione del 28 settembre 2007 che modifica il regolamento CE n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le *Fusarium*-tossine nel granturco e nei prodotti a base di granturco. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 29 settembre 2007, L 255/14.

Richard J. L., Meerdink G., Maragos C. M., Tumbleson M., Bordson G., Rice L. G., Ross P. F. (1996): "Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg culture material". *Mycopathologia*, 133: 123-126.

Riley R. T., Enongene E., Voss K. A., Norred W. P., Meredith F. I., Sharma R. P., Spitsbergen J., Williams D. E., Carlson D. B., Merrill A. H. Jr (2001): "Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis". *Environmental Health Perspectives*, 109 (2): 301-308.

Risoluzione dell'ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) RDC n. 274 del 15 ottobre 2002. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1653> Last access: 2 dicembre 2008.

Ross P. F. (1994): "What are we going to do with this dead horse?". *Journal of Associated Official Analytical Chemistry International*, 77 (2): 491-494.

Rustom I. Y. S. (1997): "Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods". *Food Chemistry*, 59 (1): 57-67.

Scarano G., Grasso L., Arace O., Oliviero G., Serpe L. (2001): "Rivelazione della fumonisina B₁ nel latte con strumenti semiautomatici". *Industrie Alimentari*, 40 (401): 257-260.

SCF (Scientific Committee on Food) (2000): "Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins part 3: fumonisin B₁ (FB₁)". SCF/CS/CNTM/MYC/ 24 FINAL. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out73_en.pdf Last access: 4 dicembre 2008.

Schumacher R., Sulyok M., Krska R. (2008): "Recent developments in the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of organic residues and contaminants". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390: 253-256.

Scott P. M., Delgado T., Prelusky D. B., Trenholm H. L., Miller J. D. (1994): "Determination of fumonisins in milk". *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, 29 (5): 989-998.

Scudamore K. A., Hetmanky M. T., Nawaz S., Naylor J., Rainbird S. (1997): "Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC". *Food Additives and Contaminants*, 14 (2): 175-186.

Scudamore K. A., Guy R. C. E., Kelleher B., MacDonald S. J. (2008): "Fate of fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone, during extrusion of wholemeal wheat grain". *Food Additives and Contaminants*, 25 (3): 331-337.

Seiferlen M., Humpf H., Voss K. A., Sullards M. C., Allegood J. C., Wang E., Merrill A. H. Jr (2007): "Hydrolyzed fumonisins HFB₁ and HFB₂ are acylated in vitro and in vivo by ceramide synthase to form cytotoxic N-acyl-metabolites". *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (9): 1120-1130.

Sharma M., Marquez C. (2001): "Determination of aflatoxins in pet food (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC". *Animal Feed Science and Technology*, 93: 109-114.

Shephard G. S. (1998): "Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins". *Journal of Chromatography A*, 815: 31-39.

Shepard G. S., Marasas W. F. O., Leggott N. L., Yazdanpanah H., Rahimian H., Safavi N. (2000): "Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran". *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48 (5): 1860-1864.

Shepard G. S. (2008): "Determination of mycotoxins in human food". *Chemical Society Reviews*, 37: 2468-2477.

Shetty P. H., Bhat R. V. (1997): "Natural occurrence of fumonisin B₁ and its co-occurrence with aflatoxin B₁ in indian sorghum, maize and poultry feeds". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (6): 2170-2173.

Shier W. T. (1992): "Sphingosine analogs: an emerging new class of toxins that includes the fumonisins". *Journal of Toxicology - Toxin Reviews*, 11 (3): 241-257.

Shier W. T. (2000): "The fumonisin paradox: a review of research on oral bioavailability of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*". *Journal of Toxicology - Toxin reviews*, 19 (2): 161-187.

SKLM (Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln) (1999): "Vorkommen von Fumonisinen in Lebensmitteln".

http://www.dfg.de/aktuelles_presse/reden_stellungnahmen/download/p19fumonisine.pdf

f Last access 9 dicembre 2008.

Smith J. S., Thakur R. A. (1996): "Occurrence and fate of fumonisins in beef". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 392: 39-55.

Solfrizzo M., Avvantaggio G., Visconti A. (1997): "Rapid method to determine sphinganine/sphingosine in human and animal urine as a biomarker for fumonisin exposure". *Journal of Chromatography B*, 692: 87-93.

Solfrizzo M., De Girolamo A., Visconti A. (2001): "Determination of fumonisin B₁ and B₂ in cornflakes by high performance liquid chromatography and immunoaffinity clean-up". *Food Additives and Contaminants*, 18 (3): 227-235.

Sørensen L. K., Elbæk T. H. (2005): "Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography B*, 820 (2): 183-196.

Spotti M., Caloni F., Fracchiolla L., Pompa G., Vigo D., Maffeo G. (2001): "Fumonisin B₁ carry-over into milk in the isolated perfused bovine udder". *Veterinarian & Human Toxicology*, 43 (2): 109-111.

Steyn P.S. (1995): "Mycotoxins, general view, chemistry and structure". *Toxicology Letters*, 82-83: 843-851.

Sulyok M., Berthiller F., Krska R., Schumacher R. (2006): "Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize". *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20: 2649-2659.

Tardieu D., Auby A., Bluteau C., Bailly J. D., Guerre P. (2008): "Determination of fumonisin B₁ in animal tissues with immunoaffinity purification". *Journal of Chromatography B*, 870: 140-144.

Thakur R. A., Smith J. S. (1996): "Determination of fumonisins B₁ and B₂ and their major hydrolysis products in corn, feed and meat using HPLC". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (4): 1047-1052.

Turner P. C., Nikiema P., Wild C. P. (1999): "Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks". *Mutation Research*, 443: 81-93.

Turner N. W., Subrahmanyam S., Piletsky S. A. (2009): "Analytical methods for determination of mycotoxins: A review". *Analytica Chimica Acta*, 632, 168-180.

Ueno Y., Iijima K., Wang S. D., Sugiura Y., Sekijima M., Tanaka T., Chen C., Yu S. Z. (1997): "Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA". *Food and Chemical Toxicology*, 35 (12): 1143-1150.

Venter P. A., Christianson A. L., Hutamo C. M., Makhura M. P., Gericke G. S. (1995): "Congenital anomalies in rural black South Africa neonates – A silent epidemic?". *South African Medical Journal*, 85 (1): 15-20.

Visconti A., Solfrizzo M., Avantaggiato G., De Girolamo A. (2000): "Strategies for detoxification of *Fusarium* mycotoxins and assessing in vivo the relevant effectiveness". In: Pest and Disease 2000. British Crop Protection Council Conference, vol. 2, 721-728.

Visconti A., Avantaggiato G. (2002): "Misure di controllo della contaminazione da micotossine e strategie di detossificazione applicate ai prodotti cerealicoli". In: Le micotossine dei prodotti vegetali. Ricadute nelle filiere produttive collegate, Atti del Congresso AIDASA.

Voss K. A., Smith G. W., Haachek W. M. (2007): "Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity". *Animal Feed Science and Technology*, 137: 299-325.

Voss K. A., Bullerman L. B., Bianchini A., Hanna M. A., Ryu D. (2008): "Reduced Toxicity of Fumonisin B₁ in corn grits by single-screw extrusion". *Journal of Food Protection*, 71 (10): 2036-2041.

WHO (World Health Organization) (2000): "Environmental Health Criteria 219: Fumonisin B₁". United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization and the World Health Organization. International Programme on Chemical Safety, Geneva. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc219.htm> Last access: 5 dicembre 2008.

Wyllie T. D., Morehouse L. G.(1977): “Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses”. Marcel Dekker INC, New York, USA, volume 1, pp. 144-153.

Yiannikouris A., Jouany J. P. (2002): “Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review”. *Animal Research*, 51: 81-99.

Zöllner P., Mayer-Helm M. (2006): “Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, 1136: 123-169.