

# Questione micotossine: metodologie analitiche e criticità

Emanuela Gregori

Dip. Sicurezza alimentare, Nutrizione e  
Sanità pubblica veterinaria

[emanuela.gregori@iss.it](mailto:emanuela.gregori@iss.it)

# LE MICOTOSSINE (I)

Sono un gruppo di composti chimici ad **elevata tossicità** e a basso peso molecolare che si trovano in natura come metaboliti secondari di funghi filamentosi microscopici appartenenti prevalentemente ai generi *Penicillium*, *Fusarium* ed *Aspergillus*.

MICOTOSSINE	FUNGO PRODUTTORE	ALIMENTO
<b>Aflatossine</b> B1,B2,G1,G2,M1	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i>	Arachidi ed altre leguminose, mais ed altri cereali, semi oleaginosi, noci, mandorle. Latte e formaggi.
<b>Ocratossine</b> Ocratossina A e B	<i>Aspergillus ochraceous</i> , <i>Aspergillus nigr</i> <i>Penicillium verrucosum</i>	Orzo, mais ed altri cereali. Pane, pasta ed altri prodotti da forno. Vino, caffè, birra
<b>Zearalenone</b>	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Prodotti alimentari a base di mais.
<b>Tricoteceni</b> -Tossina T2 e HT2 -Deossinivalenolo	<i>Fusarium spp. (Roseum, Solani, Tricintum Sporotrichioides, Langsethiae, Culmorum, Graminearum)</i>	Mais, orzo ed altri cereali.
<b>Fumonisine</b>	<i>Fusarium verticilloides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i>	Mais e prodotti a base di mais.
<b>Citrinina</b>	<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Aspergillus spp</i> , <i>Monascus purpureus e M. ruber.</i>	Cereali, riso, frutta, verdura.

## MICOTOSSINE (II)

I funghi microscopici filamentosi (muffe) possono svilupparsi sulle colture vegetali in zone geografiche caratterizzate sia da clima fresco e temperato sia secco e umido, sia in campo sia durante le fasi stoccaggio.



La produzione della micotossina è influenzata da

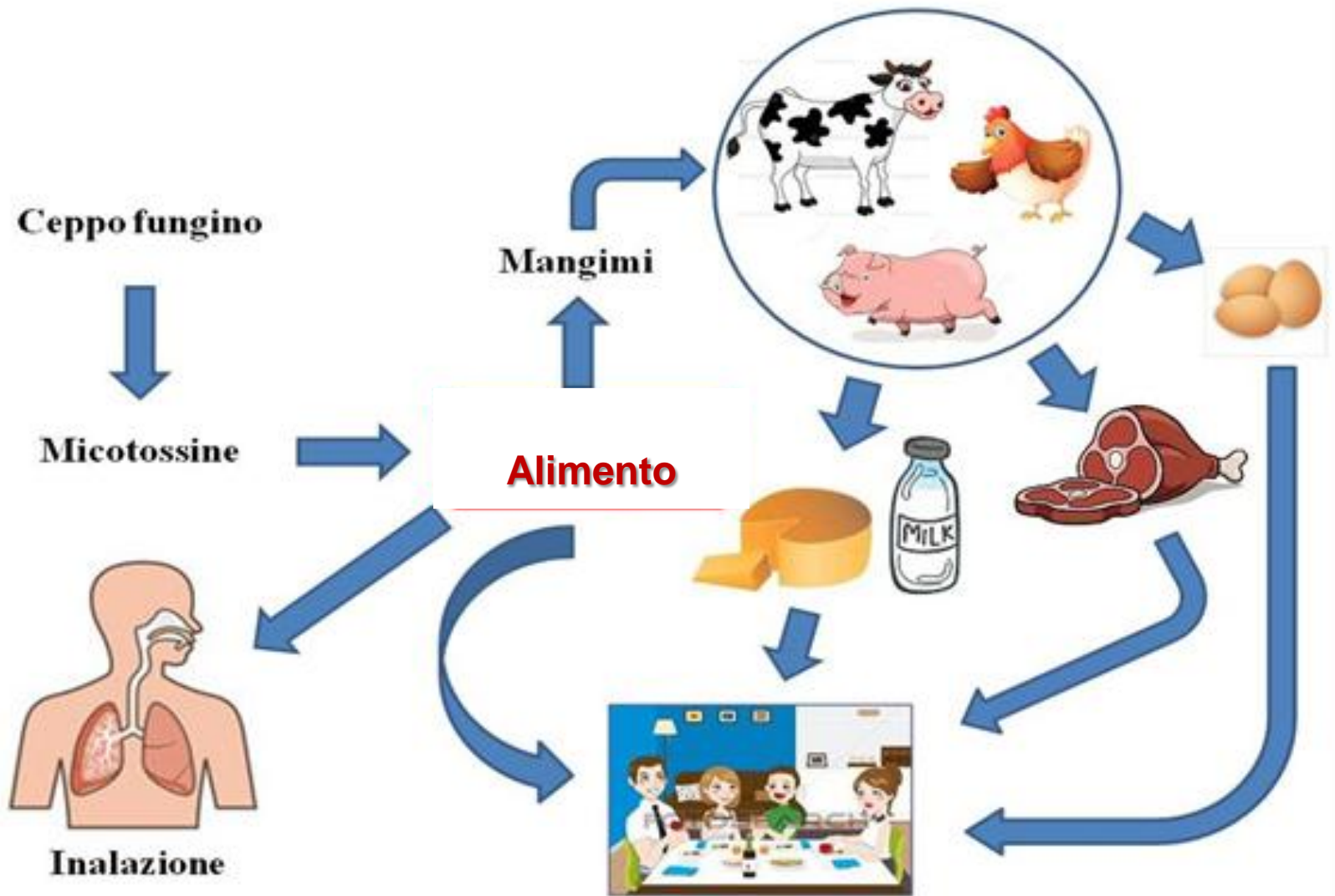
- condizioni climatiche e ambientali
- pratiche di coltivazione e conservazione
- tipo di substrato

## MICOTOSSINE (III)

- Sono sostanze dotate di elevato potere cancerogeno
- Sono sostanze che manifestano tossicità croniche e raramente acute
- Sono sostanze termostabili
- Sono fortemente elettrostatiche
- Sono ubiquitariamente presenti sul territorio
- Presentano una tipologia di contaminazione eterogenea (a macchia di leopardo)

<b>Micotossina</b>	<b>Effetto</b>
<b>Aflatossina B1</b>	Cancerogeno, epatotossico, immunosoppressore
<b>Ocratossina A</b>	Nefrotossico, teratogeno, immunosoppressore, cancerogeno
<b>Fumonisina B1</b>	Neurotossico, cancerogeno, citotossico
<b>Tricoteceni</b>	Immunosoppressore, dermatotossico, emorragico
<b>Zearalenone</b>	Estrogenosimile
<b>Citrinina</b>	Nefrotossico

# Vie di esposizione



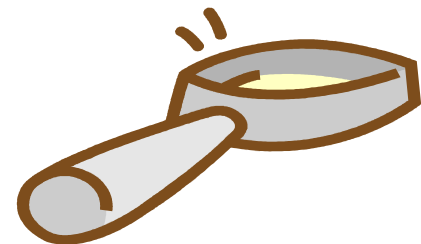
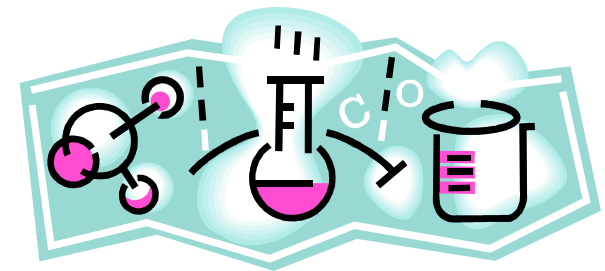
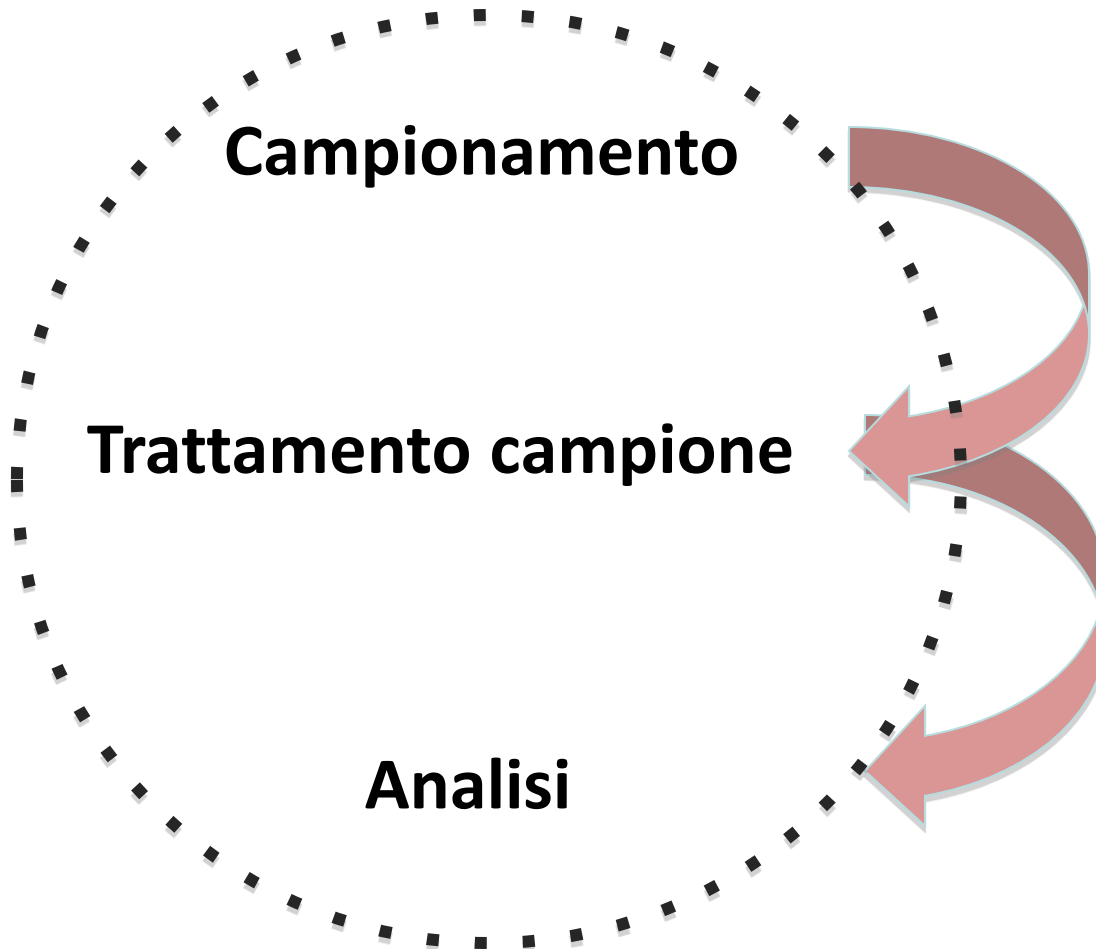
Le micotossine non si riscontrano solo  
nelle derrate alimentari ma possono  
residuare anche nelle erbe medicinali

.....

I prodotti botanici possono contenere delle  
micotossine....



# Filiera analitica





# Errori nella catena analitica



# Schema generale di un piano di campionamento

## Identificazione della partita da campionare

- Identificazione della partita o della sottopartita
  - Valutazione della grandezza della partita o sottopartita
- Valutazione del tipo di campionamento da effettuare (statico vs dinamico)

## Prelievo

- Calcolo dei campioni incrementali da prelevare
  - Prelievo dei campioni incrementali
- Formazione del campione globale combinando tutti i campioni incrementali

## Formazione delle aliquote

- Omogeneizzazione del campione globale
  - Macinazione del campione globale
- Formazione delle aliquote (a secco o tramite formazione dello slurry)

# Campionamento

- Contaminazione eterogenea
- Rappresentatività del lotto
- Campionamento materie prime
- Campionamento prodotti finiti

Campione incrementale e campione di laboratorio

# Scelta del metodo analitico

## FIT FOR PURPOSE!

- Autocontrollo
  - Controllo ufficiale
  - Monitoraggio
- Metodo ufficiale
  - Metodo normalizzato
  - Metodo interno
- Metodo di screening
  - Metodo di conferma
  - Metodo qualitativo/quantitativo

# Trattamento del campione

- Omogeneizzazione a secco o umida
- Corretta quantità aliquota analitica
- Considerazioni sulla tipologia di prodotto:  
    differenza tra capsule molli e liquido
- Compatibilità tra ingredienti e metodo estrattivo

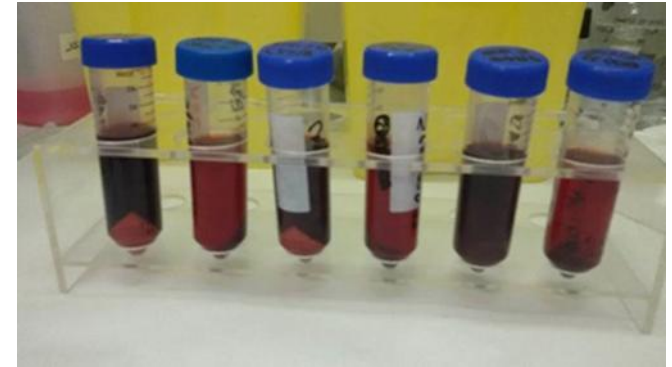


# Fasi metodo analitico

- Estrazione analita
- Purificazione
- Analisi strumentale
- Analisi statistica dei risultati sperimentali



# 1. Estrazione



Allontanare la micotossina dalla matrice possibilmente in un solvente utilizzabile nelle fasi successive.

Miscele utilizzate: metanolo-acqua  
acetonitrile-acqua

Strumentazioni: bagnetto ad ultrasuoni  
estrattore ASE  
(Accelerated Solid Extraction)  
estrattore SCF  
(Super Critical Fluid)

## 2. Purificazione

Concentrare la micotossina ed eliminare possibili interferenti dovuti alla complessità della matrice

Tecniche SPE (Solid-Phase Extraction)

Tecniche immunoenzimatiche (IAC)

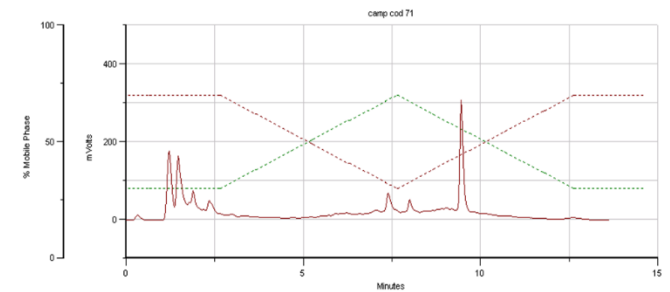
Tecniche multifunzionali



# 3. Analisi strumentale

## 3a. Metodi strumentali tradizionali

- CROMATOGRAFIA LIQUIDA
- GAS CROMATOGRAFIA
- SAGGI IMMUNOENZIMATICI (ELISA)



# 3b. Metodi strumentali alternativi

Immunosaggi/immunosensori:

- Immunosaggi a membrana (Flow-Through, FIA) - Lateral Flow Devices (LFD) o dipsticks
- Immunosaggi basati sulla Polarizzazione di Fluorescenza (FPIA) –
- Immunosaggi elettrochimici (SPE) –
- Biosensori basati sulla Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) –
- Immunosaggi basati sulla tecnologia Luminex (Multi Analyte Profiling) –

Array di biosensori

Spettroscopia infrarossa (NIR, MIR, FT-NIR)

Naso elettronico (MOS)

Metodi che utilizzano recettori alternativi (frammenti di anticorpi, peptidi, molecularly imprinted polymers, aptameri)

# Metodi strumentali tradizionali (I)

## CROMATOGRAFIA LIQUIDA

- La separazione in HPLC rappresenta il metodo principale per la determinazione delle micotossine
  - rivelazione spettrofluorimetrica per aflatossine, fumonisine, ocratossine e zearalenone**
  - rivelazione UV per deossinivalenolo e patulina.**
- Le aflatossine B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub>, fumonisine non presentano un elevato assorbimento nell'UV, né hanno gruppi che diano elevata fluorescenza naturale alla molecola
  - derivatizzazione pre-post colonna
- Tecniche ifenate accoppiamento con SPETTROMETRIA DI MASSA

# Metodi strumentali tradizionali (II)

- LC-MS/LC-MS/MS

La cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa è caratterizzata da elevata sensibilità, consente l'analisi simultanea di più micotossine e permette di evitare il passaggio di purificazione del campione.

È particolarmente utile per la caratterizzazione e l'identificazione delle cosiddette micotossine coniugate, in cui la tossina è legata a sostanze più polari come glucosio o altri zuccheri.

# Metodi strumentali tradizionali (III)

## Gas cromatografia

È il metodo di elezione per la determinazione dei tricoteceni T-2 e HT-2, poiché queste tossine non mostrano un assorbimento significativo nell'intervallo UV-visibile e non sono fluorescenti.

## Saggio ELISA

(Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

è un saggio basato sull'alta specificità di legame degli anticorpi per la struttura tridimensionale molecolare di un analita o di una famiglia di molecole. Il legame tra antigene ed anticorpo avviene generalmente nei pozzetti di una micropiastra e la reazione di immunobinding è rivelata mediante misurazione dell'intensità del colore sviluppato da un enzima, generalmente una perossidasi, legato alternativamente all'anticorpo o all'antigene: il cosiddetto "coniugato" o tracciante.

# Pro e **contro** HPLC/GC

- Ottima sensibilità
  - Ottima selettività
  - Buona ripetibilità
  - Tempi di analisi relativamente brevi
  - Metodi ufficiali disponibili (AOAC)
  - Possibilità di automatizzazione
- 
- **Costo della strumentazione**
  - **Costo dell'analisi**
  - **Esperienza del personale**
  - **Derivatizzazione (aflatossine, fumonisina)**
  - **Uso di solventi organici**

# PRO e **Contro** ELISA

- Preparazione del campione semplice
- Equipaggiamento mediamente costoso
- Alta sensibilità
- Valida per screening
- Analisi simultanea di molti campioni
- **Cross-reattività con altre micotossine (specificità)**
- **Effetti matrice**
- **Presenza di falsi positivi/negativi**
- **Richiede analisi di conferma**
- **Ripetibilità e riproducibilità critiche**
- **Esperienza del personale**

## 3b. Metodi strumentali alternativi

# Saggi immunoenzimatici strumentali

- Biosensori:
  - Ottici
    - Colorimetrici, fluorescenza, chemiluminescenza
    - Surface plasmon resonance (SPR)
  - Elettrochimici
- Fluorescence polarization immunoassay (FPIA)
- Capillary electrophoretic immunoassay (CEIA)

Strumentazioni portatili

Analisi semi-quantitative

Basati su interazioni eterogenee (ELISA, biosensors) o omogenee (FPIA, CEIA).



## 3b. Metodi strumentali alternativi

### Saggi immunoenzimatici non strumentali

- Lateral flow
- Dipstick *basati su membrane*
- Flow-through
  
- Tandem column *basati su gel*

Valutazione visiva: SI/NO (presenza/assenza sopra cut-off limit) o analisi semiquantitativa;

Basati su interazioni eterogenee tra l'analita in soluzione e l'immunoreagente su membrana o gel

# Perché scegliamo un test rapido?

- richiesta di controllare un gran varietà di contaminanti
- fattori economici
  - ▶ risparmio costi
    - strumentazione meno costosa
    - materiali meno costosi
  - ▶ risparmio nei tempi
- possibilità di lavorare in-situ
- approccio HACCP
  - ▶ analisi presso tutti i punti critici della filiera

# Requisiti di un test rapido in-situ

## FIT FOR PURPOSE!

- Adeguata capacità di rivelazione;
- Buona accuratezza (~~risultati falsi negativi~~);
- Validazione del metodo
- Analisi veloci
- Semplicità d'uso
- Semplicità nell'elaborazione dei risultati.

## **Cosa vuol dire.....semplicità d'uso!**

- Estrazione facile
- Minima manipolazione dei campioni e delle reagenti
- Riduzione nei passaggi dell'analisi
- Tempi di analisi ridotti
- Non utilizzare solventi o reagenti pericolosi

## **Cosa vuol dire.....semplicità nell'elaborazione dei risultati!**

- Valutazione visiva (preferibile!);
  - Facilità nel distinguere campioni positivi da quelli negativi
  - Presenza di un campione di controllo
- Valutazione strumentale (semplice, maneggevole e a basso costo)

# PRO e Contro LFD

- Rapidità di esecuzione
- Non è necessaria la purificazione
- Basso costo della apparecchiatura
- Facile da usare non necessaria alta qualifica del personale
- Discreta esattezza
- Buona sensibilità (limiti di legge)
- Uso limitato di solventi organici
- Possibilità di essere utilizzati in loco
  
- Effetto matrice
- Possibilità di falsi positivi/negativi
- Metodi esistenti non validati
- Cross-reattività con altre micotossine
- Precisione critica



*Review*

## A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines

Lei Zhang <sup>1</sup>, Xiao-Wen Dou <sup>1</sup>, Cheng Zhang <sup>1</sup>, Antonio F. Logrieco <sup>2,\*</sup> and Mei-Hua Yang <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; zhanglei-85@163.com (L.Z.); douxiaowen573@163.com (X.-W.D.); zcmycotoxin@163.com (C.Z.)

<sup>2</sup> National Research Council of Italy, CNR-ISPA, Via G. Amendola, 122/O, I-70126 Bari, Italy

\* Correspondence: antonio.logrieco@ispa.cnr.it (A.F.L.); yangmeihua15@hotmail.com (M.-H.Y.); Tel.: +86-10-5783-3277 (M.-H.Y.)

Received: 13 December 2017; Accepted: 30 January 2018; Published: 2 February 2018

**Abstract:** The presence of mycotoxins in herbal medicines is an established problem throughout the entire world. The sensitive and accurate analysis of mycotoxin in complicated matrices (e.g., herbs) typically involves challenging sample pretreatment procedures and an efficient detection instrument. However, although numerous reviews have been published regarding the occurrence of mycotoxins in herbal medicines, few of them provided a detailed summary of related analytical methods for mycotoxin determination. This review focuses on analytical techniques including sampling,

**GRAZIE**