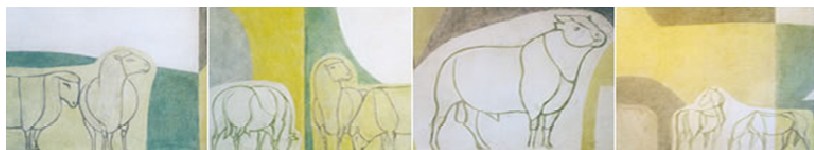


Viaggio al centro della Direzione Operativa chimica

La chimica tra realtà e leggenda

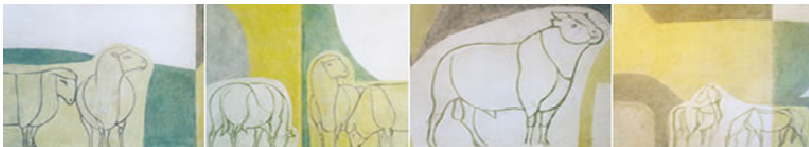
Le Micotossine

Tabita Mauti – Perito Chimico IZS Roma



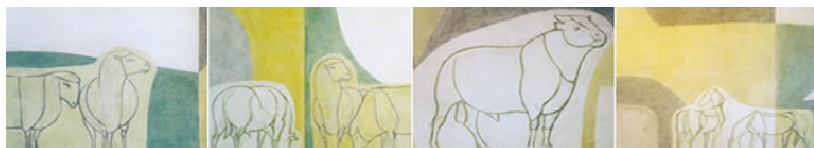
Le Micotossine

- Classificazione
- Fonti di Contaminazione;
- Aspetti Tossicologici
- Metodi
- Risultati analitici



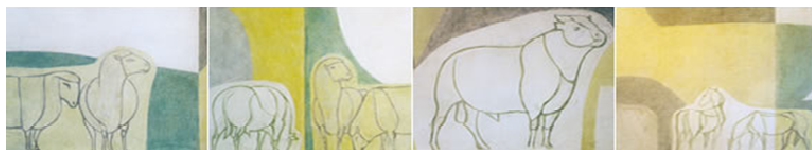
Le Micotossine : che cosa sono

- Metaboliti secondari prodotti da alcuni generi di funghi
- Presentano una tipologia di contaminazione a macchia di leopardo
- Non presentano difficoltà da un punto di vista di determinazione analitica



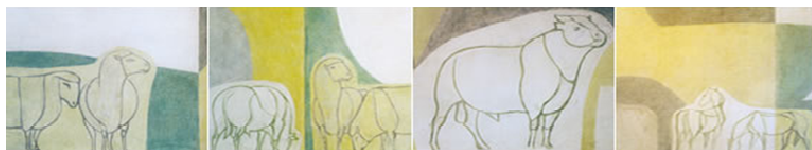
Le micotossine: perché vengono prodotte?

- Vendono prodotte solo in determinate condizioni ambientali (pH, T, Aw)
- Sono sostanze dotate di potere cancerogeno
- Sono sostanze termostabili



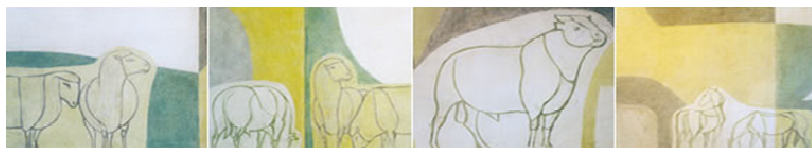
Micotossine maggiori e principali patologie

CLASSE DI MICOTOSSINE	FUNGHI PRODUTTORI	PATOLOGIE CORRELATE
Aflatossina	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Epatiti, cancro epatico, cirrosi epatica, immunodeficienza (?)
Ocratossina	<i>Aspergillus ochraceous</i> , altre specie di <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Nefrotossicità, epatotossicità, effetti teratogeni.
Fumonisin	<i>Fusarium moniliforme</i> , altre specie di <i>Fusarium</i>	Sintomi gastrointestinali
Tricotecene	<i>Fusarium spp</i> , <i>Stachybotrys chartarum</i>	Sintomi gastrointestinali, dermatiti, convulsioni, emorragie, immunodeficienza
Zearalenone	<i>Fusarium graminearum</i> , altre specie di <i>Fusarium</i>	Ginecomastia nei ragazzi (?), pubertà precoce, tumori



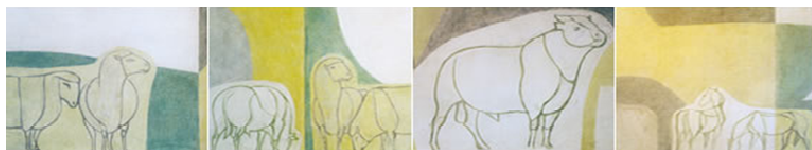
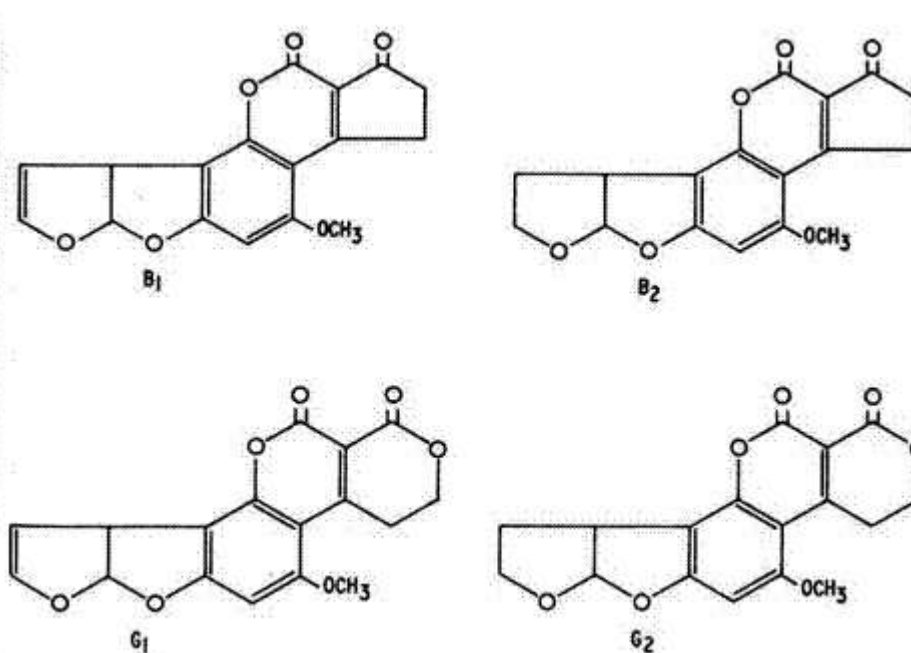
Aflatossine B e G

- Sono metaboliti secondari prodotti da *Aspergillus Flavus* (A-Fla-Tossine)
- Si trovano in molte matrici alimentari tra cui mais, arachidi e pistacchi
- L'AfB1 è il più potente cancerogeno conosciuto (IARC 1993)



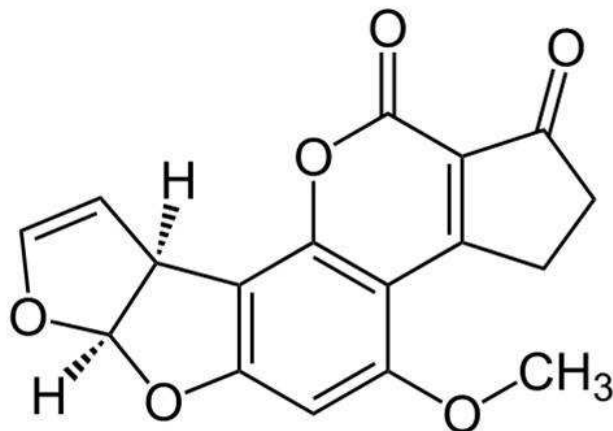
Aflatossine B e G

- Mostrano spiccata fluorescenza se irradiate con luce UV (Green o Blue)
- Sono stabili al calore ma vengono degradate dalla luce UV



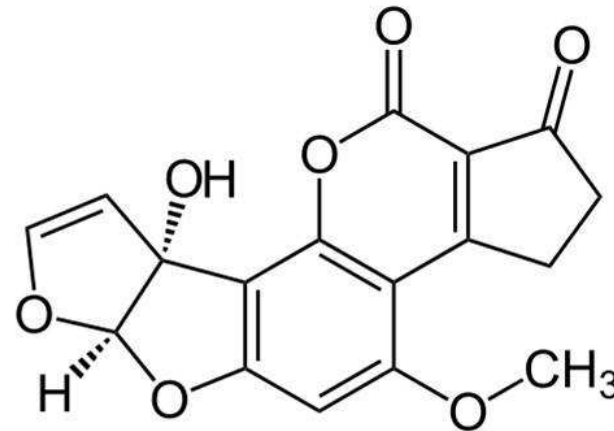
Aflatossine M

- Sono cataboliti delle aflatossine B prodotti dai mammiferi ed escrete attraverso il latte (M milk)

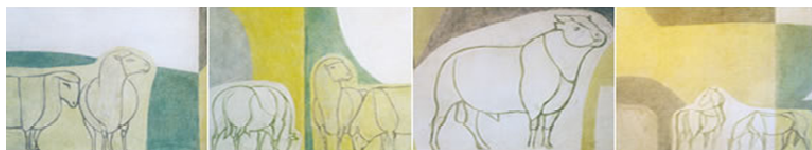


Aflatossina B1

Conversione
enzimatica
nel fegato

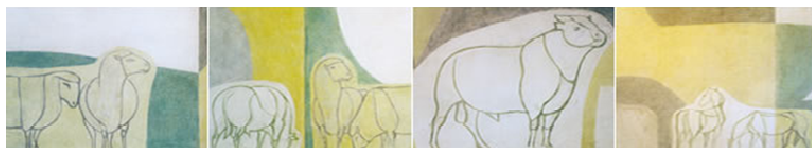
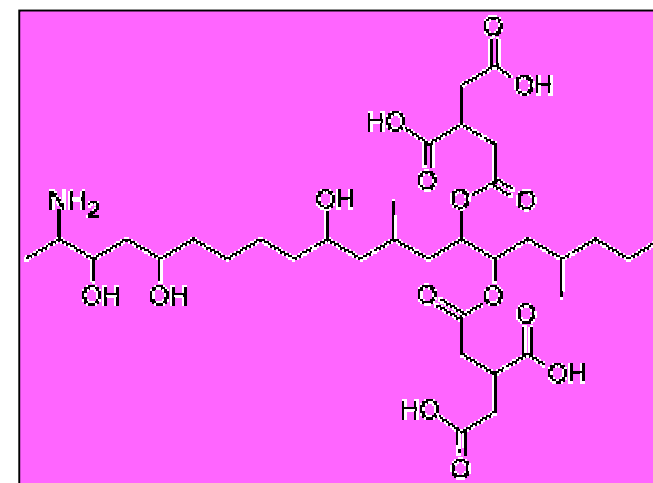
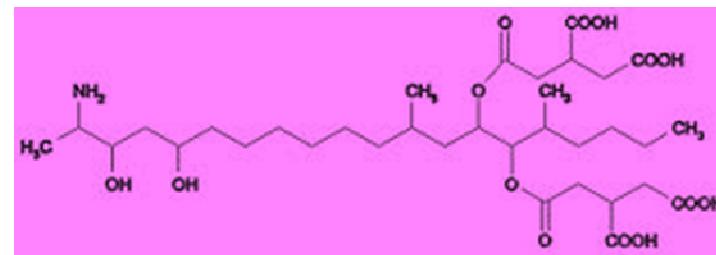


Aflatossina M1



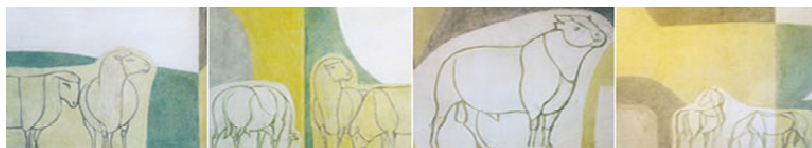
Fumonisine

- Sono prodotte da *Fusarium*
- Si ritrovano in molti prodotti alimentari quali: mais, birra, pane e spezie
- Non presentano assorbimento UV e non hanno fluorescenza nativa



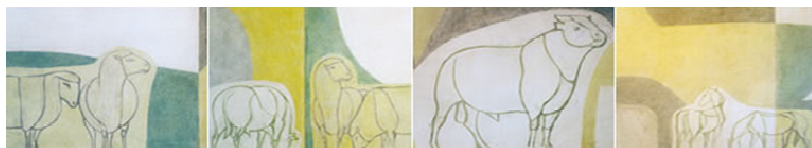
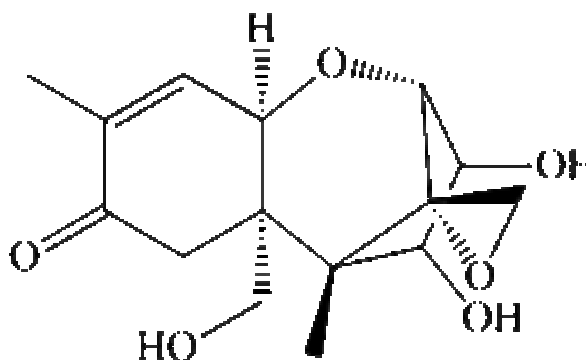
Deossinivalenolo (DON)

- è una micotossina appartenente al gruppo dei tricoteceni prodotta da alcune specie di *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, ecc..).
- Esso è una delle micotossine più diffuse negli alimenti e nei mangimi, soprattutto nei cereali quali grano, orzo e mais.



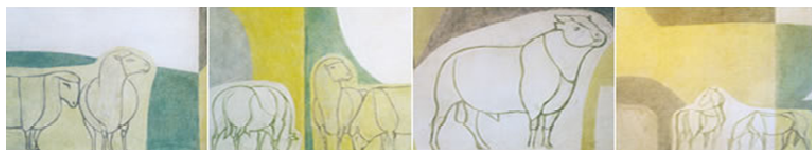
Deossinivalenolo (DON)

- I principali effetti tossici sono nausea, vomito, diarrea, gastroenteriti, malfunzionamento del sistema ematopoietico e immunosoppressore.
- E' stabile al calore



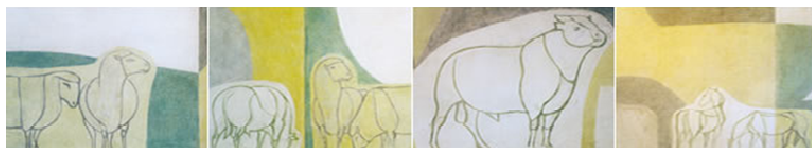
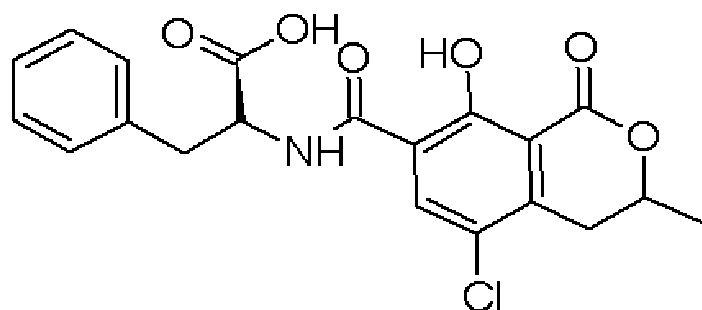
Ocratossine

- Micotossine prodotte da specie del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, quali *A. ochraceus* e *P. viridicatum*.
- Sembrano implicate nella carcinogenesi renale e immunotossicità in vari animali da esperimento.



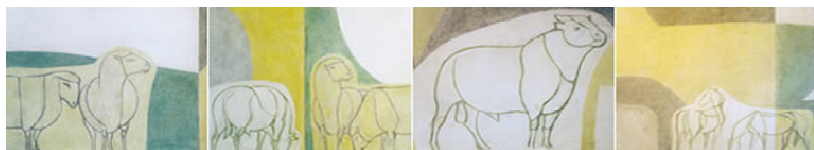
Ocratossina A

- Ruolo causale nella nefropatia del maiale e possibile ruolo in quella dei Balcani.
- Si ritrova principalmente nei cereali, nel caffè, nella frutta secca e nel vino.



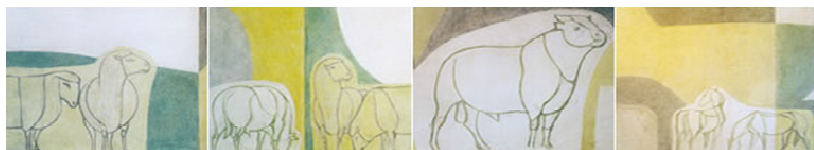
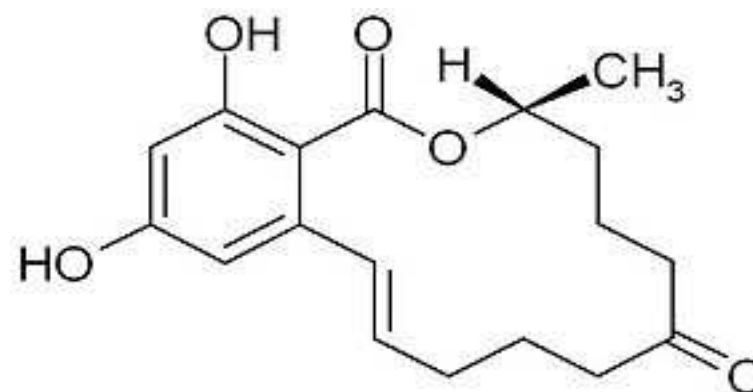
Zearalenone

- Micotossina ad attività estrogenica non steroidea prodotta da muffe appartenenti al genere *Fusarium*.
- Il nome deriva da *Gibberella zeae* che è il perfetto stato sessuale del *Fusarium graminearum*, il primo organismo produttore studiato.



Zearalenone

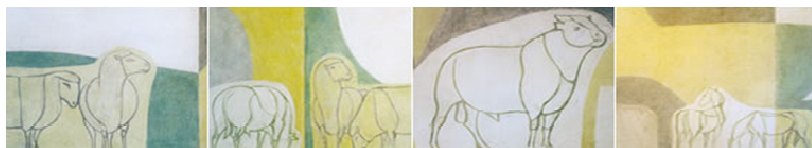
- Ha attività ormono-simile, può provocare aborto, ingrossamento dell'utero, infertilità specialmente nei suini.
- E' termostabile
- Si può trovare in tutto il mondo specialmente come agente contaminante dei cereali e soprattutto del mais.



Micotossine Normativa

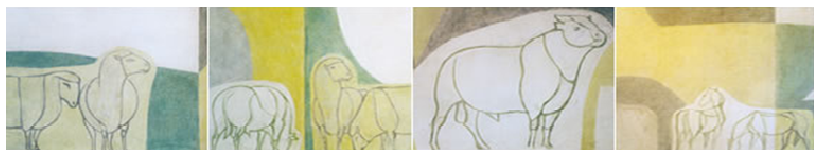
- Reg. CE 1881/2006 e succ. mod. (prodotti alimentari)
- Limiti per Aflatossine, Ocratossina A, Patulina, DON, Fumonisine, Zearalenone, T2+HT2

Prodotto	Tenore massimo (µg/kg)			Metodo di campionamento	Criteri di prestazione per i metodi di analisi
	B ₁	B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂	M ₁		
2.1. AFLATOSSINE					
2.1.1. Arachidi, frutta a guscio e frutta secca					
2.1.1.1. Arachidi, frutta a guscio e frutta secca e relativi prodotti di lavorazione destinati al consumo umano diretto, ovvero all'utilizzazione quali ingredienti per la produzione di derrate alimentari	2,0 (*)	4,0 (*)	—	Direttiva 98/53/CE della Commissione (*)	Direttiva 98/53/CE

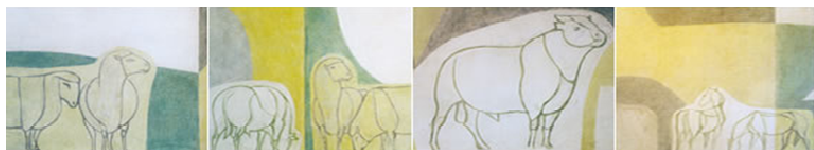


Micotossine Normativa

- Reg. CE 1881/2006 (alimenti per animali).
- La sola Aflatossina B1 ha un limite massimo.
- Racc. Comm. del 17 agosto 2006 : **valori di riferimento** per DON, zearalenone, OTA, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in alimenti per animali.



Aspetti analitici



Tabita Mauti – 27 Novembre 2012 - IZS Roma

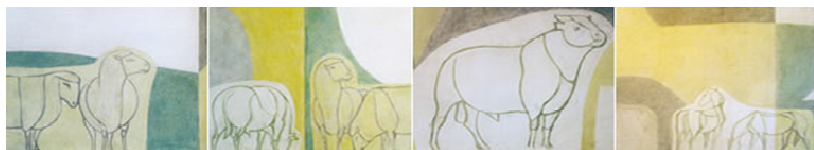
La filiera analitica



Campionamento

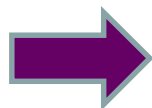
Preparazione del campione

Analisi quantitativa



Dal campo al bancone

Un campo...



Un raccolto...



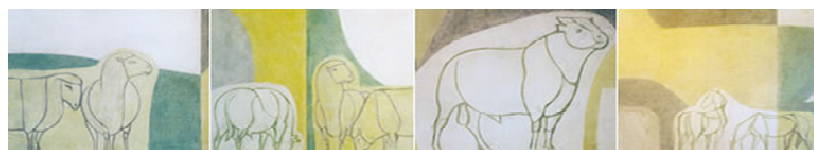
Campione globale (circa 5Kg)



Aliquota da analizzare (Circa 1 kg)

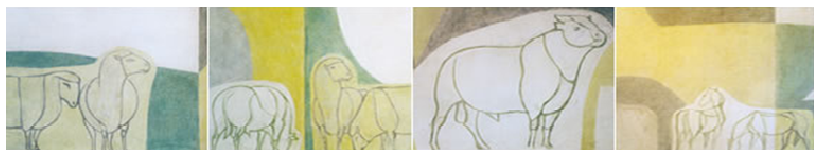


5 grammi campione per l'analisi



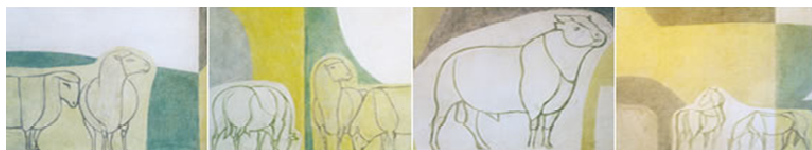
Preparazione del campione

- Macinazione del campione globale fino a granulometria fine
- Prelievo in modo rappresentativo di un'aliquota da destinare all'analisi
- La distribuzione non omogenea presenta difficoltà nel campionamento



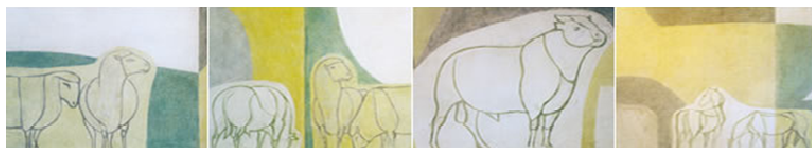
Estrazione

- Tutte le micotossine vengono estratte con Metanolo – Acqua 80/20 ad eccezione del DON che viene estratto solo con Acqua



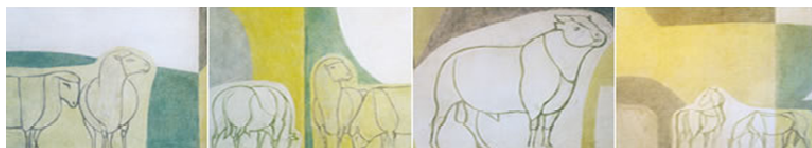
Purificazione

- Colonnine di immunoaffinità
- Colonnine multi-micotossina



Metodologie analitiche a confronto

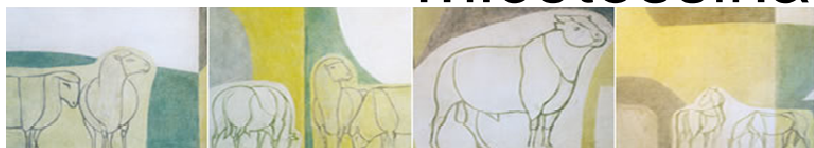
Metodologie	Vantaggi	Svantaggi
HPLC	<p>Ottima sensibilità Ottima selettività Buona ripetibilità Tempi di analisi relativamente brevi Metodi ufficiali disponibili (AOAC) Possibilità di automatizzazione</p>	<p>Costo della strumentazione Costo dell'analisi Esperienza del personale Derivatizzazione (aflatossine, fumonisina) Uso di solventi organici</p>
LC/MS/MS	<p>Simultanea analisi di più micotossine Buona sensibilità Costituisce metodo di conferma</p>	<p>Costi elevati della strumentazione Effetti matrice Alta esperienza del personale Non è necessaria la derivatizzazione</p>
ELISA	<p>Preparazione del campione semplice Equipaggiamento mediamente costoso Alta sensibilità Valida per screening Analisi simultanea di molti campioni</p>	<p>Cross-reattività con altre micotossine (specificità) Effetti matrice Presenza di falsi positivi/negativi Richiede analisi di conferma Ripetibilità e riproducibilità critiche Esperienza del personale</p>



Aflatossine, Zearalenone e Ocratossina A

E' stato sviluppato un metodo
che permette la
determinazione simultanea
delle Aflatossine Totali, l'
Ocratossina A e lo
Zearalenone con un gradiente
di fase mobile e di lunghezze
d'onda e derivatizzatore
fotochimico.

La purificazione avviene con
delle colonnine IAC multi-
micotossina.

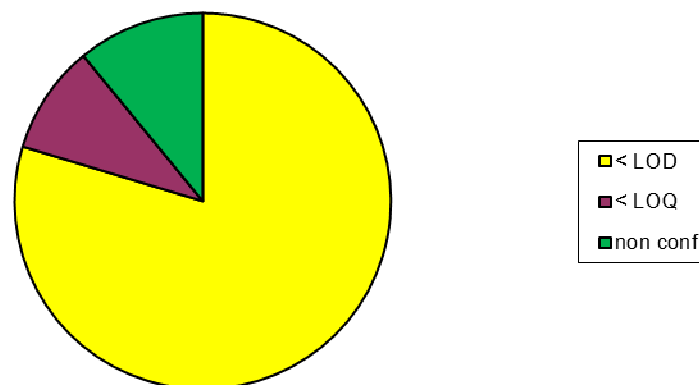


Qualche dato analitico

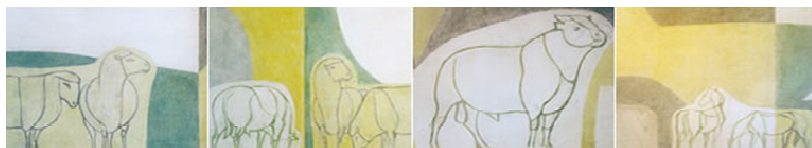
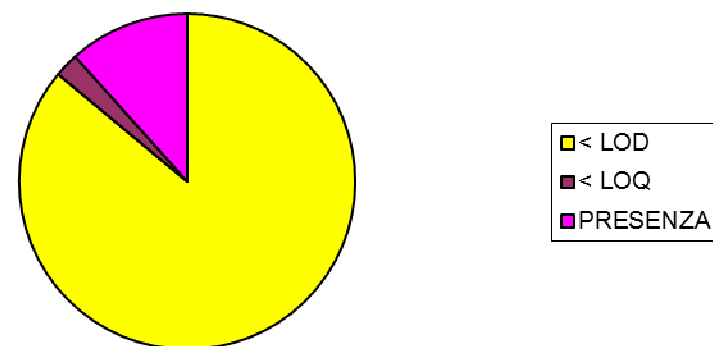
Da qualche anno
tutti i campioni del
PNAA

Sorveglianza e
Vigilanza vengono
analizzati per tutte
le micotossine,
questo ci ha fatto
fare una statistica
sulla loro
presenza nel
territorio.

2012 Aflatossina B1



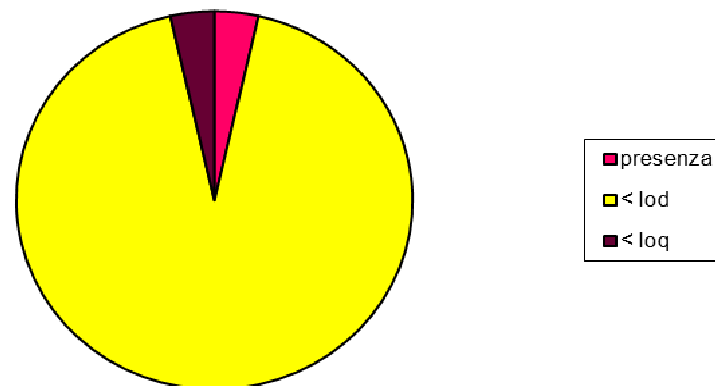
2011 AFLATOSSINA B1



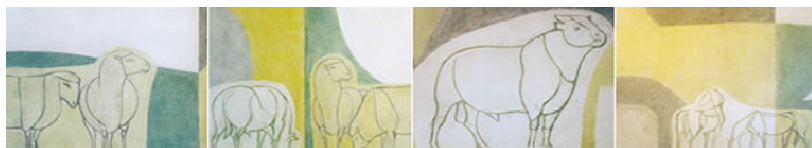
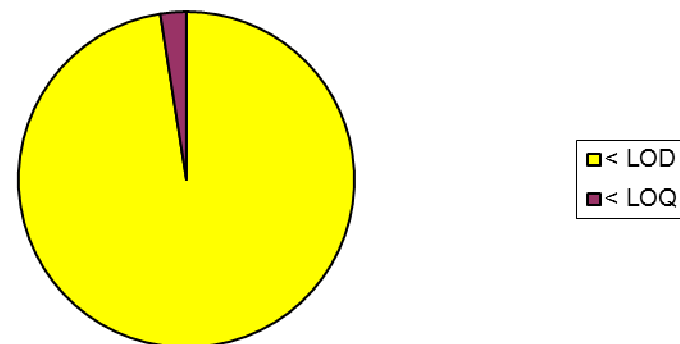
Ancora qualche dato...

L'OTA è la
micotossina
meno
frequente!

2012 Ocratossina A



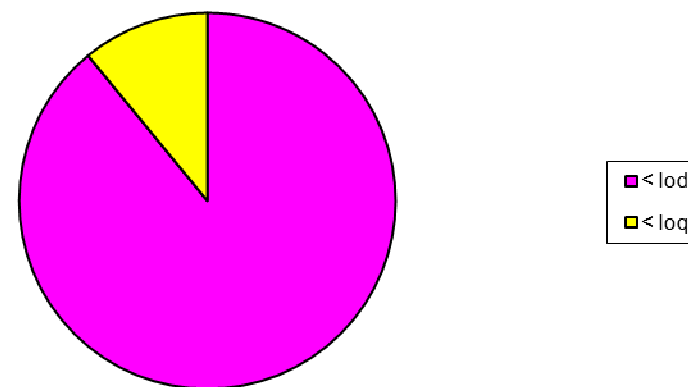
2011 OCRATOSSINA A



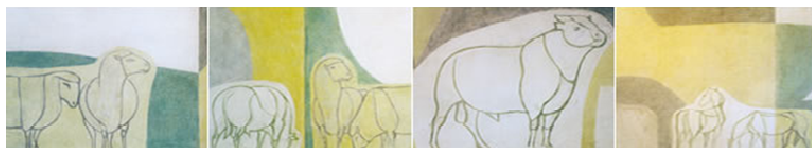
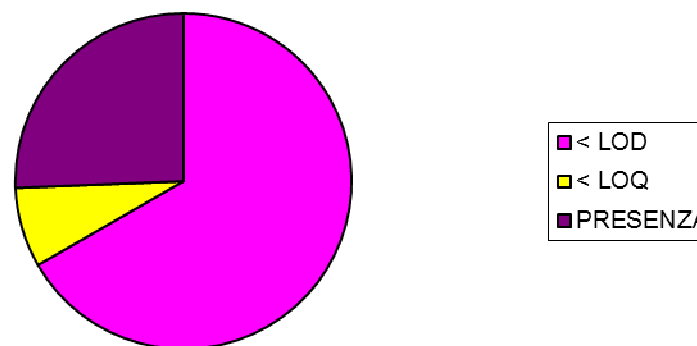
Zearalenone

Nel 2011 c'è stato un incremento della presenza dello ZEA mentre nel 2012 non si è verificato.

2012 Zearalenone

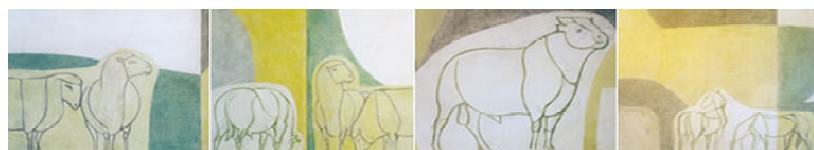
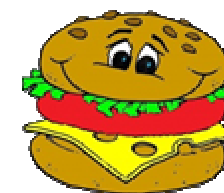


2011 ZEARALENONE



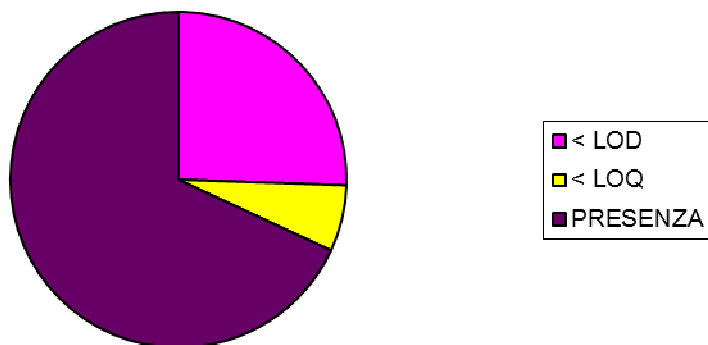
Fumonisina B1 e B2

Cromatografia liquida con derivatizzazione “a sandwich” nel loop con OPA/MCE ovvero nella siringa dell’HPLC viene prelevato il derivatizzante poi il campione e di nuovo il derivatizzante e iniettato nella colonna.



I risultati: FB1

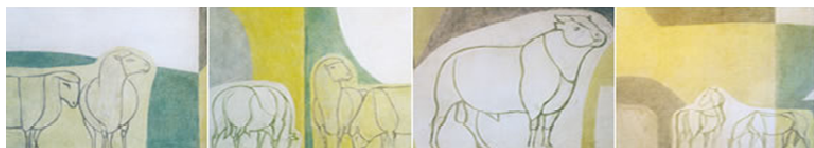
2011 FUMONISINA B1



2012 Fumonisin B1



Il mais è la matrice più contaminata dalle fumonisine

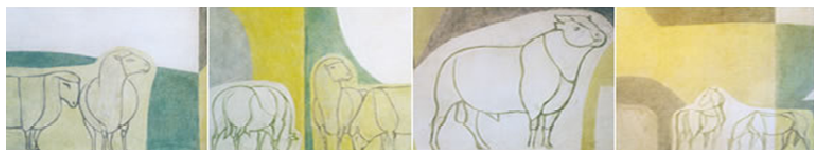
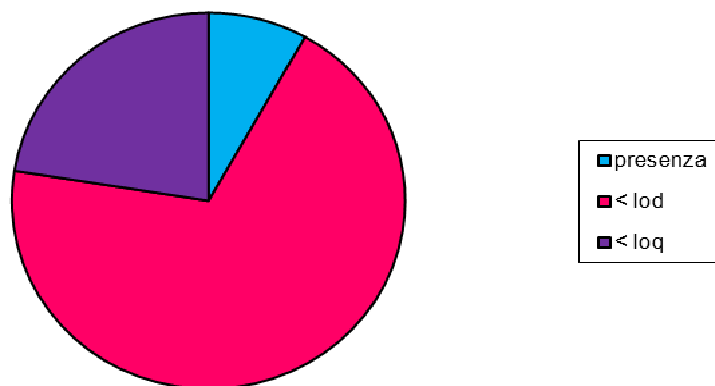


I risultati: FB2

2011 FUMONISINA B2

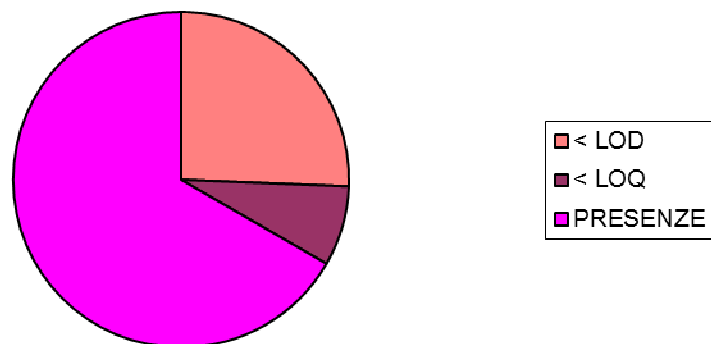


2012 Fumonisin B2

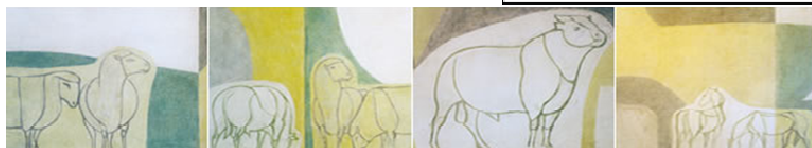
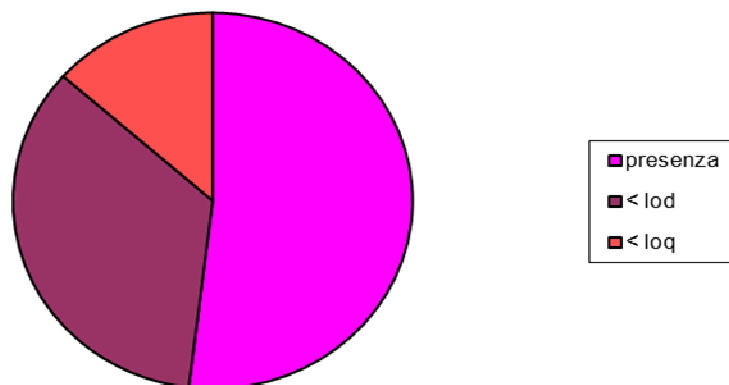


Deossinivalenolo

2011 Deossinivalenolo (DON)

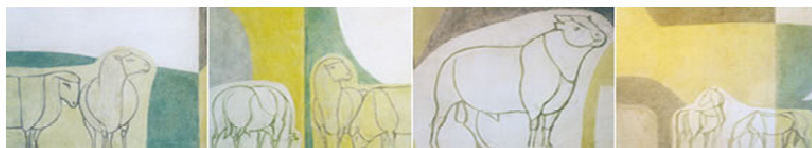


2012 Deossinivalenolo (DON)



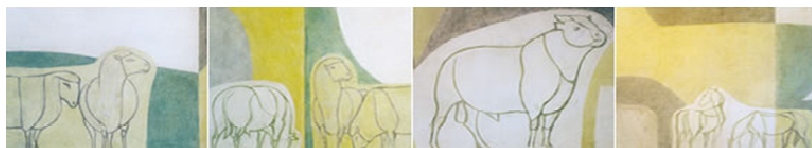
Niente paura perché...

E' vero che il DON è la micotossina
più presente ma è anche la meno
tossica!!!!



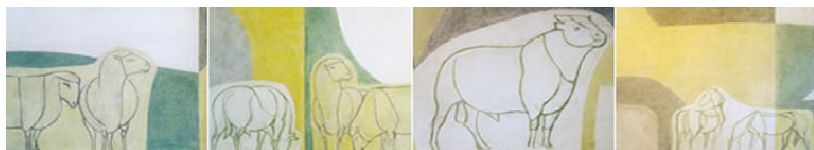
Aflatossina M1

- Screening in ELISA
- Conferma in Cromatografia liquida a rivelazione fluorimetrica



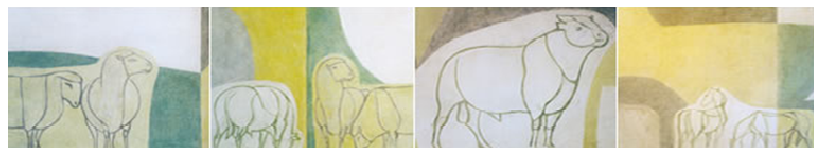
I risultati ottenuti

- 299 campioni nel 1 semestre 2011
 - 20 non negativi allo screening
 - 4 Non conformi per livelli di AFM1
-
- 537 Campioni nei 10 mesi del 2012
 - 46 non negativi allo screening
 - 14 Non conformi per livelli di AFM1



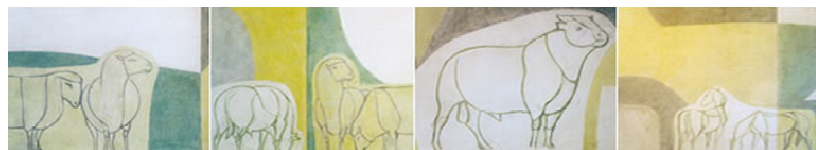
Conclusioni

- Confrontando i risultati ottenuti nei due semestri si può affermare che la presenza delle micotossine è in aumento forse a causa dei cambiamenti climatici.
- La determinazione delle micotossine permette di avere un quadro completo sulla contaminazione delle derrate alimentari e dei mangimi



Conclusioni

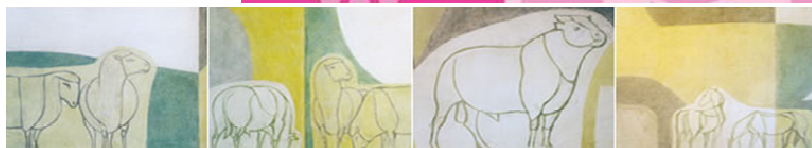
- Il DON è la micotossina più frequente
- Un metodo LC/MS/MS consentirebbe la determinazione di più micotossine contemporaneamente
- Nel 2012 c'è stato un aumento della presenza di AFB1 e quindi anche di M1 a causa dell'eccessivo caldo estivo





grazie
buona giornata

LOONEY TUNES, characters, names and all related indicia are trademarks of Warner Bros., © 2005



Tabita Mauti – 27 Novembre 2012 - IZS Roma