



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI AGRARIA

Dipartimento del Territorio e Sistemi agro-Forestali
Sezione Patologia Vegetale

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

CONTAMINAZIONI DA AFLATOSSINE NEI PRINCIPALI PRODOTTI AGRICOLI

Relatore: Prof. Roberto Causin

Laureando: Zattere Matteo

Matricola n. 553058

ANNO ACCADEMICO 2009- 2010

INDICE

1. L'EVOLUZIONE DEL CONCETTO DI QUALITÀ ALIMENTARE NELLA STORIA DELL'UOMO	
1.1 I diversi concetti di qualità alimentare	12
1.1.1 La qualità chimico/nutrizionale	13
1.1.2 La qualità organolettica	13
1.1.3 La qualità legale	14
1.1.4 La qualità di origine	14
1.1.5 La qualità igienico/sanitaria	15
2. CONTAMINANTI ALIMENTARI	
2.1 Nitrati	17
2.2 Metalli pesanti	19
2.3 3-monocloro-1,2-propandiolo (3-MCPD)	25
2.4 Diossine e PCB	26
2.5 Idrocarburi policiclici aromatici	32
2.6 Residui di antiparassitari	37
3. MICOTOSSINE	
3.1 Ocratossine	44
3.1.1 Ocratossina A	45
3.2 Fumonisine	48
3.3 Zearalenoni	51
3.4 Aflatossine	54

3.4.1	Genere <i>Aspergillus</i>	57
3.4.1.1	<i>Aspergillus flavus</i>	59
3.4.1.1.1	Sintesi delle aflatossine, via metaboliche e geni coinvolti	62
3.4.1.1.2	Fattori che influiscono sulla sintesi delle aflatossine	67
3.4.1.1.3	Tossicità delle aflatossine	71
3.4.1.1.4	Aflatossina M1	73
3.4.1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	74
3.4.1.3	<i>Aspergillus niger</i>	77
3.4.1.4	<i>Aspergillus glaucus</i>	79
3.4.1.5	<i>Aspergillus nidulans</i>	80
3.4.1.6	<i>Aspergillus oryzae</i>	82
3.4.1.7	<i>Aspergillus terreus</i>	83
3.4.1.8	<i>Aspergillus ustus</i>	84
3.4.1.9	<i>Aspergillus versicolor</i>	85
4.	ALIMENTI CONTAMINATI DA AFLATOSSINE	
4.1	Mais	87
4.2	Altri cereali	95
4.3	Arachide	97
4.4	Cotone	102
4.5	Noci ed altri frutti a guscio	104
5.	MODELLI REVISIONALI	108
6.	CONCLUSIONI E RINGRAZIAMENTI	111

RIASSUNTO

La sicurezza alimentare ai giorni nostri riveste un cardine fondamentale per la nostra società. Se guardiamo a pochi decenni fa, nei quali si ricercava la copertura alimentare di tutta la popolazione, le parole qualità, tracciabilità, rintracciabilità e trasparenza nella trasformazione non venivano mai menzionate. In questi ultimi anni però, questi concetti sono sempre più al centro dell'attenzione comune, essendo diventati cardini nella produzione e distribuzione delle derrate agricole. La qualità, in particolar modo, riveste il ruolo predominante nelle caratteristiche di un prodotto alimentare, e può essere espressa in molti modi a seconda dei parametri utilizzati. In particolare, se si guardano le colture tipiche del nostro paese, quali mais, riso, grano e leguminose, la qualità è rappresentata dall'assenza delle micotossine.

Queste tossine, sono prodotte da vari ceppi fungini, ognuno prediligendo una coltura e/o un periodo del ciclo di produzione particolare, colpendo in particolar modo granaglie e mangimi. Come in seguito sarà esplicitato, le problematiche che queste tossine portano, oltre ad uno scadimento del prodotto, sono di natura patologica. Le tossine hanno un'azione cancerogena, teratogena e mutagena verso l'uomo e gli animali, in special modo le aflatossine, oggetto del mio studio, sono le più pericolose nei confronti dell'uomo. Si capisce quindi che la possibilità di ritrovarsi nel cibo che viene mangiato delle tossine così pericolose, ha fatto muovere i vari organi predisposti al controllo, da quello legislativo a quello della ricerca. L'Unione Europea e il nostro paese, hanno sin da subito adottato una politica di pronto intervento e hanno via via attuato provvedimenti con lo scopo di disciplinare questo fenomeno. Sono stati fissati limiti massimi sulla contaminazione sia degli alimenti sia nei mangimi, che tuttora sono tra i più bassi in tutto il mondo.

Per l'uomo, le tossine più cancerogene sono rappresentate dalle aflatossine, prodotte dal genere fungino *Aspergillus*, che nel nostro paese colpisce in particolar modo il mais, mentre in altri paesi colpisce arachidi, noci, nocciole, mandarle e pistacchi. Le condizioni climatiche del nostro paese, per fortuna, sono, solo in certe annate particolarmente difficili, adatte allo sviluppo di queste tossine. La lotta a queste tossine, si sviluppa lungo tutta la filiera produttiva, poiché la loro produzione può avvenire in qualunque momento, dal campo allo stoccaggio. La combinazione di buone pratiche agricole, in associazione all'uso del controllo biologico, sviluppo di

particolari cultivar resistenti e il controllo lungo tutti i vari processi produttivi può prevenire la formazione di queste tossine. Attraverso l'inoculo nel terreno di ceppi non tossigeni di *Aspergillus*, si è riusciti a dimostrare che il controllo biologico, in pre e post-raccolta, è possibile nel mais e arachidi. Nel caso delle noci, si è scoperta una varietà che produce un acido che riesce ad inibire la produzione di aflatossine. Benché l'utilizzo congiunto di tutte queste pratiche sia un ottimo modo per controllare lo sviluppo delle aflatossine, non sempre si riesce a evitare la produzione di aflatossine. Nel caso del mais, è stato messo a punto un modello epidemiologico, il quale si propone l'obiettivo di definire, in modo univoco e semplice la presenza di condizioni favorevoli allo sviluppo dei funghi produttori di micotossine. Si può quindi affermare che la soluzione, o almeno il contenimento del problema, sia da ricercare attuando tutti gli accorgimenti necessari per impedire lo sviluppo di ceppi tossigeni di *Aspergillus*, partendo dalla scelta della semente, all'attuazione di pratiche agronomiche idonee fino a tutti quei processi di post-raccolta atti a non intaccare il prodotto.

ABSTRACT

Nowadays alimentary safety is an essential hinge for our society. If we look over the last decades, in which food coverage for the whole population was aimed, words such as quality, traceability and transparency were never mentioned. In the last period, however, they have raised more and more the focus of the attention, becoming hinges of the production and distribution of the foodstuffs. Quality, in particular, is given high relevance in characteristics of food, and can also be expressed in several ways, according to the used parameters. In particular, if we look at the typical cultivations of our land, such as rice, corn, wheat and legumes, quality is represented by the absence of micotoxines.

These toxins are yielded by several fungal stumps, and each of them prefers a cultivation and a particular period of the production cycle, hitting in particular way cereals and fodders. As we will say in a short while, the problems caused by these toxins, besides the product decay, has pathological consequences.

Toxins has carcinogenic effects, teratogenic and mutagenic for menkind. This explains why the possibility of finding toxins in our food has mobilized various organisms of control, both legislative and of research. The European Union and our country have been adopted since the beginning a policy of early intervention and have gradually implemented measures in order to regulate this phenomenon. Maximum limits on contamination in both food and feed were set, limits that are still resisting among the lowest worldwide.

For humans, the toxins are represented by more carcinogenic aflatoxins, produced by the fungus *Aspergillus* genus, which in our country affects especially the corn, while in other countries affects peanuts, walnuts, hazelnuts, almonds and pistachios. The climatic conditions of our country, fortunately, are extremely difficult only in certain years, suitable for the development of these toxins. The fight at these toxins spread throughout the production chain, since their production can occur at any time, from field to storage.

The combination of good agricultural practices, in association with the use of biological control, development of specific resistant cultivars and control throughout the various production processes can prevent the formation of these toxins. Through the inoculum in the soil of non toxigenic strains of *Aspergillus*, has succeeded in

demonstrating that biological control in pre-and post-harvest is possible in corn and peanuts. In the case of nuts, has discovered a variety that produces an acid that can inhibit the production of aflatoxins. Although the joint use of all these practices is a great way to control the development of aflatoxins are not always able to avoid the production of aflatoxins. In the case of maize, was developed an epidemiological model, which have the objective to define, unambiguously and simplicem the presence of conditions conducive to the development of mycotoxin-producing fungi. One can therefore conclude that the solution, or at least contain the problem, is to be found performing all the necessary precautions to prevent the growth of toxigenic strains of *Aspergillus*, starting from the choice of the seed, the implementation of agricultural practices appropriate to all those processes of post-harvest measures not to damage the product.

Capitolo 1

L'EVOLUZIONE DEL CONCETTO DI QUALITÀ ALIMENTARE NELLA STORIA DELL'UOMO

Nelle varie tappe dell'evoluzione dell'uomo, l'alimentazione è sempre stata la chiave per un'ottimale espansione e moltiplicazione della nostra specie. La disponibilità o meno di cibo, ha sempre portato con se varie conseguenze, tra queste varie carestie oppure decenni di crescita esponenziale della popolazione. All'incremento della disponibilità di cibo, e successivamente alla disponibilità di alimenti di origine animale, è sempre coincisa un miglioramento del tenore di vita della popolazione. Il pensiero predominante è sempre stato quello di poter disporre di una quantità sufficiente di cibo da sfamare l'intera popolazione, e nella maggior parte dei casi, gli alimenti adibiti a questo compito sono rappresentati soprattutto da cereali, ortaggi e frutta. Questi hanno sempre fornito la base dell'alimentazione umana per migliaia d'anni e hanno offerto la soluzione in tempi di crisi o di carestia. In parallelo, l'allevamento di specie zootecniche, soprattutto bovini, è dipeso sostanzialmente dalla produzione oltre il fabbisogno umano delle materie prime. Agli albori della nostra civiltà l'allevamento di specie zootecniche, era di tipo pastorizio, dove molto raramente agricoltura e allevamento si fondevano dato il carattere nomade dell'allevamento e sedentario dell'agricoltura. Con il passare dei secoli però, l'allevamento di specie zootecniche ha assunto sempre più un carattere sedentario; questo fatto ha coinciso con il fabbisogno di produrre alimenti non solo per l'uomo, ma anche per gli animali. Questo bisogno, ha sicuramente influenzato in modo profondo l'agricoltura, spingendo la ricerca in tecniche atte all'incremento della produzione.

La continua evoluzione nel campo dell'agricoltura, la moderna disponibilità di concimi e trattamenti antiparassitari, ha portato ad un aumento della disponibilità di alimenti, sia ad uso umano che zootecnico. Il fatto che oramai la produzione copra ampiamente entrambi i fabbisogni, scongiurando definitivamente lo spettro di eventuali carestie, ha indotto la coscienza comune a focalizzare i suoi obiettivi produttivi verso altri aspetti. Con la copertura completa del fabbisogno, il consumatore ha cominciato a voler differenziare la sua dieta, aver accesso ad

alimenti provenienti da altri paesi e a selezionare specie per le proprie qualità organolettiche.

Con questa evoluzione dell'alimentazione e del consumo, si è arrivati a ricercare la sicurezza e soprattutto la qualità degli alimenti. Questo concetto di qualità tende ad essere diverso tra produttore e consumatore, come tra venditore e grossista.

La qualità è definita come *“l'insieme delle proprietà e caratteristiche di un prodotto o servizio che gli conferiscono l'attitudine a soddisfare bisogni espressi o impliciti”* (norma UNI EN ISO 8402).

1.1 I diversi concetti di qualità alimentare

Negli anni il concetto di qualità ha subito una profonda evoluzione, operata dagli stessi consumatori i quali, richiedendo prodotti sani, sicuri, nutrienti e ottenuti nel rispetto dell'ambiente da parte dei processi produttivi e del benessere animale, hanno definito i parametri che caratterizzano la qualità.

Accanto alla qualità richiesta dal consumatore (qualità percepita) vi è anche una qualità definita dalle industrie e dalla grande distribuzione organizzata (GDO) e che riguarda la tecnologia e la sicurezza alimentare (qualità oggettiva). Pertanto, alla base del concetto di qualità, sia per il consumatore sia per il produttore e il distributore, c'è la sicurezza alimentare, resa obbligatoria dalla normativa vigente. Diversi sono i fattori che concorrono a determinare la “qualità totale” di un alimento, tanto è vero che è possibile individuare una:

- **Qualità chimico/nutrizionale**
- **Qualità organolettica**
- **Qualità legale**
- **Qualità d'origine**
- **Qualità igienico/sanitaria**

E' inteso che mentre la qualità ricercata dalle industrie è un tipo di qualità così detta “oggettiva” e cioè ben definita, misurabile e verificabile, rispetto a determinati parametri standard e che è molto legata al concetto di “Sicurezza Alimentare”; quella richiesta dal consumatore è, invece, una qualità “percepita”, determinata da fattori

soggettivi e oggettivi e dipendente dal momento e/o dalla situazione; le industrie alimentari cercano di valutare in vari modi la qualità richiesta dal consumatore.

1.1.1 La qualità chimico/nutrizionale

La qualità chimico/nutrizionale di un alimento è data dal suo contenuto in proteine, lipidi e carboidrati ed è, quindi, la capacità nutritiva dell'alimento stesso. La qualità nutrizionale di un alimento può essere intesa sotto:

- l'aspetto quantitativo, che è dato dalla quantità di energia chimica che esso apporta;
- L'aspetto qualitativo, che è dato dalla combinazione degli elementi nutritivi in esso contenuti.

La qualità nutrizionale degli alimenti va garantita a ogni livello del processo produttivo, a partire dalla scelta delle materie prime; alcuni trattamenti, poi, possono influenzare il contenuto in elementi nutritivi di un alimento, il calore ad esempio denatura le proteine, con conseguente perdita delle proprietà biologiche delle stesse; anche un corretto processo di conservazione/distribuzione ha un ruolo fondamentale nella garanzia della qualità chimico/nutrizionale degli alimenti.

1.1.2 La qualità organolettica

La qualità organolettica di un alimento è data dalla valutazione, da parte del consumatore, di alcune caratteristiche dell'alimento stesso, quali l'aspetto, l'aroma e la consistenza, percepite attraverso gli organi di senso (qualità sensoriale). Si tratta pertanto di valutazioni soggettive del consumatore, che sono notevolmente influenzate da fattori psicologici, sociali e culturali.

Con la vista l'alimento è valutato per il suo colore, la sua forma, la sua dimensione ed anche per il modo in cui è presentato. La vista è, tra i cinque sensi, quella che maggiormente influenza la scelta di un alimento e che condiziona a sua volta gli altri organi di senso. Con l'olfatto è percepito l'aroma e l'odore di un alimento, che può essere gradevole o sgradevole. Con il tatto è percepita la consistenza o texture (compattezza, durezza, densità, ecc) di un prodotto alimentare e, nel caso di alimenti freschi, lo stato di conservazione e/o maturazione. Con il gusto sono percepiti

l'amaro, il salato, il dolce e l'acido di un alimento. Con l'udito sono percepite caratteristiche particolari che possono indicare la freschezza, attraverso il rumore collegato alla masticazione, di alcuni prodotti alimentari (biscotti, cereali, ecc.).

1.1.3 La qualità legale

La qualità legale è quella garantita dall'insieme di norme che interessano il settore alimentare: per essere definito di qualità un alimento deve rispondere a determinati requisiti minimi di legge. La legislazione Italiana tutela, con un elevato numero di leggi, la salute del cittadino. Accanto alla normativa che abbraccia tutto il settore alimentare, vi è una normativa più specifica, riguardante un determinato settore alimentare, ed un'ancora più specifica che riguarda un particolare alimento nell'ambito di quel settore. A tal proposito, è stato messo a punto uno strumento d'autocontrollo igienico, il sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), che mira all'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo delle varie fasi del ciclo produttivo: per ogni alimento sono individuati e valutati i pericoli specifici, che mirano all'igiene e alla sanità, e sono stabilite le misure atte a prevenire tali rischi. Rappresenta uno strumento a garanzia della qualità legale degli alimenti, infatti, nell'art. 3 comma 1 del D.L. 155/97 è sancito che *“il responsabile dell'industria deve garantire che la preparazione, la trasformazione, la fabbricazione, il confezionamento, il deposito, il trasporto, la distribuzione, la manipolazione, la vendita o la fornitura, compresa la somministrazione dei prodotti alimentari siano effettuati in modo igienico”*.

1.1.4 La qualità di origine

Nel 1992 la Comunità Europea ha creato alcuni sistemi noti come DOP (Denominazione di Origine Protetta), IGP (Indicazione Geografica Protetta) e STG (Specialità Tradizionale Garantita) per promuovere e tutelare i prodotti agro-alimentari. I marchi DOP e IGP tutelano ulteriormente il consumatore, garantendo che *“Un prodotto agricolo o alimentare che beneficia di uno dei tipi di riferimento summenzionati dovrebbe soddisfare determinate condizioni elencate in un disciplinare”* (art. 10 Reg. CE 510/2006).

1.1.5 La qualità igienico/sanitaria

La qualità igienico-sanitaria di un alimento è data dalla rispondenza a requisiti d'igiene minimi, stabiliti per legge, relativi al “contenuto” in sostanze di natura chimica, di microrganismi e di loro metabolici (tossine). Secondo il Reg. CE 852/2004 per “igiene degli alimenti” s'intendono le misure e le condizioni necessarie per controllare i pericoli e garantire l'idoneità al consumo umano di un prodotto alimentare tenendo conto dell'uso previsto.

I residui chimici presenti in un alimento possono derivare da:

- Una contaminazione primaria, all'origine del processo produttivo, dovuta alla presenza di residui di pesticidi, alla presenza di metalli pesanti (specie per le coltivazioni poste lungo le strade), all'uso eccessivo di farmaci in allevamento, reso ancora più grave dal non rispetto dei tempi di sospensione previsti per legge.
- Una contaminazione secondaria, che può avvenire durante il trasporto, lo stoccaggio o la vendita dei prodotti alimentari se non sono rispettate le normali norme igieniche.

La presenza di microrganismi all'interno degli alimenti oltre a determinare alterazioni quali putrefazione, irrancidimento, fermentazione degli zuccheri, con conseguente variazione delle caratteristiche organolettiche, può anche causare:

Intossicazioni alimentari: si hanno in seguito al consumo di alimenti contenenti tossine prodotte da microrganismi che si sono moltiplicati sull'alimento prima del suo consumo. Il microrganismo può anche essere morto o addirittura assente, quello che determina l'intossicazione è la tossina prodotta.

Infezioni alimentari: si hanno in seguito al consumo di alimenti contenenti microrganismi vivi, che raggiunto l'intestino si moltiplicano determinando appunto l'infezione.

Tossinfezioni alimentari: si hanno in seguito al consumo d'alimenti contenenti microrganismi vivi e le loro tossine.

Per garantire la qualità igienico/sanitaria degli alimenti, un ruolo fondamentale è rivestito dall'operatore del settore alimentare, sia esso produttore, che distributore, che venditore: *“La sicurezza degli alimenti va garantita lungo tutta la catena*

alimentare, a cominciare dalla produzione primaria” (Reg. CE 852/2004). Un altro regolamento comunitario afferma che “per garantire la sicurezza degli alimenti occorre considerare tutti gli aspetti della catena di produzione alimentare come un unico processo, a partire dalla produzione primaria inclusa, passando per la produzione di mangimi fino alla vendita o erogazione di alimenti al consumatore inclusa, in quanto ciascun elemento di essa presenta un potenziale impatto sulla sicurezza alimentare” (Reg. CE 178/2002). Come precedentemente accennato, lo strumento a garanzia della salute del cittadino, adottabile da tutti gli operatori del settore alimentare è il sistema HACCP.

Capitolo 2

CONTAMINANTI ALIMENTARI

Come già accennato, la qualità degli alimenti non si valuta solo in base alle caratteristiche intrinseche, quali colore, sapore, origine e tracciabilità, ma si valuta anche in base all'assenza sostanze contaminanti, che possono intaccare l'alimento e/o risultare tossiche per l'uomo. In merito a questo, l'Unione Europea continua a legiferare sulle quantità massime di:

- **Nitrati**
- **Metalli pesanti**
- **3-monocloro-1,2-propandiolo (3-MCPD)**
- **Diossine e PCB**
- **Idrocarburi policiclici aromatici**
- **Residui di antiparassitari**
- **Micotossine**

2.1 Nitrati

I nitrati ed i nitriti, in particolare, sono diffusi sia negli alimenti d'origine animale e vegetale sia nell'acqua. La maggior parte delle acque naturali ha un livello d'azoto nitrico al di sotto di 1 mg/L , anche se, diverse volte e in diverse aree, sono state misurate concentrazioni maggiori a 10 mg/L . La presenza di nitriti è indice d'inquinamento organico per cui l'acqua è da considerarsi non potabile .

Non è possibile un'alimentazione priva di questi composti, ciò che possiamo fare è cercare di non aggiungerne altri provenienti da conservati e inquinamento alimentare. I prodotti agroalimentari sono spesso contaminati da nitrati, aggiunti alle colture come fertilizzanti, e da nitriti presenti nei cibi di origine vegetale come contaminanti acquisiti durante la crescita, ed in quelli di origine animale principalmente come conservanti aggiunti.

Gli alimenti a cui i nitriti possono essere addizionati come conservanti sono: gli

insaccati (freschi, stagionati, cotti), i prosciutti (stagionati e cotti), le semiconserve non sterilizzate (würstel e mortadella), le conserve sterilizzate. I nitriti si riscontrano anche nelle carni affumicate, nei cereali e prodotti tostati, nel pesce. In alcuni paesi come Francia, Germania, Svezia ed Olanda i nitrati sono consentiti come conservanti anche nei prodotti caseari. Nel latte la concentrazione di nitrati presenti naturalmente è di 1-8 mg/Kg mentre nei formaggi ai quali sono addizionati per inibire fermentazioni secondarie, questa concentrazione cresce a 4-27 mg/Kg e si ritrovano concentrazioni di nitriti di 0,6-1 mg/Kg.

I nitrati tal quali, sono innocui, ma tendono a trasformarsi in nitriti dalla flora batterica della saliva, per poi ritornare nello stomaco.

I nitriti in ambiente acido (soprattutto nello stomaco) si trasformano in acido nitroso, il quale legandosi alle ammine da origine alle nitrosammine, composti dimostratesi cancerogeni. Inoltre i nitriti si legano all'emoglobina ossidandola a metaemoglobina, riducendo quindi il trasporto d'ossigeno ai tessuti. Questa circostanza è particolarmente pericolosa per i neonati (che assorbono una maggior quantità di nitriti), ai quali non vengono somministrate verdure ricche di nitrati fino all'ottavo mese di vita.

Alcuni individui adulti possono essere più sensibili di altri agli effetti dei nitrati. L'enzima metaemoglobina-riduttasi potrebbe essere poco sintetizzato o assente in alcune persone che presentano una mutazione ereditaria. Questi individui non possono metabolizzare la metaemoglobina velocemente come gli altri, portando ad un aumento dei livelli circolanti di metaemoglobina (il che implica che il loro sangue non è così ricco d'ossigeno). Quelli con l'acidità di stomaco insufficiente (tra cui alcuni vegetariani e vegani) possono essere a rischio. Ironicamente, l'aumento del consumo d'ortaggi a foglia che accompagna di solito queste tipologie di diete, può portare ad una maggiore assunzione di nitrato. Una gran varietà di patologie fisiche, tra cui allergie alimentari, asma, epatite e calcoli biliari, possono essere collegate con l'acidità di stomaco basso; quindi questi individui risultano essere molto sensibili agli effetti dei nitrati.

Prodotti	Tenori massimi (mg NO ₃ /kg)
----------	---

Spinaci freschi (<i>Spinacia oleracea</i>)	Raccolti fra il 1o ottobre e il 31 marzo	3 000
	Raccolti fra il 1o aprile e il 30 settembre	2 500
Spinaci in conserva, surgelati o congelati		2 000
Lattuga fresca (<i>Lactuca sativa</i> L.) (coltivata in ambiente protetto e in campo aperto)	Raccolta fra il 1o ottobre e il 31 marzo:	
	lattuga in coltura protetta	4 500
	lattuga coltivata in campo aperto	4 000
	Raccolta fra il 1o aprile e il 30 settembre:	
	lattuga in coltura protetta	3 500
	lattuga coltivata in campo aperto	2 500
Lattuga di tipo «Iceberg»	lattuga in coltura protetta	2 500
	lattuga coltivata in campo aperto	2 000
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini		200

2.2 Metalli pesanti

Si definiscono "metalli pesanti" quegli elementi che presentano le seguenti caratteristiche:

- densità superiore ai 5,0 g/cm³;
- comportamento simile ai cationi;
- spiccata attitudine a formare complessi;
- bassa solubilità dei loro idrati;
- stati di ossidazione diversi a seconda delle condizioni di pH ed Eh;
- grande affinità per i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi

I metalli pesanti, con l'eccezione del ferro e dell'alluminio, appartengono ai cosiddetti "elementi in traccia", presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1%. Le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce sono solitamente di parti per milione o per miliardo.

Sono considerati metalli pesanti: l'argento, il bario, il cadmio, il cobalto, il cromo, il manganese, il mercurio, il molibdeno, il nichel, il piombo, il rame, lo stagno, il titanio, il vanadio, lo zinco, il tallio, alcuni metalloidi, con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'arsenico, l'antimonio, il selenio e il bismuto.

Tra questi, gli elementi che determinano più spesso fenomeni d'inquinamento sono: il cadmio, il cobalto, il cromo, il rame, il manganese, il molibdeno, il nichel, il piombo, lo stagno, lo zinco, e il selenio.

I metalli pesanti sono naturalmente presenti nelle rocce, nel suolo, nelle piante e negli animali.

I fattori che influenzano le soglie di tossicità dei metalli pesanti nel sistema suolo-coltura sono: il tipo di suolo, il pH, il contenuto di sostanza organica, minerali argillosi e proprietà chimiche e biochimiche del suolo. Il fattore intrinseco della pianta che più incide sull'assorbimento di metalli pesanti è il suo genoma, che regola l'assimilazione, la mobilitazione tra i vari organi e il sito di deposito. Inoltre, le interazioni suolo-microrganismi, svolgono un ruolo importante nella regolazione dei movimenti di metalli pesanti dal terreno.

Le possibili origini della contaminazione da metalli pesanti, nell'ambiente in generale e nella pedosfera in particolare, sono di tipo naturale o antropico.

La principale fonte naturale è il substrato geologico mentre tra le sorgenti d'origine antropica sono dovute alle attività civili ed industriali, responsabili di "input accidentali" legati essenzialmente a sorgenti puntiformi o lineari, ed alle pratiche agricole che rappresentano, invece, "input deliberati", areali, determinati dalle metodologie utilizzate normalmente in agricoltura.

Una delle sorgenti principali di emissioni gassose di metalli pesanti è rappresentata dai fumi prodotti dal consumo di combustibili per il riscaldamento, circa l'84% delle ceneri prodotte dalla combustione dei carboni sono volatili ed il loro contenuto in elementi in traccia è piuttosto variabile, dipendendo sia dal tipo di carbone sia dalle condizioni di combustione. Durante il processo estrattivo dei metalli, e le successive operazioni di fusione e lavorazione, possono disperdersi nell'ambiente rilevanti quantitativi di elementi inquinanti attraverso i fumi e le polveri, immessi dalle

ciminiere nell'atmosfera, ed i rifiuti liquidi rappresentati dalle acque utilizzate durante il ciclo produttivo.

Durante la combustione dei carburanti e dei lubrificanti necessari ai mezzi di trasporto si libera piombo, mentre l'usura dei pneumatici diffonde zinco: in entrambi i casi vi è associata una liberazione di cadmio.

L'applicazione ai suoli di fanghi di depurazione e/o compost con un eccessivo contenuto in cadmio, rame, nichel, piombo e zinco in particolare, riduce la resa delle colture o, comunque, peggiora la qualità dei prodotti; rame, nichel e zinco sono risultati i più fitotossici.

Per quanto riguarda gli apporti dovuti alle pratiche agricole, la maggior parte sono dovuti all'utilizzo dei fertilizzanti sia per il fatto che la concimazione viene ripetuta stagionalmente sia perché vengono ottenuti dalla lavorazione di rocce fosfatiche (le Fosforiti) contenenti quantità variabili di arsenico, cadmio, piombo, bismuto e zinco. Il cobalto, il rame e lo zinco sono contenuti, anche in notevoli quantità, nelle deiezioni degli animali, che, assimilandone soltanto percentuali molto basse (circa il 5%), fanno sì che le loro feci e le loro urine ne risultano molto arricchite. I problemi ambientali legati all'impiego delle deiezioni animali nascono, poiché, soprattutto nelle aziende ad indirizzo zootecnico e cerealicolo-zootecnico, vengono ridistribuiti su aree limitate o limitatissime per lunghi periodi di tempo.

Stagionali apporti di rame, mercurio, manganese, piombo, arsenico, stagno e zinco sono causati inoltre dall'uso di antiparassitari di varia natura.

I metalli pesanti, in particolare cadmio, mercurio e piombo, sono quelli maggiormente tossici per l'uomo. Questi elementi si accumulano nell'organismo determinando effetti nocivi a breve e lungo termine, diversi a seconda del metallo. Possono causare danni ai reni, al sistema nervoso e al sistema immunitario, e in certi casi avere effetti cancerogeni. I sintomi più classici d'intossicazione da metalli pesanti sono l'irritabilità ed instabilità dell'umore, depressione, cefalee, tremori, perdita di memoria, ridotte capacità visive. I soggetti maggiormente a rischio sono coloro che nella dieta privilegiano pesce e selvaggina, perché questi alimenti tendono ad accumulare quantità maggiori di contaminanti metallici rispetto alla quantità presente nell'ambiente circostante.

Prodotti	Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
Piombo	
Latte crudo, latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	0,020
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento	0,020
Carni (escluse le frattaglie) di bovini, ovini, suini e pollame	0,10
Frattaglie di bovini, ovini, suini e pollame	0,50
Muscolo di pesce	0,30
Crostacei, ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>)	0,50
Molluschi bivalvi	1,5
Cefalopodi (senza visceri)	1,0
Cereali, legumi e leguminose	0,20
Ortaggi, esclusi quelli del genere Brassica, ortaggi a foglia, erbe aromatiche e funghi. Nel caso delle patate, il tenore massimo si applica alle patate sbucciate.	0,10
Ortaggi del genere Brassica, ortaggi a foglia e i seguenti funghi: <i>Agaricus bisporus</i> (prataioli), <i>Pleurotus ostreatus</i> (orecchioni), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	0,30
Frutta, escluse le bacche e la piccola frutta	0,10
Bacche e piccola frutta	0,20
Oli e grassi, compreso il grasso del latte	0,10
Succhi di frutta, succhi di frutta concentrati ricostituiti e nettari di frutta	0,050
Vini (compreso il vino spumante, esclusi i vini liquorosi), sidro, sidro di pere e vini di frutta	0,20
Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli	0,20
Integratori alimentari	3,0
Cadmio	
Carni (escluse le frattaglie) di bovini, ovini, suini e pollame	0,050
Carne di cavallo, escluse le frattaglie	0,20
Fegato di bovini, ovini, suini, pollame e cavallo	0,50
Reni di bovini, ovini, suini, pollame e cavallo	1,0
Muscolo di pesce	0,050
Muscolo di pesce dei seguenti pesci: palamita (<i>Sarda sarda</i>) sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>) anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>)	0,10

cefalo (<i>Chelon labrosus</i>) suro o sugarello (<i>Trachurus species</i>) luvaro o pesce imperatore (<i>Luvarus imperialis</i>) sgombro (<i>Scomber species</i>) sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) sardine del genere Sardinops (<i>Sardinops species</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species, Euthynnus species, Katsuwonus pelamis</i>) sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	
Muscolo di pesce dei seguenti pesci: tombarello (<i>Auxis species</i>)	0,20
Muscolo di pesce dei seguenti pesci: acciuga (<i>Engraulis species</i>) pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>)	0,30
Crostacei, ad eccezione delle carni scure del granchio, della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae e Palinuridae</i>)	0,50
Molluschi bivalvi	1,0
Cefalopodi (senza visceri)	1,0
Cereali, esclusi crusca, germe, grano e riso	0,10
Crusca, germe, grano e riso	0,20
Semi di soia	0,20
Ortaggi e frutta, esclusi ortaggi a foglia, erbe aromatiche, funghi, ortaggi a stelo, ortaggi a radice e patate	0,050
Ortaggi a stelo, ortaggi a radice e patate, escluso il sedano rapa. Nel caso delle patate il tenore massimo si applica alle patate sbucciate	0,10
Ortaggi a foglia, erbe aromatiche, sedano rapa e i seguenti funghi: <i>Agaricus bisporus</i> (prataioli), <i>Pleurotus ostreatus</i> (orecchioni), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	0,20
Funghi	1,0
Integratori alimentari	1,0
Integratori alimentari composti esclusivamente o principalmente da alghe marine essiccate o da prodotti derivati da alghe marine	3,0
Mercurio	
Prodotti della pesca e muscolo di pesce, escluse le specie elencate al punto 3.3.2. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae e Palinuridae</i>).	0,50
Muscolo di pesce dei seguenti pesci: rana pescatrice (<i>Lophius species</i>) pesce lupo (<i>Anarhichas lupus</i>) palamita (<i>Sarda sarda</i>)	1,0

<p>anguilla (<i>Anguilla species</i>) pesce specchio (<i>Hoplostethus species</i>) pesce topo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>) ippoglossso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) abadeco del Sudafrica (<i>Genypterus capensis</i>) marlin (<i>Makaira species</i>) rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> (<i>Lepidorhombus species</i>) triglia (<i>Mullus species</i>) abadeco (<i>Genypterus blacodes</i>) luccio (<i>Esox lucius</i>) palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>) cappellano (<i>Trisopterus minutus</i>) squalo portoghese (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) razze (<i>Raja species</i>) scorfano del genere <i>Sebastes</i> (<i>Sebastes marinus</i>, <i>S. mentella</i>, <i>S. viviparus</i>) pesce vela del Pacifico (<i>Istiophorus platypterus</i>) pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i>, <i>Aphanopus carbo</i>) pagello (<i>Pagellus species</i>) squali (tutte le specie) tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i>, <i>Ruvettus pretiosus</i>, <i>Gempylus serpens</i>) storione (<i>Acipenser species</i>) pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i>, <i>Euthynnus species</i>, <i>Katsuwonus pelamis</i>)</p>	
Integratori alimentari	0,10
Stagno (inorganico)	
Cibi in scatola diversi dalle bibite	200
Bibite in lattina, ivi compresi succhi di frutta e succhi di ortaggi	100
Alimenti in scatola per lattanti e alimenti a base di cereali per lattanti e bambini, esclusi i prodotti disidratati e in polvere	50
Alimenti in scatola per lattanti e alimenti di proseguimento (compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento), esclusi i prodotti disidratati e in polvere	50
Alimenti dietetici in scatola a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti, esclusi i prodotti disidratati e in polvere	50

2.3 3-monocloro-1,2-propandiolo (3-MCPD)

Il 3-MCPD (Il 3-monocloropropano-1,2-diolo) è molecola che si identifica come

“contaminante da processo”, che quindi può formarsi nel corso di processi di produzione e trasformazione degli alimenti, quando le condizioni di stress termico, di presenza di molecole clorate inorganiche, di presenza fonti di glicerolo o di gliceridi concorrono a dar luogo alla sintesi.

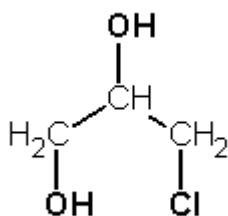


Fig 2.1 Struttura chimica del 3-MCPD

Si forma in alimenti contenenti grassi e sale quando vengono esposti ad alte temperature durante la produzione. Alcuni studi hanno messo in relazione il 3-MCPD con infertilità nei ratti, inibizione della funzione immunitaria e possibile cancerogenicità.

Sono stati proposti vari meccanismi possibili di sintesi “involontaria”, ma esistono dimostrazioni certe della possibilità di sintesi della molecola in questione in corso, ad es. di produzione di “proteine vegetali idrolizzate” attraverso il metodo dell’idrolisi acida (acid-HVP). Anche le salse di soia risultano essere matrice in cui la presenza di 3-MCPD risulta altamente possibile.

Nel 2001 il Comitato Scientifico dell’alimentazione umana dell’Unione Europea aveva stabilito una dose giornaliera ammissibile pari a 2 µg/kg di peso corporeo per il 3-MCPD e nella legislazione comunitaria è stato specificato un livello massimo di concentrazione pari a 20 µg/kg per il 3-MCPD nelle proteine vegetali idrolizzate e nella salsa di soia.

Il Regolamento CE N. 1881/2006 della Commissione del 19 dicembre 2006 ha definito i tenori massimi di alcuni contaminanti presenti nelle derrate alimentari ed ha fissato un limite per il 3-MCPD pari a 0,02 mg/kg in proteine vegetali idrolizzate ed in salsa di soia: ciò in considerazione della documentata attività cancerogena e tossica, giudizio riportato dal Comitato Scientifico Europeo per i prodotti alimentari.

Nel dicembre del 2007 è stata segnalata per la prima volta la presenza di esteri grassi del 3-MCPD (esteri 3-MCPD) in diversi prodotti alimentari tra cui i grassi raffinati commestibili, come la margarina e gli oli, nonché gli alimenti per lattanti e il latte

materno. Dal momento che il 3-MCPD può essere rilasciato dagli esteri, la questione della presenza degli esteri 3-MCPD dev'essere esaminata.

Mentre esistono diversi studi tossicologici condotti su animali in relazione al 3-MCPD, le conoscenze in merito alla presenza, alla tossicocinetica o alla tossicità degli esteri 3-MCPD sono piuttosto scarse, ma si tratta di dati necessari per valutare i possibili rischi per la salute umana.

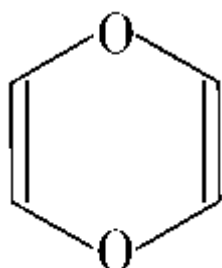
Prodotti	Tenori massimi (µg/kg)
Proteina vegetale idrolizzata	20
Salsa di soia	20

2.4 Diossine e PCB

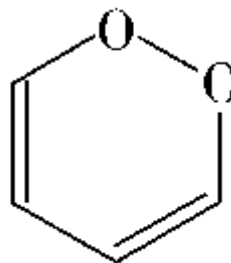
La Convenzione di Stoccolma sugli inquinanti organici persistenti pone dal 2001 tra i suoi obiettivi l'eliminazione o diminuzione d'uso di alcune sostanze nocive per la salute umana e per l'ambiente, gli Inquinanti Organici Persistenti (POP).

I POP sono composti chimici con proprietà tossiche che si propagano nell'aria, nell'acqua o nel terreno e, a causa della loro scarsa degradabilità, risiedono nell'ambiente per lungo tempo. In questo approccio 12 inquinanti principali: aldrin, clordano, dicloro difenil tricloroetano, dieldrin, endrin, eptacloro, mirex, toxafene, esaclorofene e tre classi di composti: policlorodibenzodiossine (PCDD o più comunemente detta diossina), policlorodibenzofurani (PCDF). e i policlorobifenili (PCB), sono accomunati per azione e persistenza.

Il termine "Diossine" si riferisce ad un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati (cogeneri), formati da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro, presenti in natura in quantità apprezzabili anche in diverse rocce sedimentarie, come il caolino e l'argilla, o originate come inquinanti dai processi termici industriali. Di questi, 17 sono considerati tossicologicamente rilevanti.



1,4-Diossina



1,2-Diossina

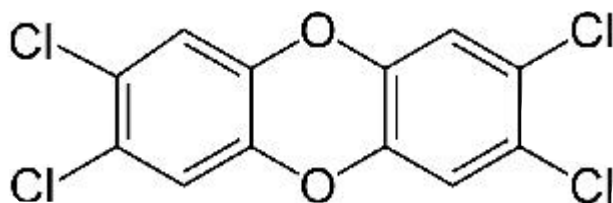


Fig 2.2 Struttura chimica della diossina e clordano

Sono sostanze inodori, termostabili, insolubili in acqua e fortemente liposolubili in grado di legarsi al particolato (sedimento) e alla frazione organica ambientale ed essere assorbite nei grassi dell'uomo e degli animali. Non sono biodegradabili quindi persistono e tendono a bio-accumularsi nella catena alimentare concentrandosi nei grassi dell'uomo e degli animali. Tra le più pericolose, classificata come cancerogena nel Gruppo 1 dall'International Agency for Research on Cancer (IARC), la TCDD (tetracloro-para-bibenzo-diossina), tristemente conosciuta come "agent orange" utilizzata come defogliante nella guerra del Vietnam e, per la contaminazione di Seveso negli anni '70, è tornata a far parlare di se per la contaminazione di alimenti di origine animale, avvenuta alla fine degli anni '90 in Belgio.

Si deve comunque puntualizzare il fatto che non tutte le diossine rappresentano un pericoloso contaminante per l'uomo e l'ambiente, alcune infatti, come la "spongiadiossina" sono utilizzate dall'industria farmaceutica sia per le loro capacità antimicotiche a largo spettro, sia recentemente per possibili ricerche antimalariche.

Quando si usa la definizione "Diossine" nel campo delle valutazioni di tossicità spesso s'intendono compresi i PCB, o bifenili policlorurati che sono un gruppo di 209 idrocarburi aromatici policlorurati, dei quali 12 oltre alle caratteristiche di stabilità nell'ambiente sovrapponibili a quelle delle diossine, hanno anche proprietà tossicologiche simili e vengono chiamati "PCB diossina-simili" o "dioxin-like PCB".

I PCB sono stati prodotti industrialmente a partire dal 1929 (si calcola siano stati prodotti oltre 1.000.000 di tonnellate di PCB) e sono presenti tutt'oggi in tutto il mondo nei trasformatori, nei materiali da costruzione, negli olii lubrificanti, nei preservanti del legno, negli impregnanti ed inchiostri.

La maggior parte dei PCB si presenta in forma di solidi cristallini incolori, le miscele di uso industriale sono liquidi viscosi, la cui viscosità è generalmente proporzionale al tenore di cloro presente.

Benché le loro proprietà fisiche varino all'interno della classe, tutti i PCB sono caratterizzati da una bassa solubilità in acqua e da una bassa volatilità. Sono inoltre tutti molto solubili nei solventi organici, negli oli e nei grassi. Sono sostanze molto stabili, che possono essere distrutte solo per incenerimento o attraverso processi catalitici.

Le miscele di PCB sono state usate in un'ampia gamma di applicazioni, ad esempio come fluidi dielettrici per condensatori e trasformatori, fluidi per scambio termico, fluidi per circuiti idraulici, lubrificanti e oli da taglio, nonché come additivi in vernici, pesticidi, carte copiative, adesivi, sigillanti, ritardanti di fiamma e fissanti per microscopia.

Il loro ampio uso commerciale nasceva principalmente dalla loro elevata stabilità chimica, da cui la sostanziale non infiammabilità, e da utili proprietà fisiche quali l'essere degli isolanti termici ed elettrici. La loro stabilità è tuttavia anche responsabile della loro persistenza nell'ambiente.

Le diossine sono contaminanti ambientali presenti in tutti gli habitat. Il trasporto con l'aria delle emissioni provenienti da molte fonti (incenerimento dei rifiuti, industrie chimiche, traffico veicolare ecc.) sono la principale via di contaminazione delle parti arboree, dei pascoli e dei seminativi.

Lo smaltimento delle sostanze chimiche in discariche non controllate con fuoriuscite e successive diffusioni delle sostanze tossiche sono la causa della contaminazione dei suoli.

L'esposizione degli animali allevati deriva dall'ingestione di vegetali al pascolo o di altre materie prime (es. farine di vegetali, farine di pesce o sostanze di supporto), contenute nei mangimi, contaminate, con l'accumulo delle diossine nei grassi dei pesci, dei bovini da latte e da carne, dei polli, dei suini poi utilizzati come alimenti (carni) o per produrre alimenti (formaggi, latte, uova) per l'uomo.

L'alimentazione è quindi la principale fonte di ingresso nell'organismo umano. Nella popolazione europea l'introduzione con la dieta di queste sostanze, presenta un'ampia variabilità, a causa delle diverse abitudini alimentari e dei diversi tipi di approvvigionamento.

Si è visto finora che le diossine tendono a concentrarsi maggiormente nei grassi dei pesci, dei bovini da latte e da carne, dei polli, dei suini. A parità di esposizione, più lunga è la vita dell'animale, più alto è l'accumulo di diossina nel tessuto adiposo. L'esposizione a piccole dosi avviene anche attraverso la respirazione e la cute ma l'alimentazione rappresenta la fonte principale di accumulo nel nostro organismo. Alcuni gruppi di popolazione come i neonati lattanti (la madre, soprattutto nella prima gravidanza, cede col primo latte le quantità accumulate nel periodo di vita prematerno) o i consumatori di diete ad alto contenuto di grassi nelle zone altamente inquinate, sono maggiormente esposti ad alti tassi di diossina.

L'introduzione con la dieta di queste sostanze nella popolazione europea, presenta un'ampia variabilità, a causa delle diverse abitudini alimentari e dei diversi tipi di approvvigionamento. Ad esempio, una dieta fatta principalmente di pesce proveniente da zone ad alta contaminazione come il Mar Baltico, è attualmente molto più "a rischio" di quella diversificata del sud Europa.

Le stime dell'esposizione a diossine e PCB dioxin-like indicano che, nonostante negli ultimi 10 anni i livelli ambientali si siano notevolmente ridotti, una parte considerevole della popolazione dell'Unione Europea assume comunque tali sostanze con gli alimenti.

I PCB entra soprattutto nei sistemi acquosi, penetra nel corpo degli animali ed essendo liposolubile, penetra e si diffonde nel fegato, nei tessuti nervosi e in tutti gli organi e tessuti ad alta componente lipidica.

La tossicità diretta non è quella più pericolosa, in quanto per uccidere un topo occorrono circa 5 grammi di PCB per ogni chilo corporeo, invece è la somministrazione prolungata e quindi l'accumulo che porta alla morte. Sono tipici inibitori del sistema immunitario per cui, in seguito ad esposizione, si verifica una diminuzione delle difese dell'organismo con conseguente aumento della probabilità di contrarre altre malattie, ad esempio le malattie infettive ed i tumori. Si verificano alterazioni sugli adulti ma soprattutto sui bambini esposti a PCB in utero o attraverso il latte materno con maggiore incidenza di patologie respiratorie ed otiti.

Queste sostanze sono anche degli Interferenti Endocrini, *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC), per cui la loro azione si esplica a livello del sistema riproduttivo ed endocrino in generale, sullo sviluppo prenatale nonché a livello immunitario. La loro struttura li rende in grado di interferire con l'azione degli estrogeni e con i livelli di ormone tiroideo nell'organismo.

Studi di tossicologia sperimentale mostrano come gli effetti sullo sviluppo prenatale sono a carico degli organi riproduttivi e del sistema nervoso (soprattutto a partire dal secondo trimestre di gestazione).

Gli studi epidemiologici disponibili sulla esposizione cronica a PCB mostrano come l'associazione fra alcuni effetti avversi sulla salute ed i livelli di esposizione interna ("carico corporeo", *body burden*). In particolare, le alterazioni neurocomportamentali nei bambini sono documentabili a livelli di esposizioni prossimi a quelli del "fondo naturale". Gli effetti documentati sono anomalità dei riflessi, problemi al sistema motorio, deficit di memoria e di apprendimento e riduzione del quoziente di intelligenza (QI). In alcuni studi scompaiono verso i 4 anni in altri persistono fino a 11 anni. Non sono disponibili studi conclusivi circa gli effetti neurologici sugli adulti.

Gli effetti più comunemente osservati sulla salute umana sono la cloracne e le eruzioni cutanee. Studi su lavoratori esposti hanno mostrato alterazioni nell'analisi di sangue e urine correlabili a danni a carico del fegato.

La "Scientific Committee on Food" ha stabilito nel 2001 una soglia di tolleranza settimanale per l'assunzione (TWI) di diossine e DL-PCB pari a 14 pg TEQ per kg di peso corporeo (SCF, 2001). Sono previste, comunque, delle revisioni da parte dell'EFSA per aggiornare di volta in volta i limiti in base agli studi tossicologici in corso. I livelli d'azione sono strumenti ad uso delle autorità competenti e degli operatori indispensabili per evidenziare i casi in cui è necessario identificare le fonti di contaminazione e prendere provvedimenti per la loro riduzione o eliminazione. La Commissione Europea ha fissato il livelli d'azione per i DL-PCB negli alimenti (CE 2006/88).

La Comunità Europea ha fissato i limiti massimi di diossine presenti negli alimenti (CE 2375/2001), nonché per le miscele diossine-furani-DL-PCB (CE 199/2006). Non esistono livelli massimi stabiliti per gli NDL-PCB, maggiori componenti dei PCB in mangimi ed alimenti.

Prodotti alimentari	Tenori massimi	
	Somma di diossine (OMS-PCDD/F-TEQ)	Somma di diossine e PCB diossina-simili (OMS-PCDD/F-PCB-TEQ)
Carni e prodotti a base di carne (escluse le frattaglie commestibili) dei seguenti animali		
bovini e ovini	3,0 pg/g grasso	4,5 pg/g grasso
pollame	2,0 pg/g grasso	4,0 pg/g grasso
suini	1,0 pg/g grasso	1,5 pg/g grasso
Fegato degli animali terrestri e relativi prodotti derivati	6,0 pg/g grasso	12,0 pg/g grasso
Muscolo di pesce e prodotti della pesca e loro derivati, esclusa l'anguilla. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	4,0 pg/g peso fresco	8,0 pg/g peso fresco
Muscolo di anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) e prodotti derivati	4,0 pg/g peso fresco	12,0 pg/g peso fresco
Latte crudo e prodotti lattiero-caseari, compreso il grasso del burro	3,0 pg/g grasso	6,0 pg/g grasso
Uova di gallina e ovoprodotti	3,0 pg/g grasso	6,0 pg/g grasso
Grasso dei seguenti animali:		
bovini e ovini	3,0 pg/g grasso	4,5 pg/g grasso
pollame	2,0 pg/g grasso	4,0 pg/g grasso
suini	1,0 pg/g grasso	1,5 pg/g grasso
Miscele di grassi animali	2,0 pg/g grasso	3,0 pg/g grasso
Oli e grassi vegetali	0,75 pg/g grasso	1,5 pg/g grasso
Oli di organismi marini (olio estratto dal corpo del pesce, dal suo fegato e oli di altri organismi marini destinati al consumo umano)	2,0 pg/g grasso	10,0 pg/g grasso
Fegato di pesce e suoi prodotti derivati, esclusi gli oli di organismi marini		25,0 pg/g peso fresco

2.5 Idrocarburi policiclici aromatici

Per Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) si intende un'ampia gamma (circa 500) di composti organici con due o più anelli benzenici condensati. A causa della loro minore volatilità non sono considerati VOC (Composti Organici Volatili), tranne alcune eccezioni (naftalene), e vengono bensì classificati come composti organici semi volatili (SVOC). Più di un centinaio ne sono stati identificati nel materiale particolato atmosferico (Lee *et al.*, 1976) e circa duecento nel fumo di tabacco (Lee *et al.*, 1981). Hanno solubilità molto scarsa in acqua, sono solubili in molti solventi organici (Lide, 2002-2003) e sono fortemente lipofili (Menichini, 1994).

Gli IPA costituiti da tre a cinque anelli possono essere presenti in atmosfera sia come gas che come particolato, mentre quelli caratterizzati da cinque o più anelli tendono a presentarsi per lo più in forma solida. Si caratterizzano per il loro basso grado di solubilità in acqua, l'elevata capacità di aderire a materiale organico e la buona solubilità nei lipidi e in molti solventi organici.

Sono presenti ovunque in atmosfera; vengono prodotti dalla combustione incompleta di materiale organico e derivano dall'uso di olio combustibile, gas, carbone e legno nella produzione di energia.

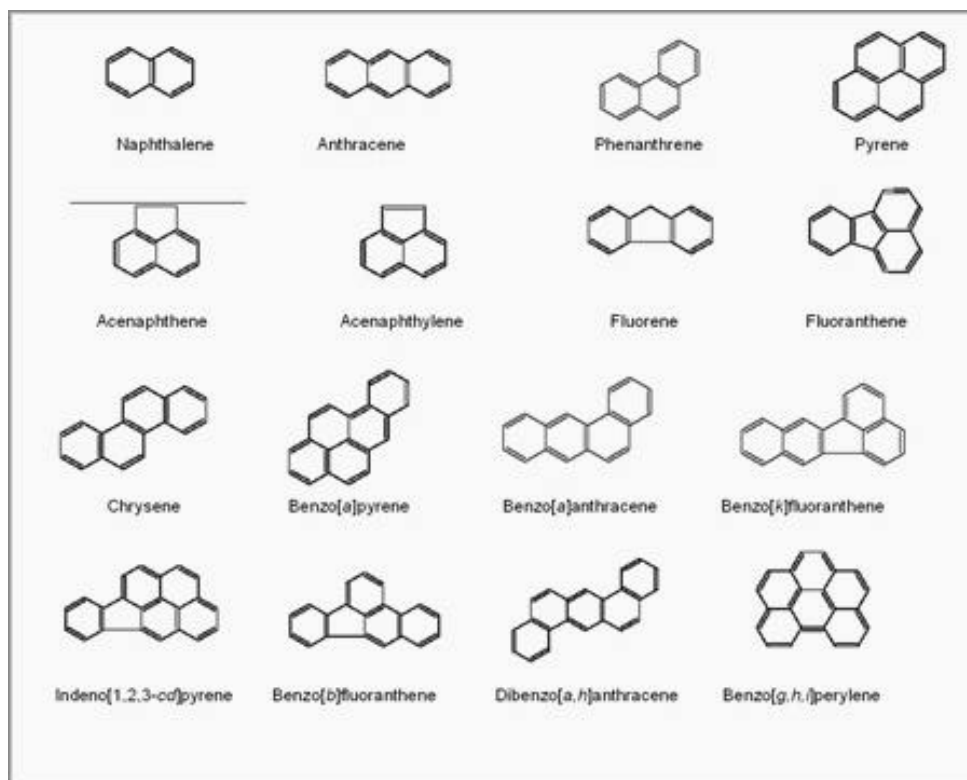


Fig 2.3 struttura chimica di vari idrocarburi policiclici aromatici

Le principali fonti di produzione derivano dalla combustione di combustibili fossili e dai processi industriali quali cokerie, produzione e lavorazione di grafite, trattamento del carbon fossile. Altre sorgenti temporanee sono gli incendi di foreste e di campi agricoli.

Negli ambienti indoor provengono da caldaie, soprattutto quelle alimentate con combustibili solidi e liquidi pesanti, dai forni a legna, dai caminetti e dal fumo di tabacco. Sono presenti anche nei fumi dei cibi cucinati sulle fiamme e affumicati.

Una fonte produttrice importante sono le emissioni degli autoveicoli (sia diesel che benzina). La presenza di questi composti nei gas di scarico degli autoveicoli è dovuta sia alla frazione presente come tale nel carburante, sia alla frazione che per pirosintesi ha origine durante il processo di combustione.

Il meccanismo di formazione degli IPA durante il processo di combustione è alquanto complesso; consiste principalmente nella ripolimerizzazione di frammenti d'idrocarburo, che si formano durante il processo noto come *cracking* (la frammentazione in numerose parti delle molecole più grosse del combustibile a contatto con il fuoco). La reazione di ripolimerizzazione avviene soprattutto in condizioni di mancanza d'ossigeno e, conseguentemente, la velocità di formazione degli IPA aumenta con il diminuire del rapporto ossigeno/combustibile.

In generale l'emissione di questi idrocarburi nell'ambiente risulta molto variabile a seconda del tipo di sorgente, del tipo di combustibile e della qualità della combustione. Solitamente nell'aria non si ritrovano mai come composti singoli, ma all'interno di miscele dove sono presenti molte decine di IPA diversi e in proporzioni che in alcuni casi possono anche variare di molto. Il fatto che l'esposizione avvenga ad una miscela di composti, di composizione non costante, rende difficile l'attribuzione delle conseguenze sulla salute alla presenza di uno specifico idrocarburo policiclico aromatico.

Gran parte degli IPA proviene dall'esterno attraverso le scarpe e gli indumenti, a causa della loro capacità di depositarsi sulla polvere e della successiva risospensione di quest'ultima che ne consente l'inalazione. In ambienti confinati si presentano sottoforma di vapore e parzialmente adsorbiti su particelle sospese. Le concentrazioni indoor di molti IPA sono generalmente maggiori di quelle outdoor; in

ambienti con fumatori si può arrivare ad un valore di concentrazione tre o quattro volte superiore.

Il benzo[a]pirene (BaP) è il composto più ampiamente studiato dal punto di vista tossicologico e più frequentemente determinato nelle varie matrici, sia ambientali che alimentari. Esso viene frequentemente usato come indicatore della classe degli IPA, per quanto riguarda sia i livelli di contaminazione che il rischio cancerogeno. Tale scelta si basa su alcune osservazioni: la sostanziale somiglianza, almeno in termini di ordini di grandezza, tra i “profili” degli IPA rispetto al BaP (cioè i rapporti tra le concentrazioni degli IPA, in particolare quelli cancerogeni, e la concentrazione del BaP), osservata in campioni anche di diversa origine; la potenza cancerogena del BaP relativamente elevata rispetto agli altri.

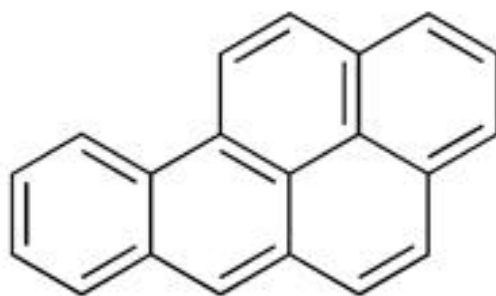


Fig 2.4 Struttura chimica del benzo[a]pirene

Una volta ingeriti (o inalati), gli IPA sono rapidamente assorbiti attraverso il tratto gastro-intestinale o l'epitelio polmonare, e distribuiti in vari tessuti (soprattutto quelli più ricchi di grasso), compresi quelli fetali. Gli IPA vengono estesamente metabolizzati in vari tessuti e organi (polmone, pelle, esofago, colon, fegato, placenta, ecc.). In genere il primo passo del metabolismo degli IPA, finalizzato ad aumentarne la idrofilicità e facilitarne l'escrezione, è una ossidazione.

In genere gli IPA mostrano bassa tossicità acuta, con NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) per somministrazione orale superiori ai 100 mg/kg p.c. Anche altri effetti tossici diversi da quelli cancerogeni (immunotossicità, effetti sulla riproduzione) sono stati osservati solo in seguito ad esposizione ad alte dosi. La caratteristica tossicologica di maggiore rilievo in relazione ai possibili rischi posti dalla presenza di IPA negli alimenti è quindi senz'altro l'attività genotossica e cancerogena, per le quali si ritiene che non esista dose soglia.

Negli alimenti non sottoposti a trasformazione, la presenza degli IPA è essenzialmente dovuta a contaminazione ambientale: deposizione di materiale particolato atmosferico (es. su grano, frutti e verdure), assorbimento da suolo contaminato (es. per le patate), assorbimento da acque di fiume e di mare contaminate (es. per mitili, pesci e crostacei). Sorgenti comuni negli alimenti trasformati o lavorati sono i trattamenti termici (in particolare: la cottura alla griglia, arrosto e al forno, e la frittura) e i processi di lavorazione. Questi ultimi riguardano specialmente i processi di essiccazione attraverso i fumi di combustione, ad esempio nel caso degli oli vegetali, e i processi di affumicatura con i metodi tradizionali.

L'eventuale presenza di IPA nell'acqua potabile è generalmente dovuta alla cessione dai rivestimenti, in catrame o bitume, delle condutture di distribuzione dell'acqua stessa (WHO, 1998).

Attualmente l'utilizzo degli IPA è limitato sostanzialmente a scopi di ricerca. Le eccezioni sono rappresentate dal naftalene, usato come antitarmico per i tessuti, e da un uso occasionale di alcuni IPA (naftalene, acenaftene, fluorene, antracene, fenantrene, fluorantene e pirene) come intermedi nella produzione di plastificanti, pigmenti, coloranti e pesticidi.

Prodotti alimentari	Tenori massimi (µg/kg di peso fresco)
Benzo(a)pirene	
Oli e grassi (escluso il burro di cacao) destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0
Carni affumicate e prodotti a base di carni affumicate	5,0
Muscolo di pesce affumicato e prodotti della pesca affumicati, esclusi i molluschi bivalvi. Il tenore massimo si applica ai crostacei affumicati, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	5,0
Muscolo di pesce non affumicato	2,0
Crostacei e cefalopodi non affumicati. Il tenore massimo si applica ai crostacei, escluse le carni scure del granchio e quelle della testa e del torace dell'aragosta e di grossi crostacei analoghi (<i>Nephropidae</i> e <i>Palinuridae</i>).	5,0
Molluschi bivalvi	10,0
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	1,0
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento	1,0
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti	1,0

2.6 Residui di antiparassitari

Con il termine antiparassitari, detti anche prodotti fitosanitari, fitofarmaci o dall'inglese *pesticidi*, si definisce una categoria di composti chimici utilizzati in agricoltura per combattere parassiti e altri organismi dannosi per l'uomo, gli animali e le piante (come insetti, funghi, muffe, roditori, erbe o nematodi).

Si tratta di sostanze a composizione chimica molto diversa, che vanno da estratti di piante come il piretro, a sali e oli minerali, fino a composti organici molto sofisticati. I pesticidi leggeri (non persistenti) sono composti rapidamente biodegradabili, mentre i pesticidi pesanti (persistenti) sono composti invece che rimangono nell'ambiente per periodi di tempo relativamente lunghi. La loro persistenza dipende da molti fattori: il tipo di suolo, l'umidità, il PH e l'estensione delle colture, ed è determinante per stabilire l'intervallo di sicurezza, ossia il tempo che deve intercorrere tra l'ultimo trattamento e la raccolta.

CATEGORIA	DURATA ATTIVITÀ	TIPO DI COMPOSTI
Non persistenti	Da 1 a 12 settimane	Fosfororganici
Moderatamente persistenti	Da 1 a 18 mesi	Carbammati
Persistenti	Da 2 a 5 anni	Clororganici
Permanenti	Degradano a residuo permanente	Contengono Hg, As, piombo

In base al meccanismo d'azione, i fitofarmaci si distinguono in:

- fitofarmaci di copertura: sono pesticidi che si fissano sulla superficie esterna delle parti vegetali trattate;
- fitofarmaci citotropici: sono pesticidi che attraversano la buccia dei frutti o l'epidermide fogliare ed entrano per un breve tratto nei tessuti vegetali;
- fitofarmaci sistemici: sono pesticidi che si diffondono in tutti i tessuti vegetali, compreso il cuore del frutto, in quanto trasportati dalla linfa della pianta trattata.

Esistono numerose forme di pesticidi con diverse funzioni:

- Algicidi: controllano la crescita delle alghe nei laghi, nei canali, nei fiumi e nelle piscine.
- Antimicrobici: uccidono microbi e virus.
- Biocidi: uccidono i microrganismi.
- Disinfettanti: uccidono o inattivano i microrganismi.
- Fungicidi: uccidono funghi e muffe. Sono chiamati anche anticrittogamici.
- Fumiganti: producono gas o vapori in fabbricati o nel suolo per contrastare infestazioni.
- Diserbanti: uccidono semi o piante indesiderate, e sono ad azione totale o selettiva, ossia distruggono tutte le piante o impediscono la crescita solo di alcune.
- Insetticidi: uccidono insetti e artropodi.
- Miticidi: (acaricidi) uccidono acari che vivono su piante e animali.
- Molluschicidi: uccidono conchiglie o lumache.
- Nematicidi: uccidono piccoli vermi, che vivono sulle radici delle piante.
- Ovicidi: uccidono uova di insetti o larve.
- Ferormoni: ormoni usati per modificare il comportamento sessuale degli insetti.
- Repellenti: respingono qualsiasi agente infestante, compresi insetti, zanzare, uccelli.
- Topicidi: uccidono topi e altri roditori.

Tra i pesticidi sono incluse anche altre sostanze quali i:

- Defolianti: producono la caduta delle foglie dagli alberi per facilitare il raccolto.
- Essiccanti: fanno seccare piante indesiderate.

Altre sostanze utilizzate in agricoltura sono le Auxine. Sono ormoni delle piante, che stimolano o inibiscono la crescita e la differenziazione dei tessuti e degli organi, la fioritura, la maturazione della frutta e l'ingrandimento delle foglie. Influenzano anche il movimento degli steli verso la luce solare e contro la forza di gravità. Stimolano inoltre la crescita verso l'alto dei rami, inibendo la crescita laterale dei rami, e regolano infine la caduta delle foglie. In agricoltura le auxine vengono adoperate per

la crescita delle radici e per il controllo della maturazione della frutta.

Le Giberelline sono sostanze che stimolano la crescita delle piante. Sono usate nella coltivazione dell' uva, per ottenere ad esempio uva senza semi, per la crescita di piante nane.

Le citochine sono un gruppo di sostanze molto attive nella stimolazione della suddivisione cellulare. Nell' orticoltura un alto tasso di auxine e un basso tasso di citochine fa crescere le radici, un alto tasso di citochine e basso tasso di auxine fa aumentare i germogli.

L' etilene agisce come un ormone delle piante, inducendo maturazione della frutta e la fioritura delle piante. Un suo derivato, l'acido 2-cloroetilfosforico, ha molte applicazioni in agricoltura: per esempio induce maturazione dei pomodori, e stimola il flusso di lattice nell' albero della gomma.

Per la loro stessa natura i pesticidi possono risultare pericolosi all'uomo o agli altri animali, in quanto il loro scopo è di uccidere o danneggiare gli organismi viventi. Possono essere assorbiti per inalazione, per contatto cutaneo o attraverso l'apparato digerente. Gli effetti acuti dell' intossicazione da pesticidi sono disturbi epatici, tumori, malattie polmonari, della pelle, del sangue. Sulla base della tossicità possono essere classificati 4 gruppi: il primo in cui i pesticidi possono provocare la morte; il secondo gruppo in cui provocano intossicazioni gravi, nel terzo gruppo provocano intossicazioni lievi, nel quarto provocano intossicazioni trascurabili. La tossicità acuta viene classificata in base alla dose letale DL50, cioè la dose in grado di uccidere il 50 per cento degli animali di laboratorio che l'hanno assorbita. Questo sistema tuttavia tiene conto solo della tossicità acuta, e non comprende gli effetti a lunga scadenza, l' azione cancerogena, l' azione mutagena sul patrimonio genetico, l' azione teratogena su embrioni e feti.

Il rischio salutistico deriva dall'uso troppo spesso sistematico, eccessivo e/o indiscriminato di prodotti fitosanitari e dal mancato rispetto dei tempi di carenza, atteggiamenti responsabili della presenza di residui di sostanze chimiche sia nell'ambiente che nelle derrate alimentari e quindi della loro introduzione nell'alimentazione animale e umana.

I rischi correlati all'alimentazione sono essenzialmente di tipo cronico. La tossicità cronica deriva infatti da una esposizione prolungata a quantità minime di sostanze tossiche. Gli effetti su animali a sangue caldo e sull'uomo sono principalmente di tre

tipi:

- mutageni, se producono alterazioni nel patrimonio genetico;
- cancerogeni, quando si producono dei ceppi anomali di cellule a seguito di alterazioni delle stesse;
- teratogeni, quando le alterazioni riguardano l'embrione o il feto.

Ormai queste sostanze fanno parte integrante della nostra dieta e la loro presenza, anche se inferiore ai limiti fissati per legge, rappresenta comunque sempre un rischio. Il consumatore è tutelato dall'applicazione della cosiddetta dose giornaliera accettabile (DGA o ADI, Acceptable Daily Intake) che rappresenta la quantità di una sostanza chimica che ingerita ogni giorno per tutta la vita non arreca rischi apprezzabili alla salute.

L'impiego di questi prodotti, contenenti sostanze attive a diversa azione fitoiatrica, può avere come conseguenza la presenza di residui nei prodotti trattati, negli animali nutriti con tali prodotti e nel miele prodotto da api esposte a queste sostanze. Al momento dell'immissione in circolazione nell'UE, tuttavia, i prodotti destinati all'alimentazione non devono contenere residui di sostanze attive di prodotti fitosanitari superiori ai limiti massimi di residui (LMR) fissati per legge. I valori di LMR, stabiliti per ciascuna combinazione sostanza attiva/prodotto, sono fissati e valutati, al momento della loro autorizzazione, in modo da garantire un elevato livello di tutela della salute dei consumatori. Il rispetto di tali limiti è assicurato dal corretto impiego, secondo le modalità riportate nelle etichette autorizzate. In passato, per diversi fitofarmaci, l'Unione europea aveva stabilito dei livelli massimi attraverso l'emanazione di direttive, che potevano essere recepite dagli Stati membri nella loro totalità o stabilendo in maniera autonoma limiti propri. In conseguenza di ciò, residui non tollerati in un Paese, perché superiori al limite fissato, in un altro erano invece considerati accettabili, così come per talune sostanze non esisteva alcun limite.

Poiché valori di LMR disomogenei, fissati a livello nazionale, potevano costituire un ostacolo agli scambi commerciali, nell'interesse di favorire il buon funzionamento del mercato interno europeo e quello con i Paesi Terzi, nonché di conseguire un più efficace utilizzo delle risorse nazionali, è stato ritenuto opportuno fissare su scala comunitaria i livelli massimi di residui per i prodotti di origine vegetale e animale,

facendo riferimento alle buone pratiche agricole.

Nell'UE, da settembre 2008, è in vigore un nuovo regolamento che modifica le disposizioni per i residui dei pesticidi.

Il nuovo regolamento si applica a tutti i prodotti agricoli destinati al consumo umano o animale. Sono elencati gli LMR di 315 prodotti freschi; questi limiti sono validi anche per gli stessi prodotti dopo la trasformazione, adeguati per tenere conto dei fattori di diluizione o concentrazione durante le operazioni di trasformazione.

Il regolamento si applica ai pesticidi utilizzati attualmente, o in passato, sia nell'UE che in paesi terzi (circa 110). Per gli LMR di pesticidi non menzionati specificatamente si applica un valore generale di 0,01 mg/kg. Il regolamento riguarda la sicurezza di tutti i gruppi di consumatori e include, tra gli altri, neonati, bambini e vegetariani. Della valutazione della sicurezza dei consumatori si occupa l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (AESA), basandosi sulla tossicità dei pesticidi, sui livelli massimi previsti sugli alimenti e sui diversi regimi alimentari dei consumatori.

Il regolamento definisce chiaramente il ruolo svolto da Stati membri, AESA e Commissione nello stabilire gli LMR, e riporta:

- gli LMR per l'UE (circa 45 000) già in vigore prima del settembre 2008;
- gli LMR appena armonizzati, e stabiliti in precedenza dagli Stati membri (circa 100 000);
- un elenco di sostanze a basso rischio, per le quali non sono necessari gli LMR.

Riporto qui la parte introduttiva della nuova direttiva relativa all'uso e al controllo dei fitofarmaci:

“L'Unione europea, oltre a impegnarsi per tutelare consumatori e animali dai residui dei pesticidi negli alimenti e nei mangimi, cerca di ridurre l'impatto globale dei pesticidi sulla salute e sull'ambiente e, in definitiva, il loro stesso uso. Nel 2006, la Commissione europea ha proposto una strategia per migliorare le modalità di utilizzo dei pesticidi nell'UE.

La strategia si prefigge di incoraggiare le coltivazioni naturali o a basso uso di

pesticidi, in particolare cercando di aumentare la sensibilizzazione degli utenti, promuovendo l'uso di buone pratiche e mettendo a disposizione fondi per la ricerca applicata e la formazione.”.

Attualmente devono essere rispettati i limiti residuali massimi per i fitosanitari utilizzati per la produzione di quasi 250 alimenti di origine vegetale e di 60 alimenti di origine animale. Tra questi, svariate specie di frutta, verdura e cereali, frutti oleosi/ piante oleifere, piante da zucchero, frutti esotici e tropicali, erbe aromatiche, funghi, diverse specie di the, caffè, cacao e spezie.

Per quanto riguarda gli alimenti di origine animale, limiti residuali massimi sono fissati per i prodotti impiegati per la produzione della carne, delle interiora, del latte, delle uova di diverse specie animali, per i pesci, per i crostacei (ad esempio granchi), per gli anfibi (ad esempio rane), per le lumache e per il miele. La combinazione dei valori da rispettare dei limiti residuali massimi dei fitosanitari, di ormai prossima armonizzazione, offre fino ad 80.000 valori singoli. Per 227 delle oltre 1.150 sostanze attive che vengono o venivano usate per la produzione di fitofarmaci già prima del 2 settembre 2008 erano in vigore valori armonizzati per i limiti residuali massimi. Questi ultimi erano da considerarsi validi a tutti gli effetti sia per le sostanze attive note già da tempo (che, per la maggior parte, non vengono più nemmeno utilizzate per la produzione di fitosanitari) sia anche per i principi attivi di più recente introduzione sul mercato.

Capitolo 3

MICOTOSSINE

Le micotossine sono venute alla ribalta negli ultimi decenni perché vi sono stati casi clinici di *micotossicosi* nell'uomo e negli animali. Ora, con le strumentazioni di cui si dispone, sono rilevabili in modo significativo, da questo è dato l'aumento di interesse verso la presenza di queste sostanze nelle derrate alimentari. Questo interesse è scaturito, non solo dalla tossicità e la loro diffusione, ma dal fatto che sono molto difficili da eliminare da una derrata contaminata. Sono molto resistenti al calore e non vengono completamente distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti a cui vengono normalmente sottoposte le derrate durante i processi di preparazione degli alimenti. Pertanto, le stesse micotossine o loro derivati ancora attivi possono persistere dopo la morte del micete ed essere presenti anche quando il prodotto stesso non appare ammuffito. La contaminazione da parte di queste tossine, è ampiamente influenzata dalle condizioni climatiche e geografiche, dalle pratiche di coltivazione e di conservazione, e dal tipo di substrato interessato.

Sono un gruppo di prodotti naturali altamente tossici derivanti dal metabolismo secondario di alcune specie di funghi parassiti che si possono sviluppare in una gran quantità di derrate alimentari.

Tra i funghi che rivestono una particolare importanza micotossicologica per la loro diffusione e ed elevata tossicità sono da ricordare i generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, ai quali si aggiungono altri generi (circa 200) di interesse micotossicologico più limitato.

I primi due generi si trovano comunemente come contaminanti degli alimenti durante l'essiccazione e stoccaggio, mentre il terzo è un agente patogeno contaminante nelle fasi prima o immediatamente successive alla raccolta. Una volta prodotte dal micete, possono essere secrete nel substrato o rimanere all'interno del micelio.

Gli alimenti più esposti alla contaminazione diretta sono soprattutto cereali (mais, frumento, riso, orzo, segale, ecc.), semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone, ecc.), frutta secca ed essiccata, legumi, spezie, caffè e cacao. Inoltre, le micotossine possono essere ritrovate come residui o metaboliti tossici nei prodotti alimentari che

derivano da animali alimentati con mangimi contaminati, costituendo un tipo di contaminazione indiretta (*carry over*) per l'uomo di rilevanza considerevole a causa degli elevati livelli di micotossine potenzialmente presenti nei cereali destinati alla produzione di mangimi vegetali.

Per quanto riguarda la tossicologia di questi contaminanti sono riportati effetti epatotossici, gastrointestinali, ematopoietici, nefrotossici, immunosoppressori, teratogeni, mutageni e cancerogeni.

Le micotossine più importanti, dovuto alla loro tossicità e diffusione, sono:

- **Ocratossine**
- **Fumonisine**
- **Zearalenone**
- **Aflatossine**

3.1 Ocratossine

Le **ocratossine** sono delle micotossine, prodotte da specie del genere *Aspergillus* e *Penicilium*, quali *A. ochraceus*, *carbonarius* e *P. viridicatum*, *verrucosum* e *cyclopium*.

Questi funghi, sintetizzano questa tossina solamente in condizioni ambientali particolari quali un contenuto minimo di umidità del 15-16% e temperature comprese tra 4 e 37 °C. Diverse temperature, maggiori od inferiori, favoriscono ugualmente la produzione di ocratossine da parte di altre specie fungine che sono in grado di svilupparsi anche in quelle condizioni.

Costituiscono un gruppo di derivati dell'isocumarina strettamente collegati tra loro, legati al gruppo amminico della L-β-finilalanina, sono classificati in base alla loro origine biosintetica come pentacetidi nel gruppo dei polichetidi (Turner, 1971).

I prodotti più a rischio di contaminazione da ocratossine sono cereali, legumi, caffè, vino, birra, spezie, uva passa, prodotti da forno (pane), mangimi ed alimenti diversi. Queste interferiscono sulla sintesi proteica, sulla sintesi mitocondriale dell'ATP e la perossidazione degli acidi grassi.

Ne sono note tre tipi:

- ocratossina A, che si ritrova principalmente nei cereali, nel caffè, nella frutta secca e nel vino.
- ocratossina B, deriva dall'ocratossina A per dechlorazione
- ocratossina C, un metabolita dell'ocratossina A, ne deriva per esterificazione

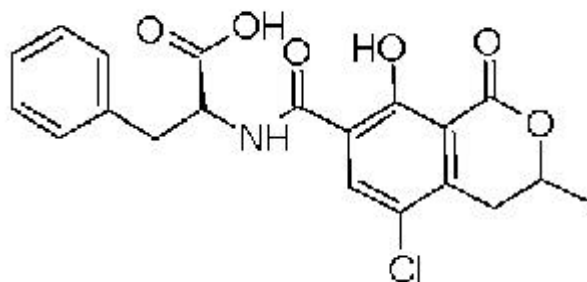


Fig 3.1 Struttura chimica dell'Ocratossina A

3.1.1 Ocratossina A

L'ocratossina A (OTA) è la più tossica del gruppo delle ocratossina maggiormente diffuse, risulta essere nefrotossica, epatotossica, teratogena e immunotossica per molte specie animali. Questa è stata isolata per la prima volta in Sud Africa da un ceppo di *A. ochraceus* nel 1965 (Bennet et al., 2003); successivamente è stata ritrovata come metabolita secondario prodotto da alcune specie del genere *Penicillium*.

Per l'uomo è classificata dalla IARC (International Agency for Research on Cancer) come gruppo 2B cioè "*possibile agente cancerogeno per l'uomo*". Riguardo alla nefrotossicità la Ocratossina A è stata messa in relazione alla così detta Nefropatia Endemica dei Balcani, una grave malattia renale delle popolazioni del Sud Est Europa (Bosnia, Croazia, Bulgaria e Romania).

Le intossicazioni principali causate da questa tossina negli allevamenti zootecnici sono la nefropatia dei suini, segnalata nei Paesi del nord-Europa e nei Balcani, e la nefropatia aviaria, diffusa invece nell'America del Nord, entrambe associate al consumo di cereali contaminati. In dosi diverse può risultare anche immunotossica, cancerogena e genotossica e ad alte concentrazioni può causare comparsa di epatiti, enteriti e necrosi del tessuto linfatico. L'ocratossina A inibisce anche la sintesi

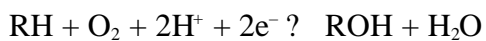
proteica, soprattutto nelle cellule renali, con effetti immunosoppressivi; è un accertato cancerogeno per gli animali, ma non esistono dati sufficienti per dimostrarne la cancerogenicità per l'uomo. Inoltre si accumula nei tessuti, rendendo tossiche e carcinogene anche le carni di animali che si siano nutriti di cibi contaminati. Alcuni studi indicano che viene assorbita principalmente nello stomaco, e poi del digiuno, il tratto di intestino tra ileo e tenue. Può provocare danni all'intero organismo, essendo capace di legarsi alle siero-albumine del sangue: tale interazione è responsabile della diffusione sistemica della tossina. L'ocratossina è un composto particolarmente stabile, in grado di resistere alle condizioni più estreme: si ritrova nel caffè anche dopo la tostatura ed è in grado di resistere a lungo ai normali processi metabolici. Solo i ruminanti sono in grado di degradarla rapidamente ad ocratossina Alpha, un derivato molto meno tossico, privo del gruppo fenilalaninico, grazie all'azione della loro flora batterica. Proprio il gruppo fenilalaninico infatti è responsabile di molti effetti tossici, poiché consente alla tossina di sostituirsi all'amminoacido in molti processi metabolici e di biosintesi.

La biotrasformazione dell'OTA è dipendente dal citocromo P450 sia nell'uomo che negli animali e porta alla formazione di intermedi metabolicamente attivi probabilmente responsabili dell'azione cancerogena e di altri effetti tossici (Giuffrida, 2007). Il suo assorbimento avviene nel tratto gastrointestinale e, attraverso la circolazione entero-epatica, può essere escreta e riassorbita. Nel sangue l'OTA è legata alla frazione albuminica delle proteine e questa sembra essere la motivazione per cui questa micotossina permane per tempi lunghi nell'organismo animale. A livello cellulare inibisce il trasporto intramitocondriale del fosfato e la sintesi proteica a livello della traduzione mediante il blocco della fenilalanina RNA sintetasi. Il principale organo bersaglio dell'OTA è il rene, ma per dosi sufficientemente elevate si ha tossicità anche a livello epatico con infiltrazione grassa e accumulo di glicogeno negli epatociti (per blocco del sistema enzimatico delle fosforilasi).

La famiglia del citocromo P450 (abbreviata come CYP, P450 e, meno di frequente, CYP450) è una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutti i domini dei viventi, appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (o monoossigenasi). I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su un gran numero di

differenti substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna) che endogeni (prodotti di scarto dell'organismo). Spesso prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come sistemi contenenti P450.

Le reazioni catalizzate dalle isoforme del citocromo P450 sono svariate. La più comune è una classica reazione da monossigenasi: il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare ad un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



Esempi di reazioni catalizzate dal citocromo P450 sono l'ossidazione di composti alifatici o aromatici, la formazione di epossidi e l'ossidazione di alcoli. Gli elettroni necessari alla reazione possono essere forniti dal NADP(H) o dal NADH attraverso altri attori proteici come la ferredossina, il citocromo b5 o la NADPH-emoproteina riduttasi, contenente FAD ed FMN come gruppi prostetici. Oltre alle reazioni di eliminazione di composti esogeni, il citocromo P450 è coinvolto nella biosintesi del colesterolo e nella steroidogenesi degli ormoni steroidei.

A livello cellulare, negli eucarioti gli enzimi della famiglia si ritrovano principalmente legate alle membrane del reticolo endoplasmatico liscio ed alla membrana mitocondriale interna tramite le regione N-terminale idrofobica, in particolare nella frazione microsomiale delle cellule epatiche. (Danielson, 2002)

Secondo la FAO, la dose massima giornaliera tollerabile è ritenuta di 0.1 microgrammi/kg.

A livello comunitario è stato emesso il *Reg. CE n. 1881/2006* che definisce i tenori massimi di Ocratossina A, essi risultano 5 ppb (0,005 µg/kg) per i cereali non lavorati e 3 ppb (0,003 µg/kg) per i prodotti derivati dai cereali.

Alla famiglia delle ocratossine, come precedentemente detto, ci sono altri derivati dell'OTA, quali l'ocratossina B (OTB), l'ocratossina C (OTC), l'ocratossina alfa (a-OTA), la 4-idrossiocratossina (OTA-OH) e l'ocratossina con l'anello lattone aperto (OP-OTA) (Steyn, 1971, 1984; Xiao et. Al., 1995, 1996). Di queste tossine, l'OTC ha la stessa tossicità della OTA, l'OTB è notevolmente meno tossica invece, a-OTA e OTA-OH non risultano essere dotate di tossicità. Relativamente alla tossicità,

l'ocratossina più tossica è rappresentata dalla OP-OTA, la quale risulta essere 10 volte superiore alla OTA (Marquardt e Frohlich, 1992; Xiao et. Al., 1996).

OCRATOSSINA A	TENORI MASSIMI (µg/kg)
Cereali non trasformati	5
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali e i cereali destinati al consumo umano diretto	3
Uve secche (uve di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10
Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato, escluso il caffè solubile	5
Caffè solubile (istantaneo)	10
Vini (compreso il vino spumante ed esclusi i vini liquorosi e i vini con un titolo alcolometrico non inferiore al 15 % vol) e vini di frutta	2
Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli	2
Succo d'uva, succo d'uva concentrato ricostituito, nettare d'uva, mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati al consumo umano diretto	2
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	0.5
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti	0.5
Caffè crudo, frutta secca diversa dalle uve secche, birra, cacao e prodotti a base di cacao, vini liquorosi, prodotti a base di carne, spezie e liquirizia	-

Tabella Regolamento CE 1881/2006 che definisce i tenori massimi di Ocratossina A

3.2 Fumonisine

Le fumonisine sono un gruppo di micotossine non fluorescenti (John L. Richard, 2007), costituiscono un gruppo di metaboliti tossici, isolate per la prima volta in Sud Africa da colture di *Fusarium verticillioides* (Gelderblom et al., 1988) e correlato con casi di micotossicosi sia di equini che di suini (Gendelbrom, W.C.A.; et al. 1988), prodotti da funghi del genere *Fusarium verticilloides* e *F. proliferatum*.

A differenza delle altre micotossine, le fumonisine sono idrofiliche, sono quindi facilmente solubili in soluzioni a base di acqua (CAST, 2003).

Al gruppo delle fumonisine appartengono almeno 8 differenti composti correlati chimicamente tra di loro e riconducibili strutturalmente all'1,2,3 tricarbossi pentanoico acido 2-ammino-12,16-dimetil polidrossieicosano.

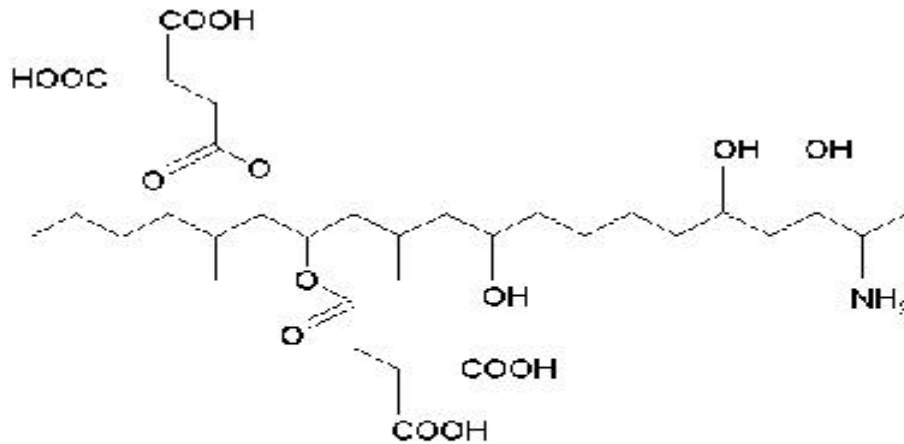


Fig 3.2 Struttura chimica della fumonisina B1

La fumonisina B1 con la B2 e la B3 rappresentano dal punto di vista quantitativo le tre più importanti fumonisine.

La fumonisina B1 (FB1) è costituita da 2S-amino-12S,16R-dimetil-3S,5R,10R,14S,15R-penta-idrossi-eicosano con i gruppi idrossido in posizione C14 e C15 esterificati dal gruppo carbossile terminale dell'acido propano-1,2,3, tricarbossilico (TCA). Il gruppo amminico libero della FB1, sembra giocare un ruolo specifico nell'attività biologica (Bolger et al., 2001).

Il loro accumulo e la loro ingestione attraverso mangimi contaminati sono stati correlati con diversi casi di ELEM (leucoencefalomalacia equina) (Thiel, P.G., et al. 1991); e di sindrome da edema polmonare nei suini (Ross, P.F.; et al. 1990). Inoltre negli animali che hanno subito danni da fumonisine sono evidenti i danni in sede autoptica a livello epatico e renale. (Visconti, A.; et al. 1999) La presenza di fumonisine, con altre tossine prodotte da *Fusarium* spp. è stata associata in alcune regioni del globo, nord Italia, Sud Africa e sud est asiatico, alle abitudini alimentari delle popolazioni autoctone ed a una maggiore incidenza di patologie neoplastiche esofagee (Franceschi, S.; et al. 1990). In tali regioni la dieta è particolarmente ricca, o addirittura 13 esclusivamente composta da cereali e da mais che rappresentano il substrato ideale di accrescimento di *Fusarium* tossinogeni e a conferma di ciò numerosi studi riportano una elevata presenza di fumonisine quali contaminanti

naturali. (Rheeder, J.P.; et al. 1992) (Fun, S. Chu; Guo, Y. Li; 1994).

Il meccanismo di azione delle fumonisine è di inibizione nella sintesi delle proteine e inoltre sono la causa di frammentazione del DNA (Doko et al., 1995; Dombrink-Kurtzman 1994; 2003; Gelderblom et al., 1995; Norred et al., 1990). Sono stati condotti degli esperimenti su primati dove le loro cellule renali sono state trattate con FB1, si è notato una netta diminuzione della concentrazione della proteina chinasi C. La riduzione di questa proteina, altera la normale attività della via di traduzione del segnale, causando tra i possibili effetti nocivi, la formazione di fenomeni di carcinogenesi (Huang et al., 1995). In aggiunta, la biotrasformazione epatica ad opera di enzimi epatici come la monoossigenasi P450, converte la FB1 in forme molecolari più tossiche (Spotti et al., 2001); difatti, può essere parzialmente o completamente idrolizzata tramite la rimozione di una delle due catene di acidi tricarbossilici. Da questa reazione enzimatica, si ottengono due molecole parzialmente idrolizzate chiamate aminopoliol 1, aminopoliol 2 e una molecola totalmente idrolizzata chiamata aminopentolo 1 (AP1). Queste molecole, presentano una maggior capacità citotossica della FB1, ma la perdita delle catene laterali degli acidi tricarbossilici le rende meno assimilabili a livello intestinale (Gelderblom et al., 1993; Hendrich et al., 1993; Hopmans et al., 1997). Nel caso dei ruminanti, le fumonisine sono degradate dalla microflora intestinale, e a livello delle feci, si ritrovano le forme parzialmente e/o totalmente idrolizzate della FB1 (Caloni et al., 2000; Gurung et al., 1999; Prelusky et al., 1996; Rice e Ross, 1994)

La fumonisina FB1 inibisce un enzima, noto come N-acil-transferasi, chiave del metabolismo degli sfingolipidi. Questo, catalizza la reazione in cui un acil-CoA si combina con la sfingosina e la sfingenina per formare ceramidi, che vengono successivamente trasformati in sfingolipidi complessi (Voss K.A., 2007).

La potente azione inibente della FB1 sulla sintesi degli sfingolipidi, sembra essere alla base degli effetti tossici provocati da queste sostanze, sia nell'uomo che negli animali, in particolar modo a livello del fegato (Voss K.A., 2007).

Sulla base di questi dati biologici insieme a numerose altre sperimentazioni sulle attività delle fumonisine "L'Agencia Internazionale per la Ricerca sul Cancro" ha provveduto ad inserire nel gruppo B2, composto possibile cancerogeno per l'uomo, le tossine prodotte da *Fusarium moniliforme* (Visconti, A., et al. 1999).

A differenza delle altre micotossine, le fumonisine sono idrofiliche, sono quindi facilmente solubili in soluzioni a base di acqua.

FUMONISINE (somma di B1 e B2)	TENORI MASSIMI (µg/kg)
Granoturco non trasformato, ad eccezione del granturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	4000
Granoturco destinato al consumo umano diretto, prodotti a base di granturco destinati al consumo umano diretto	1000
Cereali da colazione e merende a base di granturco	800
Alimenti a base di granturco trasformato e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200
Frazioni della molitura del granturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	1400
Frazioni della molitura del granturco di dimensioni = 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni = 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	2000

Tabella Regolamento CE 1881/2006 che definisce i tenori massimi di Fumonisine

3.3 Zearalenoni

Lo Zearalenone (ZEA) é una tossina prodotta da funghi del genere *Fusarium*, quali *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. cerealis* e *F. heterosporum*; queste specie sono note per colonizzare cereali e tendono a svilupparsi in particolare nelle zone temperate.

L'attività tossigena di questi funghi può iniziare nelle colture cerealicole infette (Mais, Frumento, Sorgo, Orzo, Avena) e continuarla durante la raccolta e nei prodotti conservati (granaglie, insilati, fieni) se le condizioni restano favorevoli (contenuto di umidità dei prodotti del 20-22% e alternanza di temperature diurne di 22-25°C e notturne di 12-15° C che stimolano la formazione di Zearalenone).

Lo zearalenone chimicamente è il lattone dell'acido resorciclico e i suoi principali metaboliti sono l' α -ZOL ed il β -zearalenolo (β -ZOL).

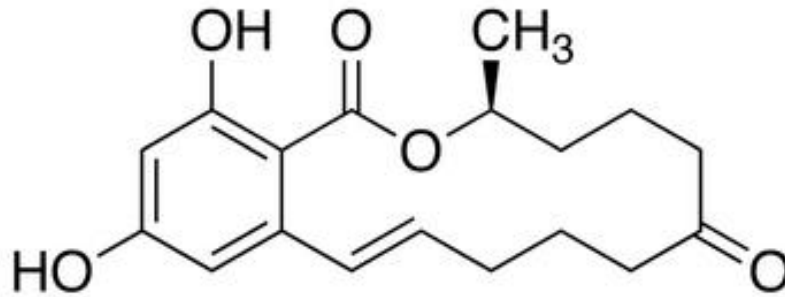


Fig 3.3 Struttura chimica dello zearalenone

Lo ZEA, quando viene ingerito dagli animali tramite alimenti contaminati, viene assorbito dall'intestino, attraverso il flusso sanguigno trasportato al fegato, dov'è convertito nei due isomeri α e β . Questo processo, avviene in due fasi; la prima è una reazione di coniugazione tra lo zearalenone e l'acido glucuronico, mentre la seconda è la reazione di riduzione dello ZEA nei suoi due metaboliti (Mirocha et al., 1977; 1981). Tra questi due metaboliti finali, quello che presenta la maggior azione estrogena è l' α -zearalenone; entrambi svolgono un'azione inibente della fertilità, dello sviluppo ormonale, aborti, riduzione della produzione del latte nei ruminanti e fenomeni di diarrea in varie specie animali (Arukwe et al., 1999; Smith et al., 1995; Sprosen e Towers, 1995).

L'azione dello ZEA si sviluppa a livello dei recettori degli estrogeni (Gentry, 1986; Hayes, 1994), il quale si lega ad essi e viene trasportato verso il nucleo della cellula. Una volta nel nucleo, la coppia recettore-ZEA si lega ai recettori cromatinici dando così il via alla trascrizione. Lo ZEA, in particolare, va a competere con l'estradiolo B17 (E2) nel legame dei recettori citoplasmatici degli estrogeni, aumentando così l'attività dell'RNA polimerasi I, II e della sintesi proteica (Boyd e Wittliff, 1978; Kawabata et al., 1982). Questa attivazione genetica, ha diversi effetti biochimici, quali la riduzione nell'assorbimento dell'acqua, riduzione lipidica nei muscoli, aumento della permeabilità uterina al glucosio ed infine una riduzione della sintesi degli ormoni estrogeni.

A basse concentrazioni, lo ZEA manifesta un'attività anabolica ed uterotrofica, mentre a più alte concentrazioni, manifesta un'attività estrogeno-simile (Moretti et al., 2006).

La sintomatologia è rappresentata da scoli vaginali, iperestrogenismo, estro

prolungato, canestro, modifica della libido, infertilità, pseudo-gravidanze, sviluppo della ghiandola mammaria e lattazioni anormali. Diversi studi hanno dimostrato, infatti, la possibile trasmissione dello ZEA e dei suoi metaboliti nel latte di pecora (Hagler et al., 1980), mucca (Mirocha et al., 1981) e scrofa (Marcato, 1998). Lavori sperimentali hanno dimostrato che somministrando mangimi contaminati a bovini (40 mg/kg) è stata riscontrata la presenza di β -ZOL (80% dei metaboliti), di α -ZOL (15% dei metaboliti) e tracce del composto immodificato nel latte. La persistenza dei residui nel latte è evidenziabile per 5 giorni dopo la sospensione dell'assunzione (Tiecco, 2001). Mirocha e collaboratori (1981) riportano che solo lo 0,7% dello ZEA ingerito viene escreto con il latte. Nelle ovaiole la maggior parte del tossico viene eliminata con le feci, ma piccole percentuali di ZEA e metaboliti si possono accumulare nel tuorlo (Hoerr, 2001). Studi recenti, però, hanno evidenziato che l'utilizzo di mangimi contenenti 275 μ g/Kg di ZEA non determinano la formazione di residui rilevabili. Questo fatto è giustificato dal fatto che nei ruminanti, lo ZEA e i suoi metaboliti, sono nella maggior misura eliminati a livello della bile ed escreti nelle urine e feci. Questo meccanismo, insieme all'attività dei batteri ruminali, permette di avere un'elevata detossificazione e resistenza alla contaminazione alimentare da parte dello ZEA (Biehl et al., 1993; Hidy et al., 1977; Kuiper-goodman et al., 1987).

Un'altra fonte di assunzione dello ZEA e dei suoi metaboliti è rappresentata dalla carne. I dati relativi al passaggio di micotossine da animali esposti a mangimi contaminati all'uomo sono comunque molto frammentari e quindi il fenomeno dev'essere approfondito. Dati ulteriormente carenti sono quelli relativi al controllo degli alimenti destinati ai bambini, che sono i soggetti maggiormente a rischio nei confronti di molecole ad attività ormonale come lo ZEA ed i suoi metaboliti.

La sua azione nei confronti dell'uomo non è di tipo cancerogeno, ma viene comunque definita come un'azione genotossica; infatti recentemente è stata accertata la correlazione tra alimenti fortemente contaminati da ZEA con l'elevata incidenza del cancro alla cervice uterina.

Nel 1993 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, ha classificato lo Zearalenone nel Gruppo 3, cioè come "non classificabile come agente cancerogeno per l'uomo".

ZEARALENONE	TENORI MASSIMI (µg/kg)
Cereali non trasformati diversi dal granoturco	100
Granoturco non trasformato ad eccezione del granoturco non trasformato destinato alla molitura ad umido	350
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali, crusca e germe come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto	75
Olio di granoturco raffinato	400
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione, esclusi le merende a base di granoturco e i cereali da colazione a base di granoturco	50
Granoturco destinato al consumo umano diretto, merende a base di granoturco e cereali da colazione a base di granoturco	100
Alimenti a base di cereali trasformati (esclusi quelli a base di granoturco) e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	20
Alimenti a base di granoturco trasformato destinati ai lattanti e ai bambini	20
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1103 13 o 1103 20 40 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni > 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	200
Frazioni della molitura del granoturco di dimensioni = 500 micron di cui al codice NC 1102 20 e altri prodotti della molitura del granoturco non destinati al consumo umano diretto di dimensioni = 500 micron di cui al codice NC 1904 10 10	300

Tabella Regolamento CE 1881/2006 che definisce i limiti massimi di Zearalenone

3.4 Aflatossine

Le aflatossine sono state isolate circa 40 anni fa, in corrispondenza di una moria di 100000 tacchini in Inghilterra (denominata malattia X) e della scoperta del cancro della trota iridea; entrambi gli animali erano alimentati mediante una miscela a base di arachidi e semi di cotone.

Le aflatossine conosciute fino ad oggi sono 18 ma di queste sono quattro le più diffuse: B1, B2, G1, G2. Chimicamente sono dei derivati della cumarina e vengono

denominate con le sigle B1, B2 (rispettivamente metossi-difuro-cumarone e metossi-difuro-cumaro-lattone), G1, G2 (loro diidroderivati),

La B1 è la più diffusa e pericolosa. Prendono il loro nome da un'intensa fluorescenza blu (B1 e B2) o verde (G1 e G2) se sottoposte a luce ultravioletta.

Questa colorazione, è il frutto di una reazione chimica da parte dell'*Aspergillus*, dove l'acido coico, per azione di una per ossidasi, si converte in una sostanza fluorescente, visibile tramite una luce UV di 365 nm.

L'aflatossina M1 (da milk) è un metabolita idrossiderivato della aflatossina B1; va cercata e controllata nel latte anche perché vi sono norme precise che ne stabiliscono i limiti di presenza.

Le aflatossine B1 e B2, sono prodotte sia da *A. flavus* che da *A. parasiticus*, mentre le G1 e G2 solo da *A. parasiticus*. L'incapacità da parte dell'*A. flavus* di sintetizzare le G1 e G2 è dovuto al fatto che i primi 2 geni, *norB* e *cypA*, coinvolti nella sintesi, sono cancellati (Ehrlich et al., 2004).

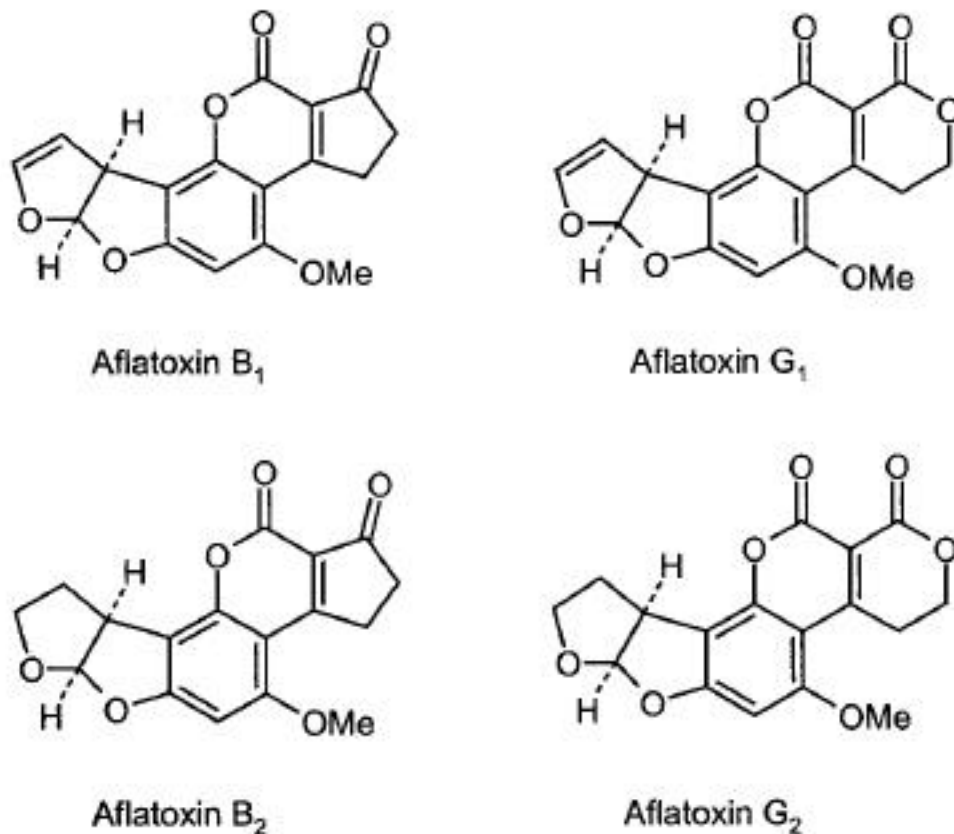


Fig 3.4 Struttura chimica della aflatossine B1, B2, G1, G2

PRODOTTO	B1	B1+B2+ G1+G2	M1
Arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti derivati destinati al consumo umano diretto, ovvero all'utilizzazione quali ingredienti di derrate alimentari.	2	4	
Arachidi da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici, prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di derrate alimentari.	8	15	
Frutta a guscio e frutta secca da sottoporre a cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	5	10	
Cereali (ivi compreso grano saraceno, Fagopyrum sp.), e prodotti della lavorazione destinati al consumo umano diretto o all'impiego come ingrediente di derrate alimentari	2	4	
Cereali (ivi compreso grano saraceno, Fagopyrum sp.) destinati alla cernita o ad altri trattamenti fisici prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	2	4	
Granoturco da essere sottoposto a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano e dell'impiego quale ingrediente di derrate alimentari	5	10	
Cereali non lavorati (compreso riso non lavorato e grano saraceno)			
Tutti i prodotti derivati dai cereali (compresi i prodotti lavorati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto)			
Frutti essiccati della vite (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)			
Caffè torrefatto e caffè torrefatto macinato, ad eccezione del caffè solubile			
Caffè solubile (istantaneo)			
Vino (rosso, bianco e rosè) e altri vini e/o altre bevande a base di mosto d'uva. Succo d'uva, ingredienti a base di succo d'uva in altre bevande, incluso il nettare di uva e il succo d'uva concentrato, ricostituito. Mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati direttamente al consumo umano			
Alimenti per bambini e alimenti a base di cereali per lattanti e bambini. Alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, soprattutto all'alimentazione dei lattanti	0.1		
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte per lo svezzamento			0.025
Latte (latte crudo, latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte e latte trattato termicamente)			0.05
Spezie: peperoncino, pepe, noce moscata, zenzero, curcuma	5	10	

Tabella Regolamento CE 1881/2006 che definisce i tenori massimi di aflatossine

La presenza di queste tossine nelle derrate agricole, ha assunto carattere rilevante, e di conseguenza si è cominciato a legiferare ed a compiere studi più approfonditi, solo dal 2003, complice l'annata agraria sfavorevole dal punto di vista climatico. Queste condizioni hanno portato ad una situazione di pericolo nella filiera zootecnica, dove si sono registrati livelli di aflatossina M1 superiori ai limiti di legge nella latte prodotto. Data questa premessa, e per la cancerogenicità dell'aflatoxina B1, queste tossine sono le più studiate e controllate, e nel presente elaborato saranno oggetto di studio e di approfondimento.

3.4.1 Genere *Aspergillus*

Il genere *Aspergillus* comprende più di 185 specie, raccolte in 18 gruppi, quelle attualmente conosciute come agenti di infezioni opportunistiche nell'uomo sono circa 20. *Aspergillus* fu per la prima volta catalogato nel 1729 dal sacerdote e biologo italiano *Pier Antonio Micheli*. La vista dei funghi al microscopio fece venire a *Micheli* in mente la forma di un aspersionario, in latino *aspergillum* (spruzzatore d'acqua lustrale) e denominò il genere di conseguenza. Nel 1809, fu *Link* a dare il nome di *Aspergillus glaucus* ad un fungo trovato in un erbario, descrivendo le prime forme sessuate sotto il nome di *Eurotium herbariorum*. Per attribuire un ruolo patogeno al genere *Aspergillus* si dovette aspettare il 1847, quando *Sluyter* pubblicò i primi casi di pneumopatia umana dovuta ad un *Aspergillus*. Le ricerche su tale genere divennero man mano più numerose e nel 1926 *Thom* e *Church* pubblicarono il primo libro: "*The Aspergilli*", classificando 69 specie in 11 gruppi. Nel 1945 venne pubblicato il libro "*A manual of the Aspergilli*" di *Thom* e *Raper*, nel quale furono classificati 14 gruppi contenenti 80 specie e 10 varietà. Nel 1965 *Raper* e *Fennel* pubblicarono "*The genus Aspergillus*", contenente 18 gruppi e 132 specie e più tardi, nel 1979, fu *Samson* ad aggiungere alla già copiosa lista altre 45 nuove specie. Una nuova classificazione è stata pubblicata da *Pitt* nel 1989 e a tutt'oggi sono state identificate più di 185 specie, di svariato interesse.

L'*Aspergillus* è un fungo dalla struttura filamentosa e in natura è praticamente ubiquitario: viene comunemente isolato nel suolo come resti vegetali, tessuti animali, residui dell'ambiente domestico, silos, compost e balle di fieno. In aggiunta alla

natura saprofitica, tanto da risultare fra i più comuni contaminanti delle colture microbiche, è un patogeno di numerose specie vegetali e animali, compresi gli esseri umani e animali domestici. Le specie appartenenti a questo genere sono fortemente aerobiche e crescono in quasi tutti gli ambienti ricchi di ossigeno, di solito sulla superficie di un substrato. Molte specie si sviluppano a danno di cibi ricchi di amido, come i cereali, semi di cotone, arachidi e noci.

Diverse specie manifestano inoltre il fenomeno dell'oligotrofia, cioè sono in grado di crescere in ambienti poveri o addirittura privi di nutrienti fondamentali. Un esempio è l'*Aspergillus niger* che cresce sui muri umidi.

Sebbene comprenda i principali patogeni fungini filamentosi per l'uomo come l'*A. fumigatus* (Brookman e Denning, 2000; Latge, 1999); la maggior parte dei membri di questa specie, rivestono un ruolo importante in natura. Sono tra gli organismi più importanti sulla terra che concorrono alla degradazione dei polisaccaridi naturali (De Vries et al., 2000; De Vries, 2003) e risultano essere importanti per la produzione industriale in larga scala di enzimi omologhi ed eterologhi (Fawole e Odunfa, 2003; Wang et al., 2003). Tra questi funghi non dannosi si può citare l'*A. Oryzae*, impiegato da tempo nei paesi orientali per fermentazioni a scopo alimentare.

Il genoma di questa specie si caratterizza nell'aver un numero di cromosomi pari ad 8, con un numero di geni che vanno da 9121 dell'*A. clavatus* ai 12604 dell'*A. flavus*. In base al numero di paia di basi, abbiamo che il minore è l'*A. clavatus* con 27.86 milioni di paia di basi, invece il maggiore è l'*A. niger* con 37.2 milioni di paia di basi.

Tutti gli *Aspergillus* sono caratterizzati dalla loro particolare modalità di riproduzione conidiale: presenza di un conidioforo (detto anche stipe terminante con un rigonfiamento denominato vescicola; su quest'ultima si formano le fialidi, o direttamente o attraverso una serie di corte cellule sterili dette metulae (*Sterigmates*); ogni fialide produce una catena di spore ramificate; l'insieme della vescicola, delle fialidi e delle spore prende il nome di testa aspergillare.

Le spore hanno un tallo e una morfologia (tonde, rugose da 2 a 3 μm di diametro) tali da favorire sia la loro disseminazione, poiché minore è l'attrito con i movimenti dell'aria, sia il loro passaggio attraverso il tratto respiratorio fino agli alveoli polmonari, dove possono provocare micosi primarie, particolarmente in individui immunodepressi o compromessi.

La maggior parte degli *Aspergillus* sono mitosporici, cioè producono le spore per riprodursi in modo asessuale, attraverso un semplice processo di mitosi; alcuni di essi però presentano uno stato teleomorfico, ossia sono in grado di produrre delle formazioni sessuate dette cleistoteche contenenti degli aschi ad 8 ascospore.

L'*Aspergillus fumigatus* è la specie che viene isolata più di frequente, seguita dall'*Aspergillus flavus* e dall'*Aspergillus niger*. Tra le specie meno comuni all'origine di infezioni fungine opportunistiche ci sono: *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus* e *Aspergillus versicolor*.

Le principali specie dal punto di vista scientifico, patologico e agronomico, sono le seguenti:

- *A. Flavus*
- *A. Fumigatus*
- *A. Niger*
- *A. Glaucus*
- *A. Nidulans*
- *A. Oryzae*
- *A. Terreus*
- *A. Ustus*
- *A. Versicolor*

3.4.1.1 *Aspergillus flavus*

Regno: *Funghi*

Phylum: *Ascomycota*

Ordine: *Eurotiales*

Famiglia: *Trichocomaceae*

Genere: *Aspergillus*

L'*A. flavus* è il più famoso e studiato del suo genere, sia perché è la specie maggior produttrice di aflatossine, sia perché è la causa di aspergillosi nell'uomo assieme all'*A. Fumigatus*.

Come tutto il genere *Aspergillus*, trova il suo sviluppo ideale a temperature calde, con un optimum tra i 32-36 e i 38°C, mentre il suo sviluppo risulta ridotto a temperature inferiori a 12° e superiori a 42°C (Causin, 2006). Proprio questo range di temperatura, che risulta essere quella del corpo umano, è la causa principale dei sintomi sull'uomo dell'aspergillosi. Il parametro ambientale fondamentale per la sua crescita, risulta essere l'umidità (Gibson et al., 1994), dove trova la condizione ottimale nell'intervallo tra 0.86 e 0.96 di a_w (Vujanovic et al., 2001). Per a_w si intende "l'attività dell'acqua", e rappresenta la misura della disponibilità dell'acqua per lo sviluppo dei microrganismi. Quando questa è uguale a 1, significa che tutta l'acqua presente è disponibile; si può assumere come valore critico per i funghi 0.70, a 0.6 l'azione enzimatica è fortemente inibita e a 0.3 questa cessa completamente.



Fig 3.5 testa conidiale di *A. flavus*

L'*A. flavus* è stato diviso in due morfotipi in base alle dimensioni sclerozio: L (large), che produce sclerozi di 4.400 millimetri di diametro, e S (small), che produce numerosi sclerozi <400 mm di diametro, in associazione con pochi teste di conidi (Cotty 1989). Tuttavia, la morfologia dello sclerozio è un indicatore di scarsa filogenesi. *A. flavus*, così come attualmente descritto, si compone di diversi lignaggi principali (Tran e Dinh *et al.*, 1999; Ehrlich *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006) che non sono ancora completamente definiti, perché le analisi filogenetiche spesso non tengono conto della ricombinazione, la selezione e il bilanciamento, entrambi i quali

possono indurre ad errori filogenetici significativi (Carbone *et al.*, 2007). (Geiser *et al.*, 1998, 2000) ha diviso queste due categorie in due gruppi (I e II) sulla base del RFLPs (polimorfismo da lunghezza dei frammenti di restrizione) di geni nucleari codificanti e sequenze di DNA. Il gruppo I, contiene i ceppi sia L che S che producono solo aflatoossina B; il gruppo II, contiene solo i ceppi della categoria S, che producono aflatoossine B e G, p più raramente solo B.

Come detto in precedenza, il genoma di *A. flavus* si compone di otto cromosomi (come per tutto il genere *Aspergillus*), 36,79 mb (milioni di paia di basi) suddivise in 12604 geni, con una percentuale di coppie GC pari a 48.35. Presenta inoltre un numeri di geni tRNA pari a 248, mentre il numero di geni rRNA è di 51. Le vescicole appaiono di forma piriforme o sferiche, i fialidi sono in serie unica o duplice e i conidiofori sono di aspetto rugoso.

A. flavus come detto in precedenza, è un organismo metabolicamente molto versatile nella sua capacità di utilizzare molti substrati diversi, piante, animali o di origine antropica (Raper e Fennell 1965; Hasan 1999). Materia morta e materiale vegetale vivente, rappresentano la fonte dominante di cibo in natura. Una vasta gamma di composti organici sono degradati ed utilizzati, tra cui la cellulosa, pectine, lignina, tannini, cutina, amido, lipidi e proteine (Olutiola 1976; Betts e Dart 1989; Guo *et al.* 1996; Long *et al.* 1998; Brown *et al.* 2001; Mellon e Cotty 2004; Batra e Saxena 2005). Questa capacità di produrre una grande quantità di enzimi degradanti è indicativo dello stile di vita opportunistico di questo fungo in cui le risorse temporaneamente disponibili sono prontamente sfruttate (St. Leger *et al.* 1997).

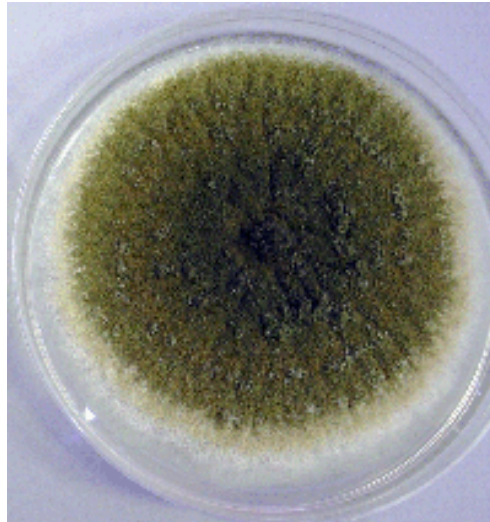


Fig 3.6 Colonia di *Aspergillus flavus*

La colonia, allevata in laboratorio, come si può vedere dall'immagine, si presenta di colore verde-giallo, con margini netti e presenta abbondante micelio aereo di tipo fioccoso.

3.4.1.1 Sintesi delle aflatossine, via metaboliche e geni coinvolti

Come accennato in precedenza, *l'A. flavus* risulta essere la specie maggior produttrice di aflatossine, in particolar modo della B1. Per attivare la sintesi della tossina, il fungo dev'essere portato ad uno stato di stress, soprattutto per quanto riguarda il livello di a_w .

La biosintesi delle aflatossine, è regolata da un processo multi enzimatico che coinvolge almeno 23 enzimi, si formano 15 composti intermedi, codificati da un gruppo di 25 geni che si trovano raggruppati in una regione di 70 kb nel terzo cromosoma (Smith *et al.*, 2007).

Mediamente, 2.8 kb di DNA costituiscono un gene, tre di questi 25 geni, che codificano per la sintesi degli acidi grassi FASa e FASb, e per la polichetide-sintasi, sono più grandi e occupano rispettivamente 5.8, 5.1, 6.6 kb. Gli altri 22 geni, occupano circa 2 kb l'uno. D'ora in avanti, con la sigla "afl", si farà riferimento a tutti i geni coinvolti attivamente nella biosintesi delle aflatossine, e sarà seguita da una lettera maiuscola da "A" a "Y". Di questi geni, in particolar modo aflR e aflS

hanno un ruolo chiave e sono responsabili dell'attivazione della trascrizione dei geni. Alcuni studi hanno dimostrato che il gene *aflR* è necessario per la trascrizione di alcuni dei geni strutturali presenti nella biosintesi (Chang *et al.*, 1993, 1995; Payne *et al.*, 1993; Woloshuk *et al.*, 1994; Ehrlich e Montalbano, 1995; Ehrlich *et al.*, 1998). Questo gene codifica la proteina Zn₂Cys₆, AFLR, che possiede la capacità di trascrizione ed attivazione tipiche della famiglia delle proteine GAL4 (Ehrlich *et al.*, 1998).

AflS è adiacente ad *aflR* ed interagisce con esso (Chang P.K., 2003). Nei ceppi mutanti, la mancanza di trascrizione di *aflS* è collegata ad una forte diminuzione dell'espressione di alcuni geni presenti nel percorso della biosintesi come *aflC*, *aflD*, *aflM*, *aflP*, perdendo così la capacità di sintetizzare i metaboliti intermedi.

Vari studi hanno stabilito che le aflatossine sono sintetizzate in due fasi dal malonil CoA, prima con la formazione di hexanoyl CoA riduttasi, seguito dalla formazione di un antrachinone decacetide (Minto e Townsend, 1997). Una serie di reazioni di ossidazione altamente organizzata di riduzione permette quindi alla formazione di aflatossina.

Due acidi grassi sintasi (FAS e AF-1-2), e un gene polichetide sintasi (*pksA*) sono coinvolti nella sintesi del decacetide da malonil CoA. Una volta costituito, il decacetide dovrebbe subire la chiusura ad anello per formare un prodotto, il norantrone, che poi subisce un'ossidazione per formare il primo stabile intermedio, l'acido norsolorinico (NOR)(Bennet, 1981). Un enzima non specifico è legato alla conversione dal norantrone a NOR, ma si presume che un'ossidasi sia coinvolta in questo processo (Vederas, 1980; Ehrlich, 1992).

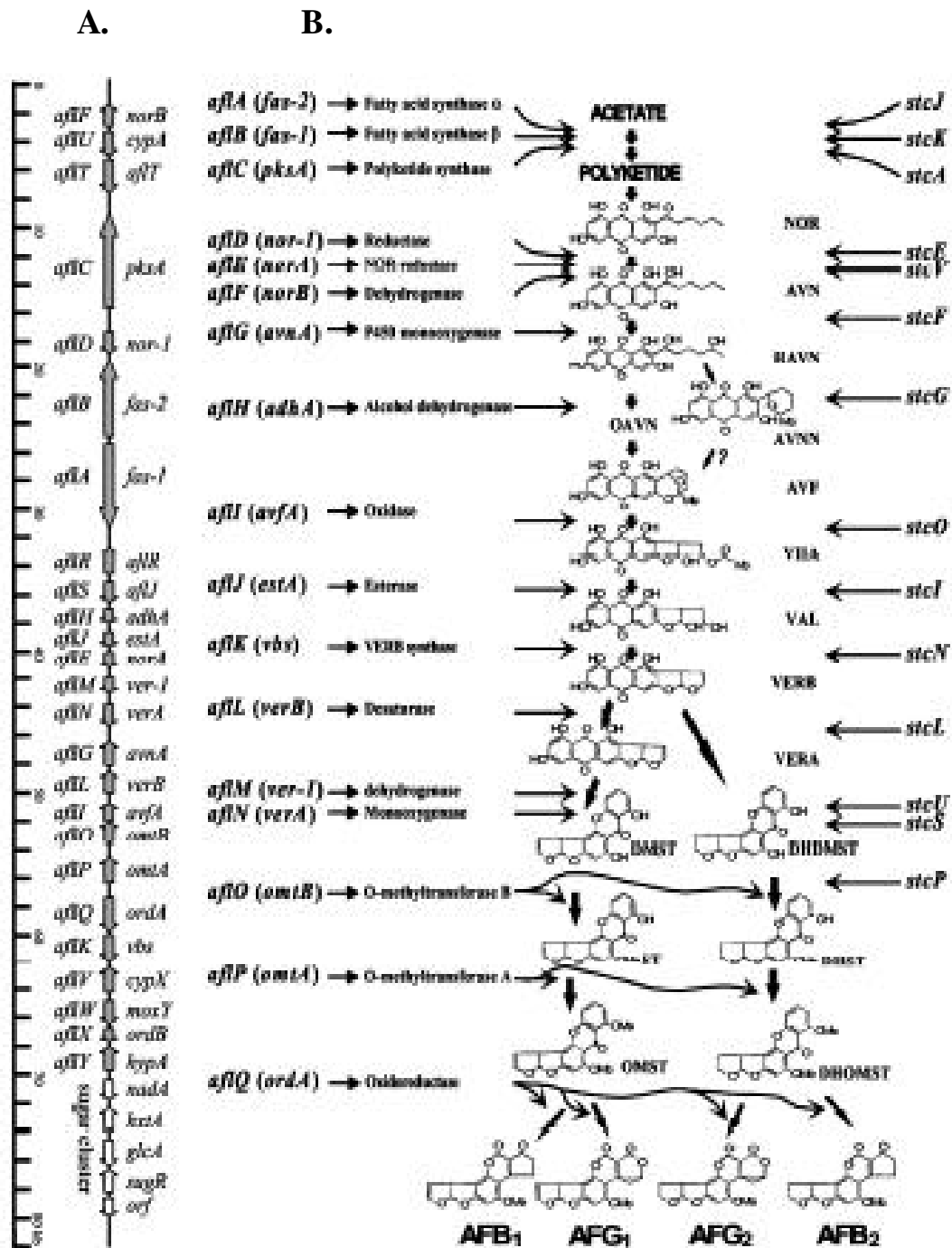
Le altre fasi della biosintesi, sono state definite più chiaramente, la conversione da NOR a AVN (Bennet, 1980) richiede una deidrogenasi, codificata dal gene, *nor-1*. Alcuni geni aggiuntivi, come *norA* o *norB* sono in cluster che codificano per la deidrogenasi, che potrebbe essere in grado di eseguire la conversione. IL gene *nor-1* gene è stato clonato per complementazione dall'acido norsolorinico (NOR). Il gene che codifica la chetoriduttasi responsabile della conversione di versicolorin A (VER A) a sterigmatocistina (ST) è stato anche clonato da un cosmide di *A. parasiticus* (Yu J *et al.*, 2003).

I passi principali della bioconversione sono brevemente riassunti come segue: il gene regolatore, *aflR*, che codifica per il fattore di regolamentazione, la proteina AFLR, controlla, a livello trascrizionale, l'espressione dei geni. Il *fas-1*, *fas-2* e dei prodotti

del gene *pksA*, acidi grassi sintasi e polichetide sintasi, sono coinvolti, rispettivamente, nei passaggi di conversione tra le unità iniziali di acetato nella sintesi del polichetide. Il gene *nor-1* codifica una redattasi, responsabile della conversione del NOR a AVN. Il gene *avnA* codifica una monoossigenasi del citocromo P450 coinvolto nella conversione da AVN a AVF. Il gene *avfA* codifica una ossidasi coinvolta nella conversione da AVF a VHA. I geni *ver-1* e *verA* codificano una deidrogenasi responsabile della conversione di VER a DMST. Il gene *omtA* codifica una O-metiltransferasi per la conversione di ST a OMST e DHST a DHOMST. Il gene *Orda* codifica una ossidoreduttasi coinvolta nella conversione da OMST a AFB1 e AFG1 e DHOMST a AFB2 e AFG2.

Abbreviazioni: NOR, acido norsolorinico; AVN, averantin; Havn, 5'idrossiyaveratin; averufanin AVNN; AVF, averufin; VHA, versiconal acetato emiacetale; VAL, versiconal, verbo, versicolorin B; Vera, versicolorin A; DMST, dimetilsterigmatocistina; DHDMST, diidrodimetillsterigmatocistina, ST, sterigmatocistina; DHST, diidrosterigmatocistina; OMST, O-metilsterigmatocistina; DHOMST, diidro-O-metilsterigmatocistina; AFB1, B1; AFB2, B2 aflatossina; AFG1, le aflatossine G1; AFG2, G2 aflatossina e M-transferasi, metiltransferasi.

Il processo di biosintesi delle aflatossine si può così riassumere nel seguente schema: precursore dell'hexanoyl CoA → acido norsolorinico, NOR → averantin, AVN → idrossiaverantin, HAVN → averufin, AVF → idrossiversicolorone, HVN → versiconal hemiacetal acetate, VHA → versiconal, VAL → versicolorin B, VERB → versicolorin A, VERA → dimetil-sterigmatocistina, DMST → sterigmatocistina, ST → O-metilsterigmatocistina, OMST → aflatossina B1, AFB1 e aflatossina G1, AFG1 (Ehrlich, 1992).



percorso biosintetico delle aflatoxine (B). La line averticale rappresenta il segmento di DNA (82 kb) contenente i geni coinvolti nella biosintesi delle alfatossine in *A. flavus* e *A. parasiticus*. I nuovi nomi dei geni sono elencati sul lato sinistro, mentre i vecchi sul lato destro. I geni coinvolti nella biosintesi di ST in *A. nidulans* sono elencati a destra della colonna B. Nella colonna B sono elencati gli enzimi coinvolti in ogni bioconversione dei composti intermedi.

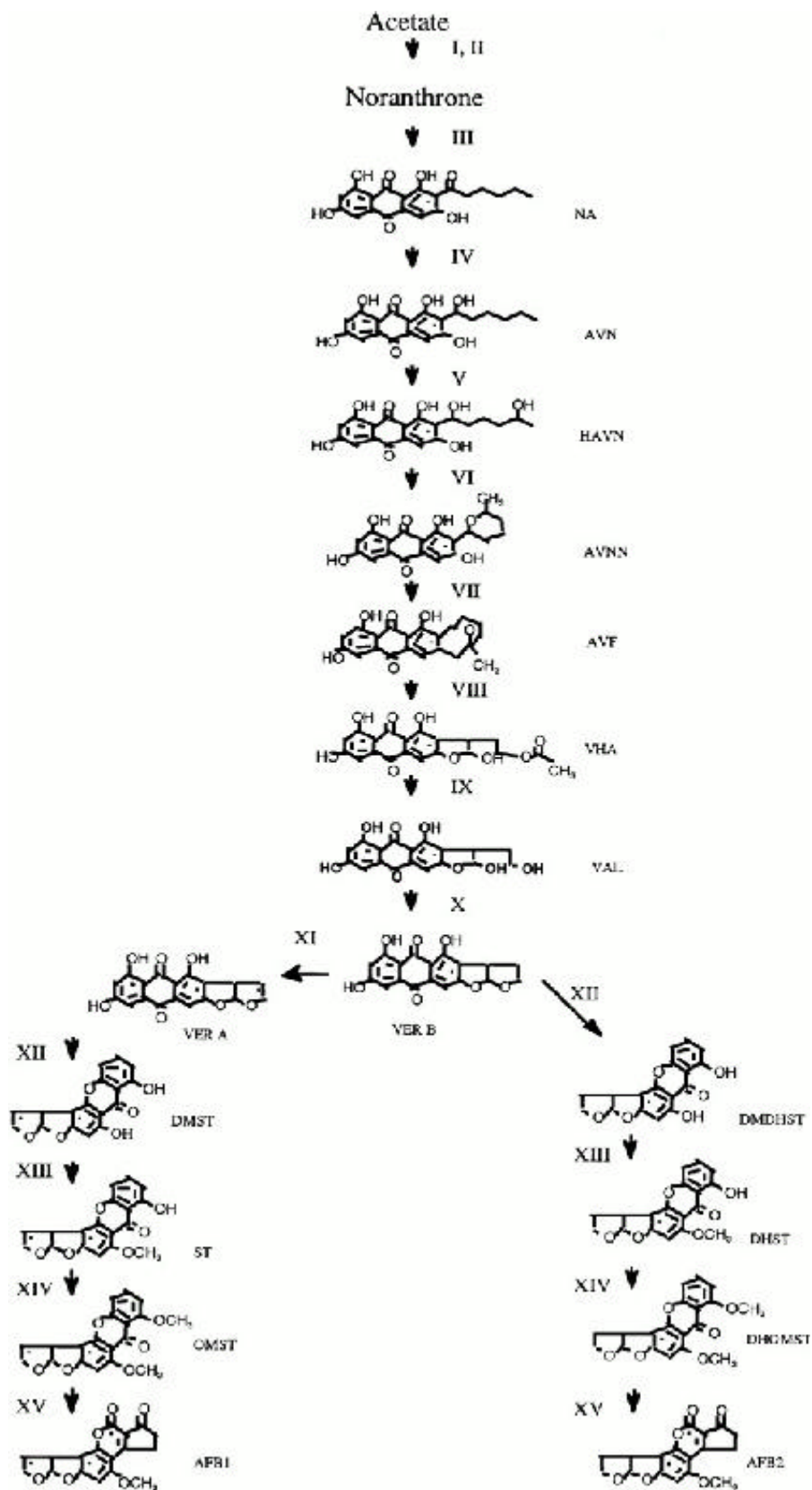


Fig 3.8 Schema che rappresenta la sequenza di trasformazioni chimiche che danno origine alle Aflatossine B.

3.4.1.1.2 Fattori che influiscono sulla sintesi delle aflatossine

La formazione delle micotossine è strettamente connessa alla crescita fungina; senza di essa, la produzione di tossine non avviene. Inoltre, la presenza di funghi tossigeni in un alimento non indica automaticamente la presenza di micotossine, specialmente se non vi è crescita fungina.

D'altra parte, le tossine possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte e/o l'eliminazione del fungo. L'assenza di ceppi fungini negli alimenti non indica pertanto necessariamente l'assenza anche di micotossine.

Molti fattori, biotici ed abiotici, possono interferire con la sintesi di queste tossine, primi tra questi figurano la temperatura e l' a_w (Charmley *et al.*, 1994), seguiti da fattori nutrizionali, pH, disponibilità di ossigeno e tutti quei fattori che possono causare stress al fungo.

Relativamente alla temperatura, esperimenti in laboratorio hanno dimostrato che la temperatura cui si registra il picco di produzione di aflatossine si attesta sui 28-30 °C, arrivando a 37 °C dove è nulla. Come detto in precedenza, 37 °C è la temperatura ottimale per lo sviluppo del fungo, ma riguardo alla produzione di aflatossine, risulta essere la temperatura limite. Si è dimostrato che, direttamente od indirettamente, la temperatura influenza la trascrizione dei geni del metabolismo secondario, i quali sono maggiormente espressi a 28 °C (O'Brian, 2007). L'espressione dei geni aflR e aflS però, rimane quasi costante anche a 37°C, anche se le tossine non vengono prodotte. (Liu e Chu, 1998) hanno riscontrato una minor espressione di aflR a 37 °C, rispetto a i 29 °C (Shimizu *et al.*, 2003) e sostengono la possibilità che aflR non sia funzionante a temperature elevate. Si è inoltre fatta l'ipotesi che a temperature elevate, aflR e aflS siano incapaci di interagire tra loro, compromettendo così la trascrizione (Chang, 2003). L'elevata temperatura, può influire anche sull'azione di alcuni enzimi operanti nella sintesi, infatti si sono notate drastiche riduzioni di produzione di tossine, trasferendo il fungo da ambienti posti a 28 °C a 37 °C.

L' a_w risulta essere il secondo parametro di influenza (Schmidt-Heydt *et al.*, 2009), infatti il loro lavoro si è concentrato sulla crescita di *A. flavus* in diverse condizioni di temperatura e a_w , confrontando crescita, produzione di tossine ed espressione genica.

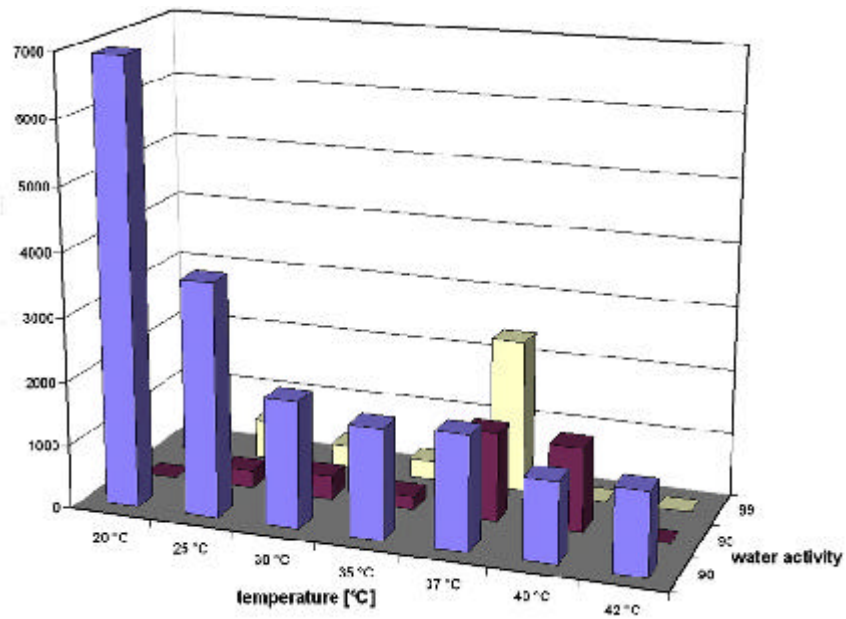


Fig 3.9 Espressione del gene aflE in rapporto a temperatura ed a_w

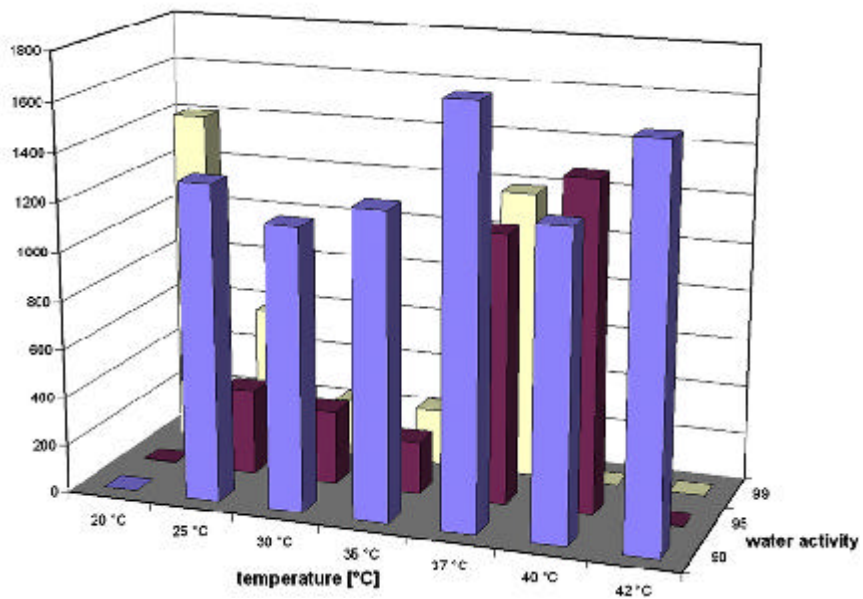


Fig 3.10 Espressione del gene aflF in rapporto a temperatura ed a_w

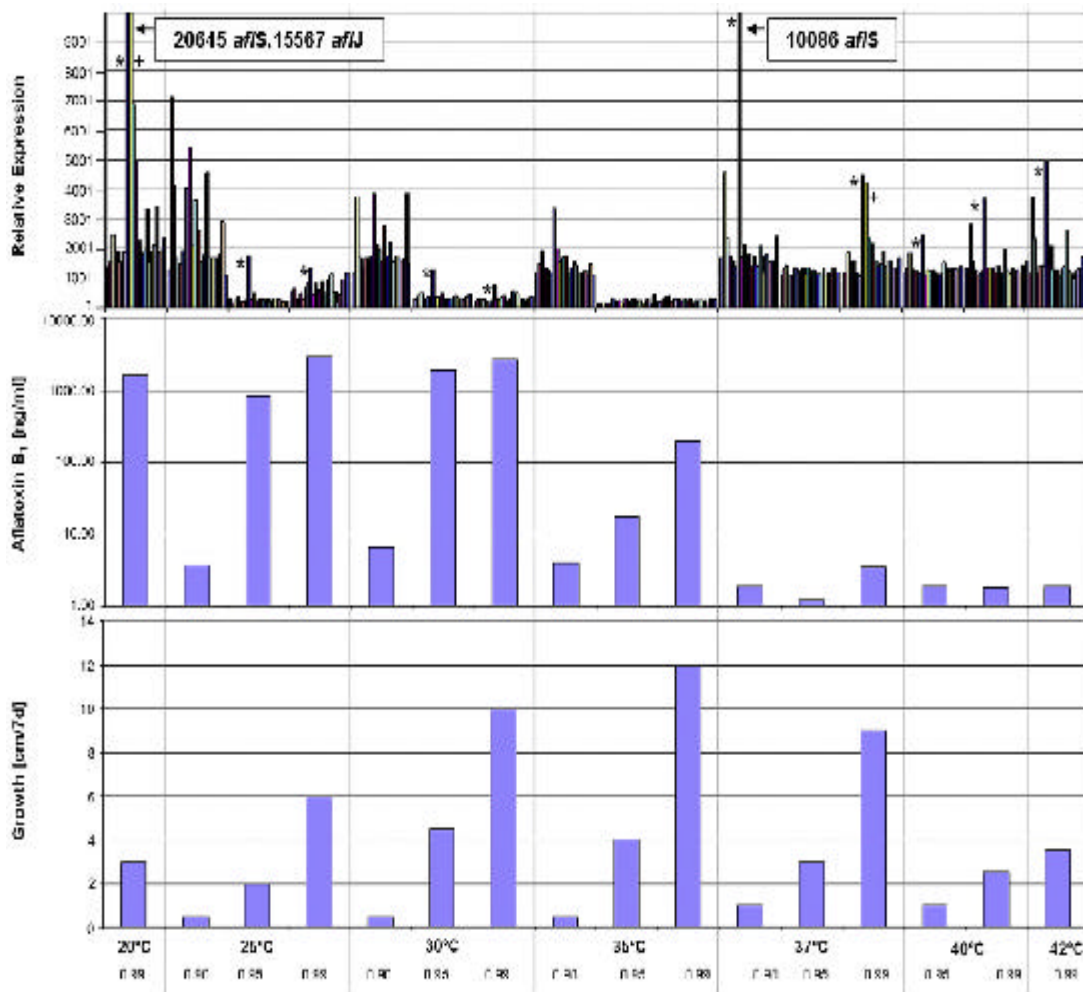


Fig 3.11 Comparazione tra l'espressione dei geni della biosintesi della aflatoxine (determinate tramite microarray), la produzione di aflatoxine (determinata tramite HPLC) e la crescita di *A. flavus* in base a diverse condizioni di temperatura e a_w .

Da questo loro test, si può notare che la produzione maggiore di aflatoxine si ha quando a_w elevata e temperatura sotto i 37 °C. In generale si può affermare che il gene regolatore è inibito da bassi livelli di a_w e da alte temperature (>37 °C).

°C \ a_w	20	25	30	35	37	40	42
0.90	X					X	X
0.95	X						X
0.99							

Fig 3.12 Matrice che mostra il livello di espressione del gene in relazione a varie combinazioni di temperatura ed a_w . La x indicano i limiti di crescita del fungo, dove i dati non possono essere usati con

obiettività; i quadrati bianchi stanno ad indicare i livelli di espressione base, livelli medi si hanno nei quadrati grigio chiaro, mentre invece nel quadrato grigio scuro si ha il più alto livello di espressione (alta a_w , bassa temperatura).

La disponibilità di fattori nutrizionali ed il pH possono anch'essi incidere sulla produzione di aflatossine. Relativamente ai fattori nutrizionali, si è visto che *Aspergillus*, fatto crescere con azoto nitrico, ha prodotto quantità di tossine notevolmente minori rispetto a crescita con azoto ammoniacale. La causa di questo comportamento, si pensa possa essere legata all'azione di "AreA", un fattore trascrizionale.

Il funzionamento di AreA è quello di legarsi al sito di riconoscimento del tetranucleotide GATA, che si trova nel promotore dei geni aflJ e aflR, impedendone la trascrizione e così facendo bloccando la produzione di tossine. Il numero di siti GATA vicino al sito iniziale di trascrizione del gene aflJ, è legato al tipo di ceppo di *Aspergillus*, e influisce sulla risposta al nitrato (Ehrlich *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda il pH, Cotty (1988) e Kelleer *et al.*, (1997), hanno dimostrato che l'aggiunta di nitrato aumenta il pH e l'aggiunta di ammoniacale ne induce una riduzione. Durante la crescita, le piante vanno incontro a periodi di stress, che possono influenzare il pH (Reddy *et al.*, 1971, 1979), *Aspergillus* riesce ad adattarsi a questi cambiamenti, dato il suo ampio range di crescita. Il grado migliore di pH per la sintesi si ha tra 3,4 e 5,5 (Bhatnagar *et al.*, 2006); passando da un pH di 4 ad uno di 8, si è notata la riduzione di cinque volte della produzione di tossine (Keller *et al.*, 1997).

La disponibilità e la quantità di ossigeno, sono risultati fattori importanti circa la sintesi di aflatossine, infatti Giorni *et al.*, (2008), ha condotto prove variando la quantità di CO₂ nell'ambiente di crescita. Ha ottenuto una diminuzione della crescita del 30-35% di *A. flavus* con il 25-50% di CO₂; portando la CO₂ al 75%, la crescita calava del 50% a valori fissi di a_w .

Lo stress ossidativo, cioè lo sbilanciamento negli equilibri biologici tra produzione ed eliminazione di composti chimici ossidanti, può concorrere con la sintesi di aflatossine (Jayashree *et al.*, 2000).

Per dimostrare questo, Narasaiah *et al.*, (2006), ha condotto esperimenti, confrontando ceppi non tossigeni con altri di tipo tossigeno. Ha riscontrato che nei ceppi tossigeni, il quoziente di respirazione (RQ: CO₂ liberata/ossigeno consumato)

è stato di molto inferiore nelle prime 48 ore di crescita, per poi crescere successivamente, registrando un maggior accumulo di perossidi organici e specie reattive all'ossigeno (ROS). In questi ceppi, è stata notata pure una maggior attività della xantina-ossidasi (XO), un enzima coinvolto nella formazione di radicali liberi e nella perossidazione lipidica; maggior attività di enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi (SOD) e la glutatione per ossidasi (GPx), questi ultimi per contrastarne l'effetto.

Aspergillus, per ovviare a questo stress, produce aflatossine (Kim *et al.*, 2005); è stato dimostrato da Ponts *et al.*, (2009) che questo vale anche per *F. graminearum* e *F. verticillioides*. Causin (2010), ha notato che in quei ceppi, l'accumulo di DON e fumonisine, rispettivamente, aumentavano dopo un trattamento di perossido d'idrogeno.

Per la riduzione della produzione di aflatossine, esistono molte sostanze, antiossidanti naturali, come l'acido gallico (Mahoney e Molyneux, 2004) e l'acido caffeico (Kim *et al.*, 2008), che spingono il fungo ad attenuare lo stress ossidativi. Composti come fenilpropanoidi, terpenoidi e alcaloidi hanno dimostrato di inibire la sintesi delle tossine (Holmes *et al.*, 2008). Huang *et al.*, (2009), ha dimostrato che l'etilene inibisce le sintesi, riducendo la produzione di ROS e bloccando la trascrizione di geni quali *aflR* e *aflD*.

3.4.1.1.3 Tossicità delle aflatossine

Le specie di funghi appartenenti al genere *Aspergillus* ricoprono un ruolo in tre diverse realtà cliniche: le infezioni opportunistiche, gli stati allergici e le tossicosi. Per quanto concerne lo sviluppo d'infezioni opportunistiche, il principale fattore predisponente è rappresentato dall'immunosoppressione.

Esiste un ampio spettro d'infezioni da *Aspergillus* di tipo opportunistico, da quelle locali a quelle diffuse: nell'insieme sono definite "aspergillosi". L'aspergillosi è, in particolare, frequente tra i lavoratori orticoli che inalano la polvere di torba, che può essere ricca di spore di *Aspergillus*.

La maggior parte delle infezioni opportunistiche da funghi filamentosi, inoltre, è causata proprio da specie appartenenti al genere *Aspergillus*, che rappresentano, per diffusione, il secondo gruppo di funghi all'origine di micosi opportunistiche dopo la

Candida.

L'*Aspergillus* è causa di infezioni sia negli animali, sia nell'uomo. Negli uccelli, per esempio, può colpire l'apparato respiratorio, in bovini e pecore può indurre un aborto micotico, e può causare la morte di polli nutriti con granaglie contaminate.

Quasi tutti gli organi e gli apparati del corpo umano possono essere colpiti da quest'agente fungino. Tra le patologie dovute ad infezione da *Aspergillus* ci sono:

- onicomicosi (infezioni delle unghie);
- sinusite;
- aspergillosi cerebrale;
- meningite;
- endocardite;
- miocardite;
- aspergillosi polmonare;
- osteomielite;
- otomicosi (infezioni delle orecchie);
- endoftalmiti;
- aspergillosi cutanee;
- aspergillosi epatospleniche;
- fungemia da *Aspergillus*;
- aspergillosi disseminata.

Questo fungo può anche colonizzare le cavità che si creano nei polmoni a causa di differenti patologie, quali tubercolosi, sarcoidosi, bronchiectasie, pneumoconiosi, spondilite anchilosante o tumori, presentandosi come un'entità clinica distinta. Una simile forma di infezione, chiamata "aspergilloma", può interessare anche i reni.

Alcuni antigeni di questi funghi costituiscono dei potenziali allergeni e possono quindi dare origine a una forma allergica di aspergillosi broncopolmonare. Altre specie producono varie micotossine che, se ingerite per lunghi periodi di tempo, possono provocare lo sviluppo di tumori, soprattutto negli animali.

Si sono verificati casi d'aspergillosi contratti in ospedale mediante l'utilizzo di cateteri o altri strumenti medici; a questo riguardo, i pazienti neutropenici risultano

particolarmente esposti all'infezione. L'*Aspergillus* è inoltre un comune contaminante nei laboratori. L'identificazione delle specie patogene comuni d'*Aspergillus* non risulta solitamente problematica per i laboratori di microbiologia di maggiore esperienza, ma l'identificazione delle specie meno diffuse può risultare difficoltosa. Tuttavia, l'aumento di conoscenze sulle differenze di patogenicità e sensibilità ai farmaci antifungini tra le varie specie d'*Aspergillus* sta consentendo un'identificazione sempre più semplice e accurata dell'agente micotico.

I metaboliti precedentemente nominati, sono rappresentati dalle aflatossine, la cui tossicità delle scaturisce molto probabilmente dalla loro capacità di legarsi agli acidi nucleici e di interferire con la sintesi proteica. Possono dare origine ad un carcinoma epatocellulare; oltre che a livello epatico queste sostanze agiscono negativamente sul sistema immunitario e favoriscono la comparsa di tumori anche in sedi extraepatiche (cistifellea, colon, ghiandole salivari, polmoni, rene, retto, stomaco, tessuto sottocutaneo e osseo). Infine, va ricordato che le aflatossine possiedono un'elevata attività fetotossica e teratogena (sono lesive e mutageniche per il feto).

L'infezione dà origine a un'inflammatione purulenta e necrotizzante. Durante l'esame dei tessuti colpiti dalla micosi sono spesso osservate le ife di diametro costante.

3.4.1.1.4 Aflatossina M1

L'aflatossina M1 è il metabolita 4-idrossi derivato dell'aflatossina B1, dove c'è l'idrossilazione del legame furofurano. Se presente nei mangimi e foraggi contaminati, l'aflatossina B1 viene ingerita dagli animali dove, nel loro fegato, viene idrossilata ad aflatossina M1.

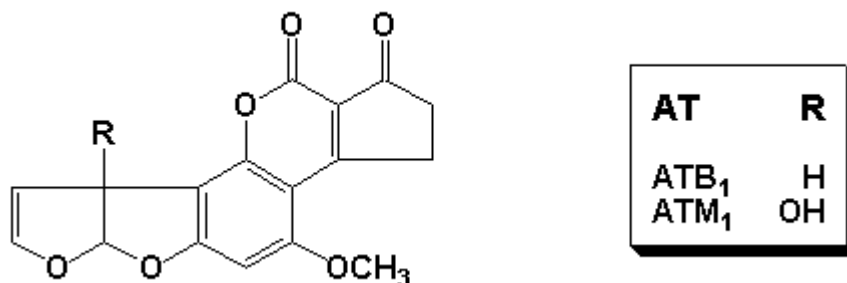


Fig 3.13 Differenze tra aflatossina M1 e B1

L'aflatossina M1 deve la sua sigla a "milk", latte, in quanto passa, in quantità

rilevanti, nel latte. L'aflatossina M1, legata alla frazione proteica del latte, viene secreta dalle ghiandole mammarie dei bovini; è destinata inevitabilmente ad essere ingerita dall'uomo, sia con il latte che con i prodotti da questo derivati, in quanto nessun trattamento è in grado di eliminarla (risulta essere una molecola termostabile).

Pertanto, l'aflatossina M1 non è prodotta direttamente da *Aspergillus*, bensì deriva dal metabolismo degli animali che si nutrono di alimenti contaminati dall'*Aspergillus*, quindi contenenti l'aflatossina B1.

Anche l'aflatossina M1 è riconosciuta tra i potenziali carcinogeni per l'uomo.

Compare nel latte dopo circa 4 ore dall'ingestione, da parte del bovino, di aflatossina B1 da alimenti contaminati. Questo meccanismo di eliminazione, chiamato carry-over, nei bovini da latte, corrisponde ad una quota del 1-3% di quella ingerita. Il valore di questa quota, può subire variazioni in base alla specie animale, alla razza, allo stato sanitario della mammella e al livello produttivo. Le infezioni mammarie, aumentano il carry-over in quanto la mastite fa sì che ci sia un aumento della permeabilità degli alveoli, che consentono quindi maggior passaggio di M1. Pietri *et al.*, (2004) ha dimostrato che a parità di quantità di tossina ingerita, il carry-over della B1 è superiore di 3,3-3,5 volte ad inizio lattazione rispetto ad fine lattazione.

Per quanto la struttura chimica sia simile, la M1 rispetto alla B1 possiede una cancerogenicità epatica del 2-8% (Pietri *et al.*, 2004).

Lo IARC ha classificato questa tossina come possibile fattore cancerogeno per l'uomo, classificandola come 2B. La comunità europea ha stabilito, come illustrato prima, che il limite è di 0.05 ppb, ed è inoltre proibito la diluizione con altro latte per far sì di rientrate nei limiti consentiti.

Scompare dal latte, in media, già entro 3-4 giorni dalla sospensione dell'assunzione di Aflatossina B1.

3.4.1.2 *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus è un fungo del genere *Aspergillus*, ed è una delle specie più comuni di questo genere nel causare malattie in individui immunodepressi.

L'*A. fumigatus* è un saprofita che è molto diffuso in natura, normalmente presenti nel suolo e nei processi relativi alla decomposizione di materia organica, come cumuli di compost, dove svolge un ruolo essenziale nel ciclo del carbonio e dell'azoto.

La colonia del fungo produce dai conidiofori migliaia di minuscoli conidi di colore grigio-verde (2-3 μm), che si disperdono facilmente nell'aria. Per molti anni si è pensato che questa specie, si riproducesse solo per via asessuale, in quanto né l'accoppiamento né meiosi era mai stato osservato. Tuttavia, nel 2008, 145 anni dopo la sua descrizione originale da Fresenius, è stato dimostrato che *A. fumigatus* possiede un ciclo sessuale riproduttivo pienamente funzionale (*Neosartorya fumigata*) (O'Gorman *et al.*, 2008).



Fig 3.14 Testa conidiofori di *A. fumigatus*



Fig 3.15 colonia di *A. fumigatus*

Il fungo cresce a 37 ° C/99 ° F (la normale temperatura del corpo umano), e può crescere a temperature fino a 50 ° C/122 ° F; i conidi possono sopravvivere fino a 70 ° C/158 ° F, che risultano essere le condizioni che incontra regolarmente per auto-riscaldamento nei cumuli di compost.

L'*A.fumigatus* può crescere su alcuni materiali da costruzione dov'è in grado di produrre micotossine genotossiche e citotossiche come le gliotossine (Nieminen *et al.*, 2002).

Il suo genoma è composto da 8 cromosomi, 29,38 mb, 9887 geni, 179 tRNAs e una percentuale di GC pari a 49,80.

Le sue spore sono onnipresenti nell'atmosfera e si stima che ogni individuo inala tutti i giorni diverse centinaia di spore. Solitamente queste sono rapidamente eliminate dal sistema immunitario nei soggetti sani. Negli individui immunodepressi, come quei soggetti che hanno subito un trapianto d'organo, persone che hanno contratto l'AIDS o la leucemia, è più probabile che il fungo diventi un patogeno. Provoca un generale indebolimento del sistema immunitario dell'ospite e causa una serie di patologie che caratterizzano l'aspergillosi.

Quando il brodo di fermentazione di *A. fumigatus* è stato analizzato, sono stati scoperti un certo numero di alcaloidi indolici con proprietà anti-mitotiche (Cui CB *et al.*, 1996). I composti di interesse fanno parte della tryprostatins, con B spirotryprostatin, che risulta essere di particolare interesse per la sua funzione di

droga anti-cancro.

Aspergillus fumigatus viene utilizzato per la sintesi della 4-idrossicumarina.

3.4.1.3 *Aspergillus niger*

Aspergillus niger è una delle specie più comuni del genere *Aspergillus*. Essa causa una malattia chiamata muffa nera su alcuni frutti e verdure come uva, cipolle e arachidi, ed è un comune contaminante del cibo. E' onnipresente nel suolo ed è comunemente riportato come contaminante di ambienti interni, dove le sue colonie nere possono essere confuse con quelle di *Stachybotrys* (specie per la quale sono stati anche chiamati "muffa nera") (Samson *et al.*, 2001).

Il suo genoma si compone, come per tutto il genere *Aspergillus*, di 8 cromosomi, ha 37,2 mb suddivise in 11200 geni, presenta 277 tRNAs e ha una percentuale di GC pari a 50,36.

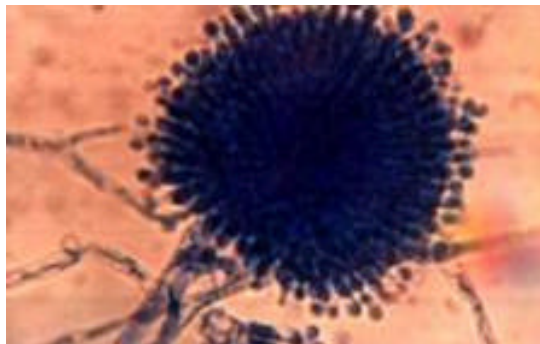


Fig 3.16 Testa conidiofora di *A. niger*



Fig 3.17 colonia di *A. niger*

Alcuni ceppi di *A. niger* sono stati segnalati per la produzione di una potente

micotossina chiamata ocratossina (Abarca *et al.*, 1994), ma altre fonti non sono d'accordo, sostenendo che questa relazione si basa sulla errata identificazione delle specie fungine. Prove recenti suggeriscono che alcuni ceppi producono l'ocratossina A (Samson *et al.*, 2001; Schuster *et al.*, 2002)

A. niger causa la muffa nera della cipolla. L'infezione delle piantine di cipolla da *A. niger* può diventare sistemica solo se si manifestano quando le condizioni sono favorevoli. Sempre verso la cipolla, causa una malattia in post-raccolta, in cui i conidi neri possono essere osservati tra le squame del bulbo. Il fungo causa anche delle malattie nelle arachidi e nelle uve.

A. niger ha meno probabilità di causare patologie nell'uomo, rispetto ad altre specie di *Aspergillus*, ma se grandi quantità di spore vengono inalate, si può verificare una grave malattia polmonare, l'aspergillosi. *A. niger* è una delle cause più comuni di otomicosi (infezioni fungine dell'orecchio), che può causare dolore, temporanea dell'udito perdita, e, nei casi più gravi, danni al canale uditivo e alla membrana timpanica. Questa specie, è usata come coltura per la produzione industriale di numerose sostanze, numerosi ceppi sono utilizzati per la preparazione industriale di acido citrico (E330) e acido gluconico (E574). Riguardo all'acido citrico, la produzione tramite questo fungo, riveste un'importanza mondiale, al punto che oltre il 99% della produzione mondiale (ovvero quasi 5 milioni di tonnellate all'anno) avviene grazie a questo microrganismo.

Molti enzimi utili sono prodotti con fermentazioni industriali da *A. niger*. Ad esempio, la glucoamilasi è utilizzata nella produzione di sciroppo di mais ad alto fruttosio, e le pectinasi sono utilizzate nel sidro e nella chiarificazione del vino. α -galattosidasi, un enzima che scompone alcuni zuccheri complessi, è un componente del Beano e di altri farmaci che sostengono i produttori possono ridurre la flatulenza. Un altro uso di *A. niger* nel settore delle biotecnologie è la produzione di isotopi magnetici contenenti le varianti delle macromolecole biologiche per l'analisi NMR.

Nel 2006 è stato riferito che un RNasi prodotta da *A. niger* chiamato actibind ha caratteristiche antiangiogenica e anticancerogene (Roiz *et al.*, 2006).

A. niger è anche una coltura per l'estrazione degli enzimi glucosio-ossidasi (GO) e α -galattosidasi (AGS). La glucosio-ossidasi è utilizzata nella progettazione dei biosensori del glucosio, a causa della sua alta affinità per il β -D-glucosio (Staiano *et al.*, 2005). L' α -galattosidasi può essere prodotta mediante fermentazione, dov'è

utilizzata per idrolizzare i legami α1-6 trovati in melibiosio, raffinoso e stachiosio. Una ricerca pubblicata nel 2006-2008 ha indagato sul profilo delle endoproteasi di *A. niger* (AN-PEP), una endoproteasi microbica derivata che fende le glutine. Ciò ha forti implicazioni per il trattamento della celiachia, malattia metabolica alla sensibilità al glutine (Mitea *et al.*, 2008). Un controllo con placebo, è stato avviato nel dicembre 2008 per determinare l'efficacia di questo enzima nel trattare gli esseri umani contro la celiachia (Mulder *et al.*, 2009).

3.4.1.4 *Aspergillus glaucus*

Aspergillus glaucus è un fungo cosmopolita ed osmofilo (cresce bene con il 20% di saccarosio), che viene isolato principalmente da polvere di casa, materiale vegetale e dal suolo.

Si comporta occasionalmente come agente eziologico, causando infezioni polmonari o infezioni diffuse fra i pazienti immunocompromessi. Tra queste infezioni, si possono avere otiti (Bambule *et al.*, 1982), infezioni orofacciali (Dreizen *et al.*, 1985), cerebrali, cardiovascolari e viscerali (Rippon, 1988).

Il tasso di crescita è da lenta a moderatamente rapida e la consistenza delle colonie varia da peronospora a polvere, il colore della colonia è grigiastro in superficie, dal turchese al verde intenso con riflessi gialli nella parte centrale a causa della produzione di cleistoteci.

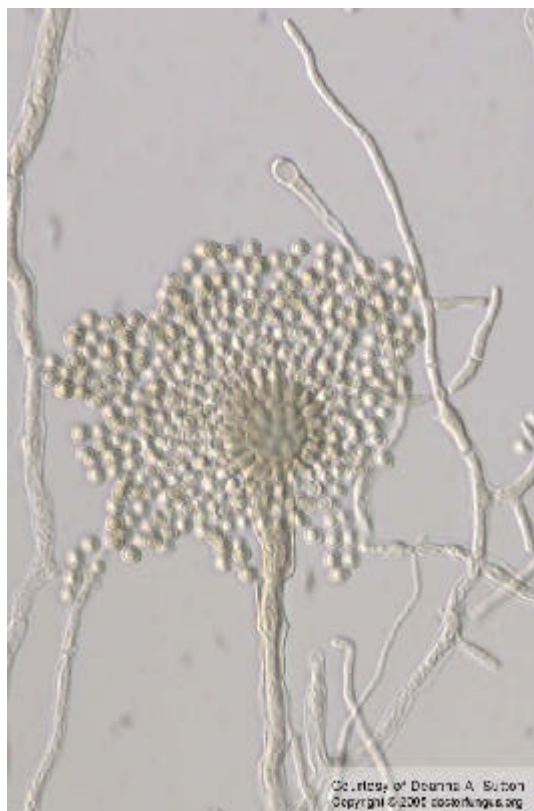


Fig 3.18 testa conidiofora di *A. glaucus*

3.4.1.5 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans, è chiamato anche *Emericella nidulans* quando ci si riferisce alla sua forma sessuale, è stato un importante organismo di ricerca per lo studio della biologia delle cellule eucariote (Osmani e Mirabito, 2004) per oltre 50 anni (Martinelli e Kinghorn, 1994). Viene utilizzato per studiare una vasta gamma di argomenti, tra cui la ricombinazione e riparazione del DNA, la mutazione, il controllo del ciclo cellulare, la tubulina, la cromatina, la nucleochinesi, la patogenesi, e il metabolismo del genere *Aspergillus* (Nierman *et al.*, 2005). È una delle poche specie nel suo genere in grado di formare spore sessuali attraverso la meiosi, che permettono l'attraversamento dei ceppi in laboratorio. *A. nidulans* è un fungo omotallico, cioè è in grado di auto-fecondarsi e forma corpi fruttiferi in assenza di un partner di accoppiamento.

Il suo genoma, composto di 8 cromosomi, si compone di 30,07 mb, 10560 geni, 188 tRNAs e una percentuale di GC pari a 50.32.

Recentemente, diverse carpasi simili a proteasi, sono state isolate da campioni di

A.nidulans in cui la morte cellulare programmata era stata indotta. I risultati come questi svolgono un ruolo chiave, nella determinazione della conservazione evolutiva del mitocondrio all'interno della cellula eucariotica, e il suo antico ruolo di proteobacterium capace di indurre la morte cellulare.

La colonia si presenta di colore verde scuro con un colorazione dall'arancione al giallo nelle zone di produzione dei cleistotecii. Nel retro si presenta di un color olivastro-violaceo. La produzione di essudato solitamente è presente e può essere di color bruno violaceo. Il tasso di crescita è da lento a moderato a confronto di altre specie *Aspergillus* clinicamente significative.

Questa specie è l'agente eziologico dell'aspergillosi cutanea (Lucas *et al.*, 1999), delle malattie del seno mascellare (Horre *et al.*, 2002), (Mitchell *et al.*, 1987), dell'osteomielite (Dotis *et al.*, 2003), di alcune malattie polmonari (Mizuki *et al.*, 1994; Rosen-Wolff *et al.*, 2004), micosi della tasca in un cavallo (Cabanès *et al.*, 2002; Guillot *et al.*, 1997), e di un ascesso cerebrale (Morris *et al.*, 1995). La resistenza all'itraconazolo, è conferita dalle copie extra del gene 14 P-450 alfa-demetilasi, *pmdA*, (Osherov *et al.*, 2001), nonché le relazioni di resistenza all'amfotericina B (ontoyiannis *et al.*, 2002).

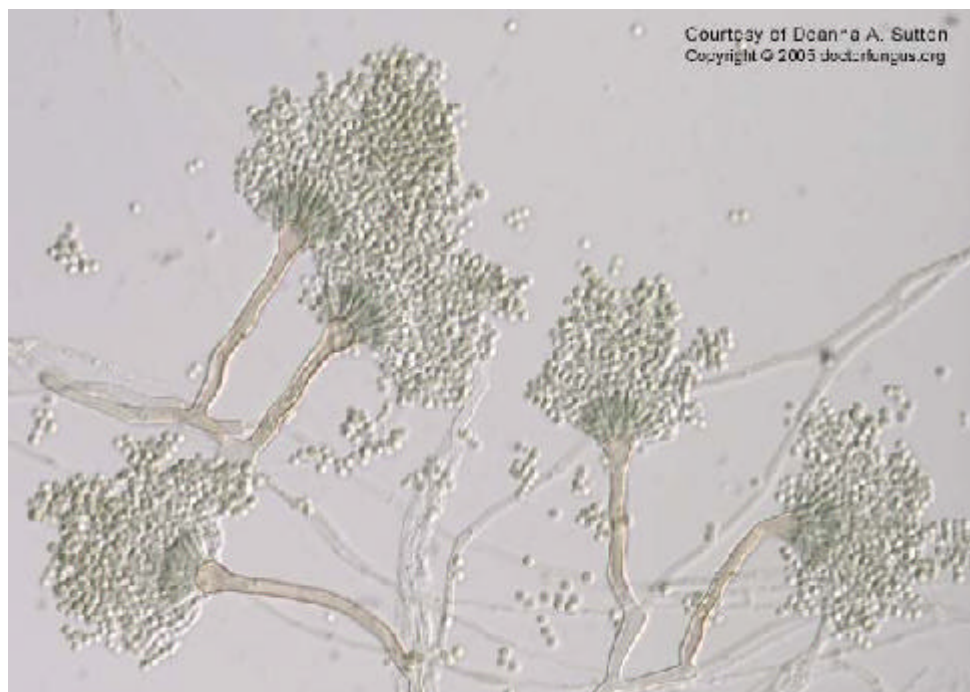


Fig 3.19 Testa conidiofora di *A. nidulans*

3.4.1.6 *Aspergillus oryzae*

L'*A. oryzae* è una specie non tossigena del genere *Aspergillus*, perché, come detto in precedenza, aflR è difettoso e la sua incapacità di produrre la proteina necessaria per attivare la trascrizione genica, non permette la biosintesi delle aflatoossine.

Il suo genoma, composto da 8 cromosomi, comprende 37,12 mb, per un totale di 12063 geni, 270 tRNAs e una percentuale di GC pari a 48.24.

Risulta essere una specie conosciuta dall'uomo, soprattutto in estremo oriente, per le sue attività fermentative a scopi alimentari. In Giappone soprattutto, viene impiegato per trasformare il riso in una soluzione zuccherina, dalla quale viene fatta fermentare e si ottiene il Sakè, nota bevanda alcolica. L'azione che svolge *A. oryzae* è la produzione di α -amilasi, che svolgono un'azione uguale alle amilasi coinvolte nella scissione del maltosio per la produzione della birra. La procedura che porta il riso in sakè parte dall'aggiunta di miceli e spore di *A. oryzae* al riso umido e bollito, una volta che questi trovano il substrato, iniziano la produzione di α -amilasi, che scindono l'amido in glucosio. Da questa scissione, si ottiene una soluzione dolciastra, che fa viene fatta bollire, filtrare e poi con l'aggiunta dei lieviti *Saccharomyces cerevisiae*, viene ottenuta la bevanda alcolica. Oltre all'ottenimento del Sakè, con l'ausilio di *A. oryzae*, si ottiene anche la salsa di soia, il miso e il tempeh. Il miso è un condimento derivato dai semi della soia gialla, di origine giapponese, cui spesso vengono aggiunti altri cereali come orzo (Mugi Miso) o riso (Kome Miso).

Il tempeh è un alimento fermentato ricavato dai fagioli di soia gialla, molto popolare in Indonesia e in altre nazioni del sud-est asiatico, è noto anche come carne di soia.

La produzione di enzimi da parte di *A. oryzae*, recentemente ha trovato applicazioni anche nel settore delle biotecnologie, dove si stanno conducendo esperimenti atti a convertire la biomassa vegetale in combustibili e altri prodotti industriali utili (Masayuki *et al.*, 2005).

Benché sia utilizzato per alcune fermentazioni a scopo alimentare umano, *A. oryzae* in certe condizioni produce delle tossine, ma in linea di massima viene riconosciuto come sicuro (GRAS) dall'elenco della FDA (Food and Drug Administration) (tailor., 1979).

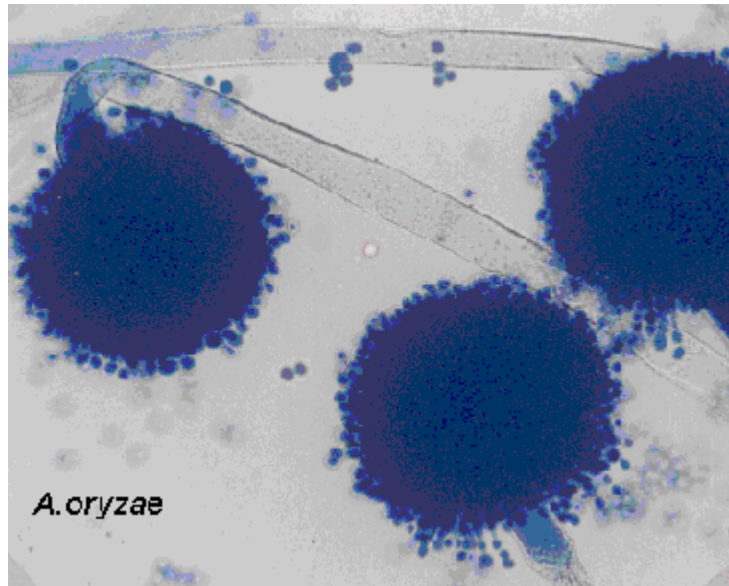


Fig 3.20 Testa conidiofora di *A. oryzae*

3.4.1.7 *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus è un fungo comune in tutti i terreni (De Hoog *et al.*, 1995), comunemente usato nell'industria per la produzione di acidi organici importanti, come l'acido itaconico e l'acido cis-aconitico. Ha rappresentato la fonte iniziale per il farmaco mevinnolin, un farmaco per combattere l'ipercolesterolemia, sintetizzato partendo dalla lovastatina.

L'*A. terreus* può dare luogo ad infezioni opportunistiche in persone con deficit del sistema immunitario, ed è resistente alla terapia a base di amfotericina B.

Le colonie si presentano di colore da beige a cannella, la parte posteriore, si presenta di colore giallo, e pigmenti dello stesso colore, solubili, sono spesso presenti. La crescita è da moderata a rapida e le colonie hanno l'aspetto di fine granulato per la produzione di conidi.

Il suo genoma, composto da cromosomi, comprende 29,33 mb divise in 10406 geni, con 150 tRNAs e con una percentuale di GC pari a 52.90.

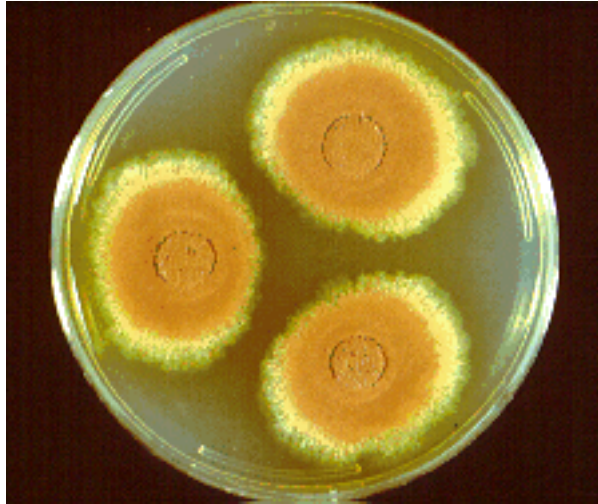


Fig 3.21 Colonie di *Aspergillus terreus*

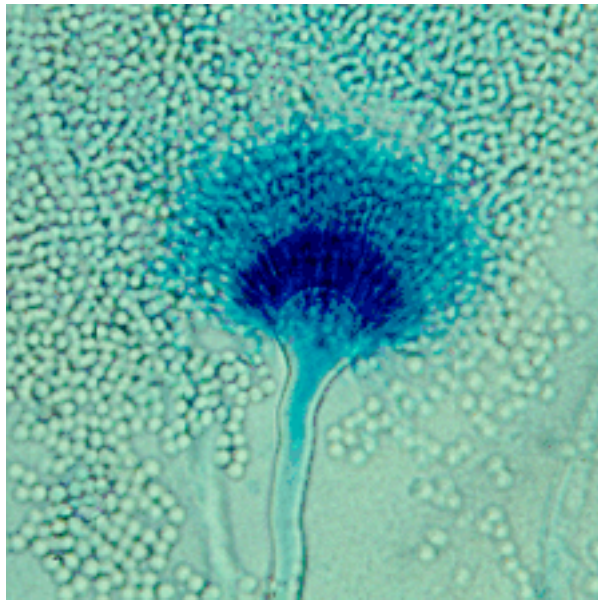


Fig 3.22 Testa conidiofora di *A. terreus*

3.4.1.8 *Aspergillus ustus*

Aspergillus ustus, è un fungo del genere *Aspergillus* tipico dei suoli tropicali o subtropicali, molto raramente si trova in altri suoli.

Questa specie è stata segnalata come un agente di endocardite fungina su una valvola protesica (Carrizosa *et al.*, 1974), la malattia cutanea primaria in pazienti immunodepressi (Gene *et al.*, 2001; Nakai *et al.*, 2002; Ricci *et al.*, 1998; Stiller *et al.*, 1994) e alcune diffuse malattie invasive (Azzola *et al.*, 2004; Iwen *et al.*, 1998; Verweij *et al.*, 1999; Weiss *et al.*, 1983).

La colonia si presenta di colore dal bianco al giallo, dal grigio al marrone, ma mai verde; grigio risulta essere il colore più comune. Nella parte posteriore, si presenta dal giallo al marrone, con un pigmento giallo diffuso. L'essudato, quando presente, è chiaro dal giallo al violaceo-bruno. La crescita è rapida e la tessitura è lanosa, simile all'ovatta dall'aspetto un po' granulare.



Fig 3.23 Testa conidiofora di *A. ustus*

3.4.1.9 *Aspergillus versicolor*

Aspergillus versicolor è un fungo cosmopolita che è particolarmente comune nelle zone fredde e temperate. Si trova spesso come contaminante in edifici con problemi di umidità e ventilazione; in primo luogo è isolato da materiale vegetale e di terreno. Raramente causa infezioni profonde nell'uomo, quando funge da agente eziologico, può dare luogo ad onicomicosi.

Il tasso di crescita è moderatamente rapido e la consistenza delle colonie è simile a pulviscolo, il colore colonia di superficie può variare dal bianco, giallo, beige, al giallo-verde smeraldo o verde. A volte produce un essudato di colore rosso chiaro, mentre la parte posteriore può essere incolore, oppure dal giallastro al rossiccio.

Le tossine prodotte possono provocare diarrea e disturbi allo stomaco, a hanno come

la cancerogenicità mirata a reni e fegato; può produrre una micotossina, la sterigmatocistina, e l'acido ciclopiazonico.

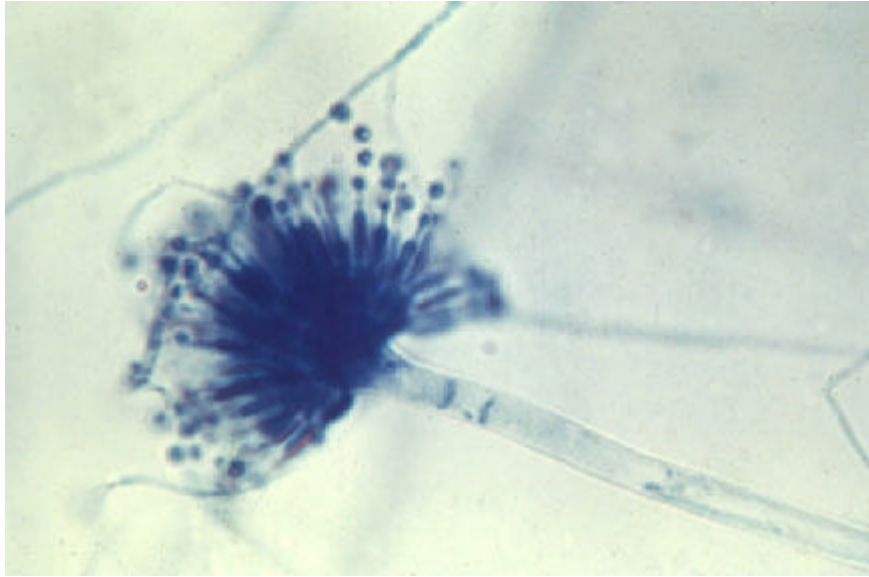


Fig 3.24 Testa conidiofora di *A. versicolor*

Capitolo 4

ALIMENTI CONTAMINATI DA AFLATOSSINE

Come anticipato in precedenza, le aflatossine si possono ritrovare in molti alimenti, prediligendone alcuni in particolare, come cereali (quali mais, riso, grano) e semi di piante proteaginose e/o oleifere (quali arachidi, noci, nocciole, pistacchio, mandorla, cotone, , ecc.). Proprio relativamente ai cereali, il genere *Aspergillus* ha la potenzialità per contaminare, in tutte le fasi della produzione, il prodotto, data la sua presenza pressoché globale. Il cereale più colpito in Italia risulta essere il mais, data la sua diffusione e il suo utilizzo nella filiera mangimistica. Quindi si farà cenno anche su altri cereali, quali grano e riso, che soffrono la contaminazione da *Aspergillus* solo in determinate fasi. Relativamente ai frutti a guscio, si fa maggiormente riferimento alle arachidi, che risultano essere per importanza economica e sociale, di peso più rilevante.

4.1 MAIS

Il mais, risulta per molteplici fattori, la coltura più studiata dal punto di vista del contenuto di aflatossine. Questo perché risulta essere al 3° posto nelle graduatorie cerealicole mondiali per la sua diffusione e produzione totale(dopo grano e riso), e primo per la produzione unitaria. Quindi, quando si è parlato di aflatossine in una così diffusa derrata alimentare, tutti gli organi interessati, dai consorzi sementieri ai consorzi animali, hanno iniziato a compiere studi approfonditi per capire e limitare questo fenomeno.

Come detto in precedenza, il maggior e più importante fungo produttore d'aflatossine è *A. flavus*, con la produzione d'AFL1, con uno sviluppo ideale tra i 32-38°C e con un'a_w maggiore di 0,78. Il mais risulta risentire maggiormente di questo patogeno nelle zone a clima caldo-umido (90-98% U.R.) e da annate con piovosità durante la stagione vegetativa notevolmente inferiore alla media. Si conserva e supera l'inverno nei residui colturali dell'annata precedente, su cui sviluppa in particolar modo il micelio e sclerosi formando l'inoculo primario per le piante giovani dell'annata successiva. Al sopraggiungere della bella stagione, il fungo produce una gran

quantità di conidi, che fungono da inoculo secondario, e, tramite il vento, la pioggia e gli insetti, sono liberati nell'ambiente circostante. Particolarmente sensibili sono le sete quando sono in via di senescenza (color giallo-bruno), su cui, condizioni ambientali permettendo, i conidi germinano in vicinanza dei granuli pollinici. Questa germinazione, porta alla produzione d'ife che diffondono rapidamente attraverso queste sete, e in 4-13 giorni arrivano ad infettare le cariossidi in via di formazione, le glume e raramente il tutolo.

Prima dell'inizio della maturazione fisiologica, le cariossidi generalmente non sono colonizzate internamente, ma dopo circa 2 settimane, quando si raccoglie il prodotto, si può riscontrare anche il 30% di cariossidi contaminate. Finché l'umidità resta superiore al 32%, l'attacco alle cariossidi risulta essere contenuto, probabilmente perché le cariossidi hanno ancora attività fisiologica, con conseguenti difese attive (Battilani, 2004). Una volta superata la soglia del 28% d'umidità però, l'attacco alle cariossidi diventa molto più marcato. Raggiunta questa condizione, il fungo produce enzimi extracellulari, che idrolizzano il pericarpo, superando così la barriera fisica ed intaccando le cellule vegetali (Kolattukudy, 1980, 1985).

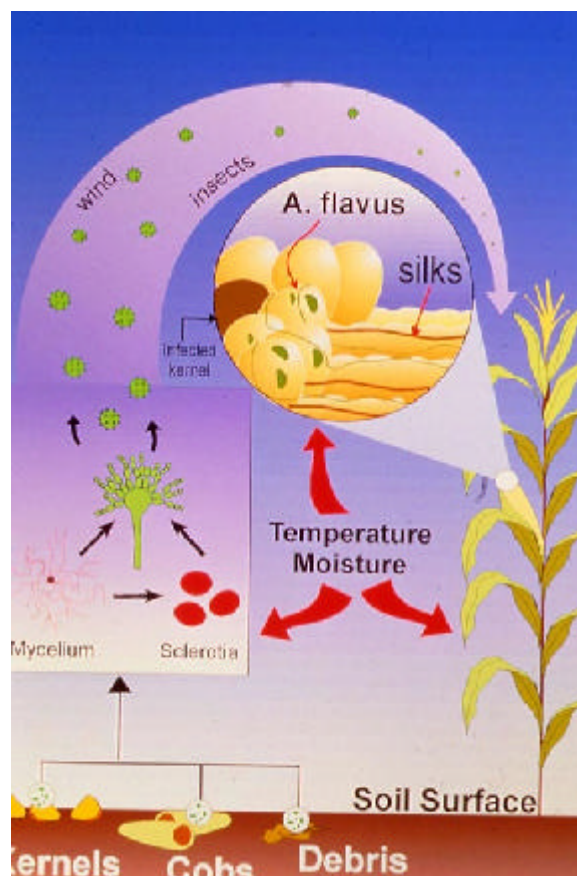


Fig 4.1 Il ciclo di vita d'*A. flavus* in un campo di mais

Le fasi più critiche per la pianta, dove le condizioni climatiche per lo sviluppo del fungo sono particolarmente favorevoli, sono l'epoca di fioritura e quella successiva del riempimento delle cariossidi. Lo stress idrico, unitamente a temperature superiori a 30°C, rende la pianta il bersaglio ideale per *A. flavus*, che tollera maggiormente la scarsità d'acqua e si sviluppa in modo ottimale proprio alle alte temperature. La combinazione di questi due fattori ambientali, permettono al fungo di prevalere su altri organismi presenti sul mais e nel terreno. Le alte temperature, non influiscono solamente sul metabolismo fungino, favorendone la proliferazione, ma possono causare micro fessurazioni alle cariossidi, permettendo così altre vie d'ingresso per il patogeno. Con questo si deduce che ogni tipo di lesione, sia essa causata da fattori abiotici come temperature elevate o grandine, o biotici come uccelli e insetti (in particolar modo da parte d'*Ostrinia nubilalis*), possono rappresentare un fattore di suscettibilità dal mais all'attacco d'*A. flavus*.

L'aspetto dell'infezione sulle spighe, si presenta con lo sviluppo di una muffa dall'aspetto granuloso, di colore verde scuro con sfumature gialle. Il micelio, cresce sulle cariossidi e negli spazi tra loro, fino ad arrivare al tutolo, che in seguito a questo assume una colorazione grigio-verdastra.



Fig 4.2 Marciume da *A. flavus* su spiga



Fig 4.3 Marciume da *A. flavus* su cariosside

Per gestire il problema delle aflatossine, sono state testate e attuate molte strategie, che coinvolgono il comparto della produzione maidicola lungo tutta la filiera produttiva. Il controllo biologico, sembra però dimostrare i migliori e più promettenti risultati per il futuro (Yin *et al.*, 2008). Molti organismi, negli anni, sono stati testati per ridurre e controllare l'incidenza delle aflatossine, agendo direttamente od indirettamente sul fungo. In laboratorio, si sono ottenuti risultati positivi da parte di *Bacillus subtilis*, *Lactobacilli* spp., *Pseudomonas* spp., *Ralstonia* spp. e *Burkholderia*, per loro capacità di inibire la crescita e produzione d'aflatossine. Ceppi di *B. subtilis* e *P. solanacearum*, isolati da suolo coltivato a mais, hanno dimostrato di poter inibire l'accumulo d'aflatossina (Nesci *et al.*, 2005). I risultati incoraggianti ottenuti in laboratorio, non hanno però avuto riscontro positivo una volta in campo, dove per la difficoltà di distribuire uniformemente la carica batterica, il trattamento non ha ottenuto risultati apprezzabili (Dorner, 2004).

Come per i batteri, anche certi lieviti, primi tra tutti *Candida krusei* e *Picchia anomala*, in laboratorio davano risultati positivi, inibendo la crescita d'*A. flavus*; in pieno campo però, l'efficacia si riduce di molto.

Finora, il miglior metodo per il controllo biologico si è rilevato essere l'inoculo di specie d'*A. flavus* e/o *A. parasiticus* non tossigene, che vanno a competere con le specie tossigene. Perché questa situazione avvenga, il ceppo non tossigeno deve essere dominante sul ceppo tossigeno nei momenti dove la pianta di mais è più a rischio di contaminazione.

Riguardo al mais, i ceppi che hanno mostrato maggior antagonismo rispetto ai ceppi

tossigeni, sono il ceppo AF36, CT3, K49 e BN30. Il precursore di tutti, il ceppo AF36, è stato testato nel 1980 (Cotty, 1990) per ridurre la contaminazione su semi di cotone; in seguito ha trovato impiego nel controllo di cotone in Arizona e pistacchio in California. I ceppi CT3 e K49, specifici per il mais, sono stati testati negli Stati Uniti (Abbas *et al.*, 2006), e hanno fornito buoni risultati. Successivi studi hanno dimostrato che l'inoculo combinato di ceppi tossigeni e non, aumenta l'efficacia del trattamento (Abba *et al.*, 2006) e che K49 risulta essere più competitivo, registrando una diminuzione d'aflatossine dal 74 al 95%. Il ceppo BN30, testato in Africa, ha dimostrato una spiccata capacità di ridurre la produzione d'aflatossine quando viene co-inoculato con ceppi particolarmente tossigeni (Cardwell e Henry, 2004).

Nei primi studi, i trattamenti con specie non tossigene d'*A. flavus*, venivano eseguiti spruzzando sulla pianta già nata o sul terreno nudo prima della semina, una sospensione liquida. Sono stati ottenuti risultati incoraggianti dal punto di vista del controllo delle aflatossine, solo il costo si è dimostrato troppo elevato.

Si è deciso dunque, di passare a substrati solidi, come mettere in una sospensione di conidi di *A. flavus* non tossigeno le cariossidi, essiccarle e conservarle a basse temperature fino alla messa in coltura (Dorner, 2004). Questo permette al fungo di riprendere la crescita, e grazie a vento e pioggia, di diffondersi e di competere con le specie tossigene già presenti. Dorner *et al.*, (1998), ha rilevato la corrispondenza positiva tra tasso di inoculo e quantità di aflatossine nella granella, riscontrando con trattamenti di 2,10 e 50 g/m una riduzione rispettivamente di 74,3%, del 95% e del 99,9%. Ha poi appurato che un maggior controllo si può ottenere eseguendo i trattamenti per più anni consecutivi.

La temperatura del suolo, in pieno campo, riveste un'importanza fondamentale per la buona riuscita del trattamento, dato che l'inoculo non si attiva sotto i 20°C (Pitt e Hocking, 2006). Si deduce quindi che il momento di semina non può essere uniforme in ogni coltivazione della terra, quindi ogni situazione dev'essere studiata in modo indipendente. Un altro fattore che può influire sulla efficacia del trattamento, risultano essere gli insetticidi; infatti Gaber e Cotty (2006) hanno riscontrato una significativa riduzione di spore da parte del ceppo AF36 dopo l'esposizione a 6 erbicidi (Buctril, Bueno, Caparol, Gramoxone, Prowl e Roundup). Da questo studio, si è dedotto che il trattamento fungino è consigliabile eseguirlo dopo l'applicazione degli erbicidi.

Il meccanismo che rende un ceppo non tossigeno, dopo vari studi, si è dimostrato essere la presenza di mutazioni puntiformi. Queste mutazioni, grazie alle sostituzioni di basi azotate, inducono la formazione di codono di stop prematuri nella sequenza codificante, bloccando la produzione e l'accumulo di aflatossine. Si sono affettati studi su alcuni ceppi non tossigeni di *A. flavus*, e si è visto che contenevano l'intero gruppo di geni responsabile della sintesi delle aflatossine (Cristo *et al.*, 2008). Il motivo che li rende non tossigeni, sembra sia dovuto a difetti molecolari su vari livelli, ma l'esatto meccanismo è ancora oggetto di studio.

Ricerche recenti d'ingegneria genetica, hanno portato all'utilizzo di piante resistenti alle contaminazioni da funghi micotossigeni, grazie al potenziamento di alcuni geni in grado di implementarne la resistenza. Gli inibitori delle proteasi (Vogel *et al.*, 1968) sono presenti in molte specie vegetali, soprattutto nei semi, risultano essere sostanze di naturale resistenza (Richardson, 1991). Una volta espressi nella pianta, questi inibitori hanno evidenziato un incremento della resistenza (Johnson *et al.*, 1989).

Un modo per controllare e combattere gli insetti dannosi (*Ostrinia nubilalis*), che con la loro azione possono indeboliscono la pianta e fungere da vettore per il patogeno, è l'odierno utilizzo di piante contenente un gene derivante da un batterio (*Bacillus thuringiensis* e/o *Bt*). Questo gene induce a produrre selettive proteine insetticide nei tessuti della pianta. *Bacillus thuringiensis* è un batterio che vive nel suolo, e che durante la fase stazionaria del suo ciclo vitale, forma una paratossina cristallina, da cui il nome *cry*, con attività tossica verso varie specie (Griffitts *et al.*, 2005).

Questo sistema introdotto dall'ingegneria genetica, ha dato buoni risultati nella lotta agli insetti più dannosi e alla contaminazione da *A. flavus* (Williams *et al.*, 2002; Pietri e Piva, 2000). Al contrario, Odvody (2001), ha riscontrato livelli di aflatossine maggiori negli ibridi *Bt* che non su quelli non transgenici; in aggiunta a questo, Dowd (2001) ha dimostrato che l'efficacia delle tecnologia *Bt* dipende da 3 importanti fattori:

- Tipo di insetto e linea parentale trasformata;
- Popolazioni di insetti e funghi patogeni predominanti ed interazioni tra essi e la pianta;
- Condizioni climatiche ed ambientali;

L'espressione della proteina CRY, limita solamente la presenza di *O. nubilalis* e, in parte, di *Helicoverpa zea*, ma non interferisce sugli altri insetti che possono favorire la penetrazioni dei patogeni fungini. Si può quindi affermare dopo questi dati che esiste scarsa correlazione tra le ferite inferte dagli attacchi di piramide e l'infezione dei patogeni fungini. Proprio le condizioni climatiche rivestono un ruolo primario, dato che si può verificare una forte contaminazione di *A. flavus* anche in assenza di piramide, se si verificano le condizioni ottimali per il fungo.

Si è riscontrato il fatto che la prevenzione risulta essere la priorità nel controllo delle aflatossine, e questa si attua controllando ogni passaggio della filiera produttiva, dalla scelta della semente fino alle ultime fasi dello stoccaggio. La fase in campo quindi, risulta la più delicata, ed è su questa che devono essere concentrati la maggior parte degli sforzi della ricerca. Le buone tecniche agronomiche, risultano essere la soluzione migliore per evitare il più possibile la diffusione di *A. flavus*, o cercando di limitarlo il più possibile nelle annate in cui il clima risulta essere particolarmente sfavorevole.

Verranno elencate di seguito le principali linee guida relative al mais:

- L'avvicendamento colturale, risulta essere una pratica molto utile, in quanto controlla la diffusione dei funghi che si conservano nei residui colturali. La monosuccessione è stata più volte confermata come favorevole a contaminazioni anno dopo anno sempre più importanti. Rotazioni colturali prevedono barbabietola, medica, soia o girasole, in programmazione pluriennale (Zucchi *et al.*, 2005).
- La gestione del terreno, intesa come gestione delle acque e tessitura del suolo può indirettamente combattere la diffusione del patogeno. Un buon sistema drenante, può evitare stress alla pianta durante le fasi di crescita più a rischio; un terreno leggero, con un'alta percentuale di sabbia, non trattenendo l'acqua, può favorire contaminazioni sia da aflatossine che da fumonisine. L'interramento degli stocchi, con conseguente decomposizione e devitalizzazione del micelio, effettuata entro 60 giorni dalla raccolta, si rende particolarmente utile per il controllo. Sarebbero da evitare minima lavorazione e semina diretta in combinazione con monocoltura di mais, in quanto aumenta il rischio potenziale di maggior incidenza delle micotossine

(Mosca, 2006).

- La concia del seme, non é in grado d'agire direttamente su *A. flavus*, in quanto il fungo raggiunge la spiga attraverso gli agenti atmosferici. La scelta degli ibridi invece, riveste un ruolo importante, in quanto una pianta maggiormente resistente agli stress idrici e agli attacchi fungini (brattee spesse che coprono interamente la spiga fino alla raccolta), risulta essere meno predisposta ad un attacco fungino. La scelta dell'ibrido, dev'essere valutata in base anche alla zona di coltivazione, al tipo di terreno, alle temperature e all'epoca di raccolta. Esperimenti recenti hanno messo in luce il fatto che gli ibridi resistenti (come CI2, LB31, MI82, Mo18W, Mp313E, Mp420, Mp715, Mp717, Oh516, Tex6, Tx601 e la popolazione GT-MAS:gk), oltre a possedere scarse caratteristiche agronomiche, non riescono ad abbassare il livello di contaminazione a livelli accettabili (Luo *et al.*, 2009).
- La semina anticipata, appena il terreno raggiunge di media i 10°C a 5 cm di profondità (Reyneri, 2005; Causin, 2006; Battilani *et al.*, 2008), è buona norma in quanto si anticipa la fioritura, evitando così la concomitanza con il periodo più caldo e con più stress idrico.
- La concimazione, soprattutto quella azotata, dev'essere nelle quantità prescritte, dato che sia un eccesso che una carenza rendono il mais suscettibile a stress. Piante troppo vigorose, portano ad un eccessivo lussureggiamento della coltura, impedendo il corretto passaggio dell'aria e mantenendo un'umidità troppo alta.
- Le infestanti, risultano essere molto competitive rispetto al mais, e possono portare a stress sia idrici che nutrizionali. Si consiglia quindi l'utilizzo di erbicidi in pre e post-emergenza abbinati alla sarchiatura in fase di levata.
- Gli insetti, come già detto in precedenza, possono risultare particolarmente dannosi sia per i danni che provocano, sia fungendo da vettori del fungo. L'aspetto rilevante, che dev'essere analizzato è la fase fenologia della pianta in cui l'insetto causa il danno alla spiga, in quanto se causa danni tra la l'allegagione e la maturazione cerosa, c'è la possibilità concreta di contaminazione di *A. flavus*. Se il danno viene fatto invece dopo che l'umidità delle spiga non rende possibile l'attività del fungo, il danno non

influenza il livello finale di aflatossine (Down *et al.*, 2009).

- L'irrigazione riveste un ruolo chiave nella prevenzione delle aflatossine, in quanto permette alla pianta di superare i periodi di crescita più critici in una situazione non di stress. Come per la fertilizzazione, anche un eccesso o la scarsità di irrigazione può portare la pianta ad essere suscettibile a contaminazione fungina. L'irrigazione ad aspersione, è consigliabile in quanto combatte la piramide, in quanto attua un processo di "dilavamento" sulle piante (Anconetti *et al.*, 2007).
- La raccolta, risulta essere la fase dove si hanno maggiori probabilità di controllare le micotossine. Raccogliere il prodotto, ad un'umidità compresa tra il 22 e il 27%, permette di non fratturare le cariossidi, evitando così la formazione di potenziali punti d'infezione. Si consiglia poi di raccogliere appena possibile, in quanto da metà settembre in poi corrisponde un attacco fungino potenzialmente più elevato (Amodeo, 2008). Un'accurata trebbiatura, seguita da ventilazione e pulitura della granella, permette di ridurre la quota di cariossidi ammuffite, spezzate o fessurate, aumentando così la resistenza allo sviluppo del fungo (Bottalico *et al.*, 2004).
- La prevenzione in post-raccolta, si ottiene tramite l'iterazione tra produttore, trebbiatore e il centro di stoccaggio/essiccazione, in quanto è consigliabile completare l'essiccazione delle cariossidi entro 36/48 ore dal ricevimento della granella (Blandino *et al.*, 2008). L'umidità di stoccaggio ottimale si aggira sul 14%, ad una temperatura sotto i 12°C; durante lo stoccaggio, la movimentazione della granella, deve avvenire cercando di non causare rotture e fessurazioni della granella. Lo stoccaggio in silos risulta essere il più adatto, essendo più facile gestire il prodotto e la ventilazione; non va dimenticata la lotta ai roditori, uccelli e tutte quegli organismi che possono intaccare il prodotto (Bottalico *et al.*, 2004).

4.2 ALTRI CEREALI

Oltre alla presenza nel mais delle aflatossine, anche altri cereali sono particolarmente suscettibili alla contaminazione da *A. flavus*, principalmente riso e grano. Questi due importanti cereali, in particolar modo il riso, risentono del problema delle aflatossine

nei paesi a clima tropicale o sud-tropicale, quali in primo luogo Africa e India. Nel nostro paese, la coltivazione del riso avviene nel nord Italia, dove condizioni favorevoli alla contaminazione da *Aspergillus* avvengono solo in annate straordinarie. Il grano, pianta autunno-vernina, soffre la contaminazione in campo da parte del genere *Fusarium*, mentre durante la fase di stoccaggio può avvenire la contaminazione da parte del genere *Aspergillus*.

Il riso, è stato dimostrato che rappresenta un ottimo substrato per la contaminazione da parte di agenti fungini micotossigeni, e viene spesso impiegato per testare il potenziale tossico fungino (Bars and Bars, 1992).

L'incidenza di forti piogge durante la stagione di raccolta in India favorisce la contaminazione da aflatoxina (Tulpule *et al.*, 1982). Si è registrata un'infezione fungina più frequente nel riso essiccato e macinato "parboiled" durante le fasi di essiccazione e fessatura, con una produzione maggiore di aflatoxine (Kumar *et al.*, 2008). La contaminazione da parte di ceppi di *Aspergillus*, è frequente nella fase di stoccaggio, dove trae ulteriore vantaggio da infestazioni da punteruolo rosso (*Sitophilus oryzae*) (Prasad *et al.*, 1987; Choudhury *et al.*, 1999). Il problema delle aflatoxine durante lo stoccaggio, risiede nel fatto che non vengono attuati i dovuti accorgimenti, soprattutto il tener controllata l'umidità dell'aria, fattore primario della diffusione di *Aspergillus*. La crescita all'interno e all'esterno della semente, si è sviluppata durante la lavorazione dopo un periodo di stoccaggio (Reddy *et al.*, 2006). Gli operatori che lavoravano il riso, hanno riscontrato da questo, problemi respiratori con sintomi imputabili ad *Aspergillus*. Si conviene quindi che dev'essere perseguita una campagna di aggiornamento delle strutture nelle zone interessate, così da evitare la contaminazione delle derrate destinate al commercio e problemi di salute agli operatori interessati nei processi di lavorazione del riso.

Per quanto riguarda il grano, in vari studi, si fa riferimento al fatto che è suscettibile in ogni parte del mondo, ove si verificano quelle situazioni di stress della pianta, errate tecniche agronomiche e/o uno stoccaggio non idoneo. Fattori comuni in tutte le zone a rischio è l'alta umidità, alte temperature (Widstrom *et al.*, 1990; Russell *et al.*, 1991; D'Mello e MacDonald, 1997; Hussein e Brasel, 2001), la presenza di piogge nelle fasi appena precedenti la raccolta e l'attacco di insetti (Moreno e Kang, 1999; Schatzki e Ong, 2001; Battilani, 2004). Per combattere la contaminazione, si fa sempre riferimento alle buone pratiche agronomiche, ponendo particolare attenzione nello stoccaggio delle granaglie, che rappresenta una fase particolarmente delicata

del processo produttivo.

4.3 ARACHIDE

Arachis hypogaea, rappresenta una delle specie più importanti che viene colpita da *Aspergillus flavus*, con conseguente possibile produzione di aflatossine, e manifesta le patologie chiamate “aflaroot” e “muffa gialla”. Il problema è sentito maggiormente nelle zone calde del pianeta, nelle zone vicine all’equatore, soprattutto in Africa, dove le arachidi costituiscono un alimento base della dieta. Anche se il problema delle aflatossine non interessa direttamente il nostro paese, il commercio globale, e la vendita di arachidi da parte di quei paesi esteri, a prezzi concorrenziali, ha portato il problema delle aflatossine anche nel nostro paese e nell’Unione europea. Le varie leggi che sono state attuate, con ovvie ripercussioni sulle esportazioni, hanno portato una riduzione delle partite con quantità di aflatossine oltre il limite; e di conseguenza la ricerca nei paesi produttori, soprattutto gli Stati Uniti, ha avuto una notevole spinta per cercare una soluzione. Si è studiato il fenomeno, ed è emerso che la produzione di aflatossine da parte del fungo, può avvenire in campo, durante la raccolta, l’essiccazione e lo stoccaggio; se ne ricava quindi che la miglior forma di controllo risulta essere alla base del processo produttivo, la coltivazione in campo (Hill *et al.*, 1985; Horn *et al.*, 1995).

I primi sintomi appaiono come macchie sui cotiledoni delle piantine, che si presentano con margini bruno-rossastri. Piantine e semi non germinati, avvizziscono, fino a diventare una massa di color marrone-nero, ricoperta di spore color giallo o verde. Le piante che sopravvivono alla germinazione ed emergenza, presentano foglie di ridotte dimensioni ed appaiono clorotiche a causa della presenza di aflatossine in tutta la pianta. Le radici sono rachitiche e si manifesta la mancanza di un sistema secondario di radici, una condizione nota come aflaroot (Pettit, 1984). Le foglie risultano di piccole dimensioni, appuntite con una trama spessa e coriacea. I semenzali infetti possono sopravvivere all’infezione se si trovano nelle condizioni ottimali di crescita. La muffa gialla, può manifestarsi nei baccelli e nei semi durante la crescita della pianta, se si verifica una persistente e continua condizione di asciutto e siccità. Successivamente alla raccolta, le infezioni si possono ulteriormente sviluppare, con la crescita del fungo che copre la superficie dei semi. Una volta

colonizzata la superficie, il fungo inizia a diffondersi all'interno dei semi, da cui dipenderà in futuro il difetto di colorazione che passa da giallo a marrone, e si verifica la perdita di peso.



Fig 4.4 Pianta di arachide alla raccolta contaminata da *A. flavus*

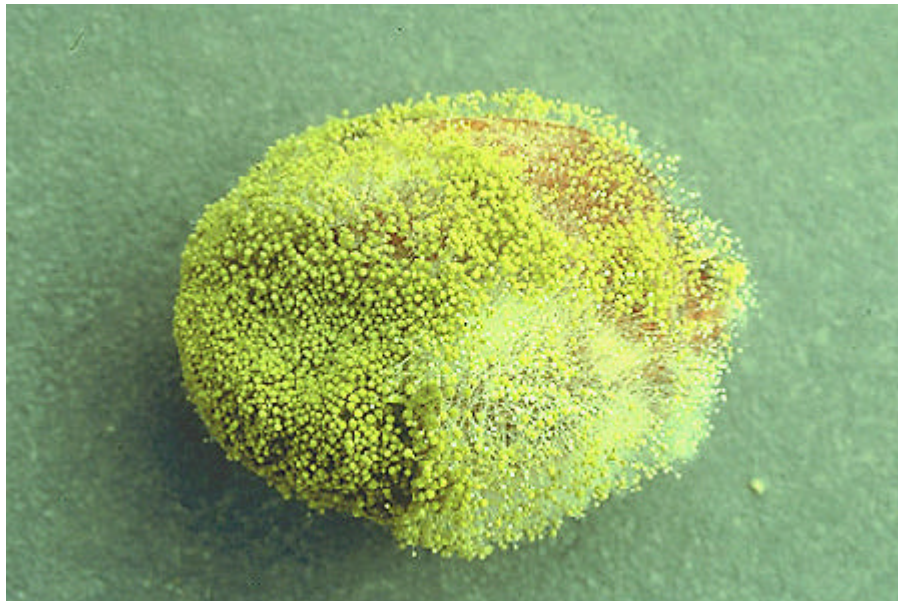


Fig 4.5 Seme di arachide infetto da *Aspergillus flavus*

Il motivo principale per cui *A. flavus* colonizza ed infetta le piante di *A. hypogaea* è la sua presenza a diretto contatto con la pianta e, di particolar interesse, con i baccelli.

Il suolo costituisce un serbatoio di inoculo primario di *A. flavus* e *A. parasiticus* (Horn *et al.*, 1995, Horn e Dorner 1998), e baccelli di arachide sono in contatto diretto con le popolazioni del suolo di funghi aflatossigeni.

L'infezione di semi di arachide avviene prevalentemente da inoculo primario, e differisce dalle infezioni di mais e semi di cotone in cui inoculo secondario gioca un ruolo dominante (Horn 2003).

Due modalità d'infezione sono possibili nelle arachidi:

- La prima modalità, i semi da baccelli senza danni visibili, possono essere contaminati da funghi aflatossigeni quando le piante sono sotto forte stress idrico (Sanders *et al.* 1981), anche se non presentano danni rilevati ai baccelli, lesioni microscopiche potrebbero spiegare una parte di questa infezione (Porter *et al.*, 1986).
- La seconda modalità, i semi possono essere contaminati attraverso le lesioni ai baccelli, agevolando così la colonizzazione da parte del fungo. I livelli più elevati di contaminazione da *A. flavus* e *A. parasiticus* e quindi di contaminazione da aflatossine sono associate a danni delle sementi (Blankenship *et al.*, 1984; Dowell *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1983; Sanders *et al.*, 1985).

Le larve di *Elasmopalpus lignosellus*, con la loro ciclo vitale, scarificano e penetrano nei baccelli di arachidi, e in gran parte sono responsabili dei danni negli Stati Uniti (Lynch 1984, Lynch e Mack 1995, Lynch e Wilson 1991).

Nelle regioni tropicali, dove si coltivano le arachidi, le larve bianche (larve di scarabeo), termiti e millepiedi si alimentano di importanti quantità di arachidi (Lynch e Mack, 1995). La formazione di crepe durante il periodo di crescita, possono esporre i semi all'inoculo del suolo, ne risulta quindi un aumento di invasione fungina e aflatossine (Schroeder e Ashworth 1965). Si è osservato, che le arachidi, risultano essere più sensibili alla contaminazione da *Aspergillus* alla fine della stagione quando le condizioni climatiche comprendono siccità ed elevata temperatura

del suolo (Blankenship *et al.*, 1984; Hill *et al.*, 1983; Sanders *et al.*, 1981; Sanders *et al.*, 1985b). Alcuni studi, hanno dimostrato che la presenza di baccello esente da ferite e la presenza del tegumento protettivo del seme, limita la possibilità di contaminazione da parte del patogeno. Oltre a queste barriere fisiche, la presenza di tannini, cere e composti amminici aiutano a rendere le cariossidi meno vulnerabili ad attacchi di *A. flavus* e *A. parasiticus* (Amaya-F *et al.*, 1977; LaPrade *et al.*, 1973; Sanders e Mixon 1978; Zambettakis e Bockelee-Morvan 1976). La presenza, pressoché globale, nel suolo di *A. flavus*, può portare alla potenziale infezione di tutte le colture di *A. hypogaea* che si trovano in climi adatti alla crescita del fungo. Gli studi, vengono infatti condotti negli Stati Uniti d'America, Africa, India e Cina. La sintesi delle aflatossine, avviene, come descritto nel capitolo dedicato, quando si presenta un'umidità dell'aria molto alta (90-98%), una bassa umidità del suolo e una temperatura tra i 25 e i 35°C.

Nel Settentrione d'Italia queste particolari condizioni termo-igrometriche si verificano solo in annate eccezionali e pertanto non sono attese regolarmente forti infezioni da questi miceti e nemmeno le conseguenti contaminazioni da aflatossine. Ciò potrebbe rappresentare un elemento di indubbio vantaggio per la produzione che venisse realizzata in Veneto (Causin e Mosca, 2007).

La riduzione, e la possibile totale assenza di aflatossine nei semi di arachide, è da ricercare nel costante controllo lungo tutto il processo produttivo, dalla scelta delle sementi allo stoccaggio.

Il monitoraggio degli insetti parassiti dei baccelli (soprattutto nottue ed insetti terricoli), può ridurre il tasso di infezione del fungo a causa della mancanza di un punto di ingresso per l'infezione. Un altro modo per evitare di creare punti d'ingresso per il micete, è quello di prestare particolare attenzione durante il trasporto e la semina, cosicché da evitare rotture e lesioni che in futuro potrebbero scatenare possibili infezioni. La conservazione dei baccelli e dei semi prima della semina, in ambienti con umidità controllata, può sicuramente contribuire all'assenza del fungo. La qualità della semente, intesa come certificazione dei semi, e l'impiego della concia con principi attivi fungicidi, dev'essere considerato il parametro fondamentale in pre-semina.

Durante la semina, si deve cercare di attuare lavorazioni e tutte le misure possibili per prevenire lesioni ai baccelli, seguendo queste linee guida:

- Seminare presto per ottimizzare l'umidità del terreno e per evitare stress idrico e l'attività degli insetti.
- Varietà vegetali tolleranti a marciumi del baccello, nematodi, insetti e funghi.
- Attuare regolarmente la pratica della rotazione delle colture, e la fertilizzazione per ridurre al minimo l'incidenza di agenti patogeni del suolo.
- Porre particolare attenzione all'irrigazione durante la siccità, al fine di evitare lo stress delle piante.
- Raccogliere il prodotto quando la maggioranza dei baccelli è matura e con umidità media non superiore al 24% (Mosca, 2001).
- Il trasporto dei baccelli deve avvenire in camion ventilati, così da prevenire l'accumulo di umidità.
- Durante lo stoccaggio, se il tenore di umidità all'interno dei semi supera il 9%, si devono adottare operazioni per la circolazione forzata di aria calda.
- Nel deposito, la derrata dev'essere mantenuta ad un'umidità relativa costante inferiore al 70% in modo che l'umidità del seme sia del 7-9%.
- Attuare accorgimenti manuali o elettronici per ispezionare le arachidi destinate alla vendita.
- Distruggere la farina di arachidi contenenti alti livelli di aflatossina, invece di usarla per la produzione di farine animali.

Se ne deduce che, per limitare al minimo la presenza di aflatossine nelle arachidi, dev'essere posta attenzione in ogni passaggio della sua produzione. Dalla scelta delle sementi fino alla vendita, l'alimento dev'essere il più possibile sottratto a fattori di stress, quali soprattutto l'umidità elevata, fattore chiave per lo sviluppo del patogeno. Negli ultimi anni, la ricerca si è orientata verso il miglioramento varietale, che ha portato alla creazione degli ibridi resistenti, quali Zhonghua 6 (Liao, 2003) e Yueyou 9 (Li, 2006), alla contaminazione da *Aspergillus flavus* in ambienti a rischio. Per quanto riguarda le arachidi a produzione di olio, non si sono riuscite ad ottenere linee varietali ad alto contenuto oleifero resistenti alla contaminazione del fungo. Da questo dato è stata ipotizzata una correlazione negativa tra contenuto d'olio e la resistenza alla contaminazione (Liao, 2009).

Un altro metodo di controllo biologico che si è rivelato efficace, è l'inoculo nel terreno di ceppi non tossigeni di *A. flavus* e *A. parasiticus* (Corner *et al.*, 1998).

Nelle prove iniziali, l'efficacia di questa tecnica, è stata dimostrata con un ceppo non-aflatossigeno di *A. parasiticus* (NRRL 13539), che è stato inoculato nel suolo come una sospensione colture liquide omogeneizzate (Dorner *et al.*, 1992). Tuttavia, si è dimostrato che un inoculo di *A. flavus* (NRRL 21882) soltanto o in combinazione con *A. parasiticus*, sia più efficace dal punto di vista del biocontrollo (Horn *et al.*, 1994).

Questo perché, anche in presenza di forte presenza nel suolo di *A. parasiticus*, le arachidi erano principalmente infettate da *A. flavus*. Negli studi successivi sul biocontrollo tramite ceppi non tossigeni, si è sempre utilizzata una sospensione di entrambe le specie fungine (Dorner *et al.*, 1998, 2004).

Dorner (2007) ha dimostrato che l'inoculo combinato tra *A. flavus* ed *A. parasiticus* non portava a sostanziali differenze rispetto all'inoculo di solo *A. flavus* (NRRL 21882), quindi il trattamento può avvenire con solo *A. flavus*. Attraverso il biocontrollo tramite questo tipo di inoculo, si è registrato, già al secondo anno di trattamento, un abbassamento del 91,6 % della quota di *A. flavus* tossigeno. Da questi studi si può dedurre che *A. flavus* NRRL 21882 può essere utilizzato per ridurre la contaminazione da aflatossine nelle arachidi, ma a quanto pare deve prima dominare il ceppo tossigeno presente nel suolo per ottenere l'effetto di tale riduzione. Il ceppo fungino ideale per il biocontrollo sarebbe quello che possiede le stesse caratteristiche di colonizzazione aggressiva che i ceppi tossigeni sembrano possedere naturalmente. Capire il fattore responsabile di questa differenza osservata nella capacità di colonizzazione definitiva, potrebbe portare allo sviluppo di un bio-pesticida molto più efficace per il controllo della contaminazione da aflatossina.

4.4 COTONE

Il cotone, risulta essere una delle colture che possono venire contaminate da *Aspergillus*, con conseguente produzione di aflatossine. Varie prove, sia in laboratorio che in campo, sono state condotte negli Stati Uniti, e forniscono tutt'ora il materiale base per la ricerca. Cotty (2001), ha individuato due fasi nella quale si può dividere la contaminazione fungina, la prima durante la fase di sviluppo maturazione della pianta, la seconda invece successiva alla completa maturazione. Molte colture

durante la crescita, risultano spesso molto resistenti alle infezioni da *Aspergillus flavus*, premettendo che le condizioni ambientali non favoriscano sia la crescita fungina inducendo stress alla pianta. Queste condizioni possono essere lesioni ad opera di uccelli, mammiferi, insetti, grandine, stress da caldo ed idrici (Cotty e Lee, 1990; Dowd, 1998; Guo *et al.*, 2003; Odvody *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 1986). Tali condizioni possono anche favorire la colonizzazione da agenti funghi parti di pianta che vanno incontro naturalmente a senescenza, come le setole, i fiori, o piccioli, con la successiva infezione dei semi. Per le colture con i problemi di contaminazione più gravi, il periodo e la modalità di semina, risultano essere determinanti in genere al fine di evitare condizioni favorevoli ad *A. flavus* durante le due fasi di contaminazione. Tuttavia, non potendo prevedere l'andamento climatico negli anni, anche se ben pianificata e condotta, la coltura può esporsi a condizioni favorevoli per la contaminazione.

Nel cotone, si è visto che *A. flavus* contamina, tramite le spore, il fiore, insediandosi nella capsula solo quando le suture non iniziano ad aprirsi (Ashworth *et al.*, 1969). Ulteriori ricerche, hanno dimostrato che la contaminazione da spore di *A. flavus* tramite le aperture naturali della pianta di cotone prima, durante e dopo 30 giorni dalla fioritura, comporta un significativo incremento del numero di semi infetti alla maturazione delle capsule (Klich *et al.*, 1984, 1985). Ashworth e Hine (1971), hanno dimostrato che la capsula è un sistema chiuso e che l'unica via di contaminazione del fungo sia tramite le ferite o il sistema vascolare. Altri studi hanno individuato una correlazione positiva tra l'infezione della capsula e quella del peduncolo (Bagga, 1970; Cauquil e Ranney, 1967; Roncadori, 1969). Si è dimostrata una forte correlazione tra la presenza di *A. flavus* nei peduncoli e nelle parti di sostegno della capsula e l'infezione delle sementi. Ciò suggerisce che la via di infezione, quando le capsule sono intatte, sia il sistema circolatorio (Klich, 1986).

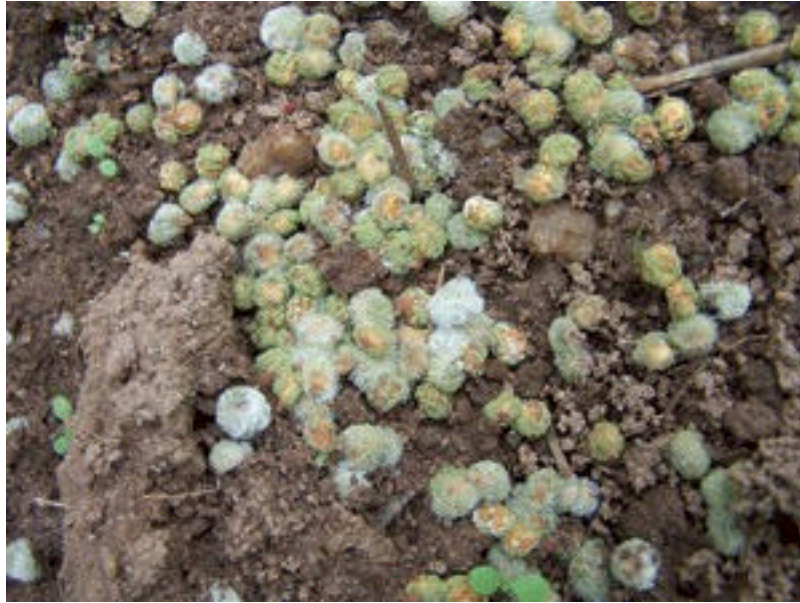


Fig 4.6 Capsule di cotone contaminate da *A. flavus*

4.5 NOCI ED ALTRI FRUTTI A GUSCIO

Frutti a guscio, come i pistacchi (*Pistacia vera*), mandorle (*Prunus dulcis*), e noci (*Juglans regia*), rivestono in certe economie, un peso molto rilevante; è il caso degli Stati Uniti, dove lo stato della California produce il 100% del prodotto interno di queste derrate.

In certe condizioni, questi fruttuosi possono essere infettati da vari ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, con conseguente biosintesi e accumulo di micotossine dannose per la qualità e sicurezza alimentare. La cancerogenicità negli animali dei metaboliti secondari, le aflatossine, ha portato a livelli di tolleranza sia per il consumo interno sia per l'esportazione. Negli Stati Uniti è stato fissato un limite massimo di 20 ng/g (20 ppb) alla frutta con guscio (guscio incluso) destinata al consumo umano. Questo limite è stato fissato dalla Food and Drug Administration (1996), considerando che le norme imposte dai paesi d'importazione possono essere anche più restrittive.

Alti livelli d'aflatossine nei pistacchi sono stati correlati ad un aumento del tasso d'infezioni da *Aspergillus* in relazione ai danni di insetto (Sommer *et al.*, 1976, 1986). Tuttavia, anche quando tali danni non si verificano, lo sviluppo fenologico della pianta, può offrire altre opportunità per un'infezione fungina. Nei pistacchi, il seme è situato all'interno dell'endocarpo, che si sviluppa all'interno di un guscio costituito da strati esterni e interni (epicarpo e mesocarpo). Nel corso del normale sviluppo,

l'endocarpo si stacca dal guscio e si apre circa un mese prima del raccolto, mentre il guscio resta chiuso, fornendo una barriera alla contaminazione (Crane e Iwakiri, 1982). In determinate condizioni ambientali o agronomiche, l'apertura precoce dei gusci, può favorire l'entrata delle spore fungine, attraverso le particelle di polvere ed insetti (Doster e Michailides, 1994). Danni fisici si possono verificare anche quando le piante sono scosse durante la raccolta o il trasporto allo stabilimento di trasformazione, dove vengono pulite ed essiccate. I danni meccanici, sono sicuramente fonte di ingresso per il fungo, ma sono stati registrati casi di aflatossine nel seme anche in pistacchi dove il guscio era chiuso, quindi è stato dimostrato che esiste un'altra via d'ingresso (Schatzki e Pan, 1996).

Tuttavia, Michailides (1989) ha dimostrato che la base (la fine dello stelo) del frutto rimane relativamente morbida, più avanti nella stagione rispetto al resto del guscio ed è vulnerabile all'attacco da parte degli insetti, che si alimentano preferenzialmente in questo sito. Da questo ha dedotto che l'attacco fungino avvenga molto probabilmente alla fine del gambo.

La deiscenza naturale è una caratteristica desiderabile nei pistacchi poiché la maggior parte del raccolto è commercializzata in guscio e la separazione del guscio consente di essere facilmente rimosso dal consumatore. I pistacchi non ancora con il guscio aperto, al momento della selezione della vendita, devono essere rimossi (Crane e Iwakiri, 1982), e successivamente subire un trattamento per aprirli. Questi pistacchi, vengono immersi in acqua e lasciati in ammollo per ammorbidire il guscio, per poi aprirli manualmente (Schatzki e Pan, 1996). Durante questo processo di reidratazione, c'è la reale possibilità che avvenga la contaminazione fungina. Per porre rimedio a questo, l'operazione di reidratazione dev'essere seguita subito da un'azione di essiccazione, in modo da riportare l'umidità del pistacchio sotto la soglia di attività del fungo (Mahoney e Molyneux, 1998).

Relativamente alle noci, l'infestazione avviene per lesioni procurate da insetti, o da lesioni meccaniche durante la raccolta e lo stoccaggio. Recenti studi, hanno portato alla scoperta di una varietà di noce, Tulare, che è particolarmente resistente all'azione di *A. flavus*, in quanto produce un acido, l'acido gallico a partire dai tannini. Ironicamente, è proprio l'*A. flavus* a produrre l'acido gallico, che viene immagazzinato nei tannini. Una proteina o un'enzima, prodotto da *A. flavus*, dannosi, scinde i tannini. Liberando acido gallico. Nelle noci Tulare, i tannini contenenti acido gallico, sono in numero sufficiente da inibire la sintesi delle aflatossine (Molyneux et

al., 2005).

Il commercio di semi a guscio, come anticipato prima, per alcuni stati rappresenta una delle principali risorse economiche, primi tra tutti ci sono gli Stati Uniti e l'Iran con i pistacchi e la Turchia con le nocciole.

Gli Stati Uniti, coscienti delle conseguenze delle aflatossine, hanno legiferato in merito, portando la soglia massima a 20 ppb. La situazione in Iran è ben diversa, già nel 1997, l'Unione Europea aveva bloccato tutte le importazioni da quel paese perché tutte le partite analizzate registravano una presenza di aflatossine di 200 volte superiori ai limiti consentiti. Si è appurato che la causa di questa forte contaminazione, era dovuta all'inadeguato trattamento del prodotto, che, oltre alle condizioni climatiche che favorivano *A. flavus* (Mojtahedi *et al.*, 1978), non veniva lavorato nei modi opportuni. L'inadeguatezza delle strutture di stoccaggio, unito al fatto della scarsa preparazione agronomica dei tecnici, ha portato alla presenza nel mercato mondiale di grosse partite di pistacchio fortemente contaminato da aflatossine (Ferro, 2003). Nel 2007, l'Efsa (l'Autorità europea per la sicurezza alimentare), aveva affermato la necessità di mantenere bassa l'esposizione alle aflatossine da fonti alimentari per tutelare la salute pubblica, una posizione che oggi ha scelto di modificare. In questo ultimo anno, l'Efsa, ha appoggiando la proposta della Commissione Europea in merito all'innalzamento dei limiti di aflatossine.

Con il Regolamento (UE) N. 165/2010, la Commissione europea modifica l'articolo 4, l'articolo 5 e la parte 2 dell'allegato del Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, del 19 dicembre 2006 (che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, fra cui l'aflatossina), stabilendo nuovi limiti massimi di contaminanti relativi a prodotti alimentari quali le mandorle, le nocciole ed i pistacchi da sottoporre a ulteriore trattamento, oltre che le mandorle, le nocciole ed i pistacchi "pronti per il consumo". Il regolamento è entrato in vigore dieci giorni dopo la pubblicazione sulla gazzetta ufficiale europea. Il nuovo regolamento, che ha stabilito gli incrementi autorizzati per ogni tipo di prodotto, è un adeguamento alle decisioni del Codex Alimentarius, che nel 2008 aveva proposto di portare il livello massimo di aflatossine totali in noci, pistacchi, nocciole e affini a 10 microgrammi per Kg, Il Regolamento (CE) n. 1881/2006 invece, consentiva un massimo di 4 microgrammi per Kg.

Questa scelta fa discutere, in quanto i coltivatori italiani, facevano della qualità, e quindi della bassa presenza di aflatossina nel prodotto, la loro bandiera. Con

quest'innalzamento dei limiti, il mercato europeo e quello nazionale, saranno contrassegnati da carichi di frutta secca, più a buon prezzo, ma con una più alta presenza d'aflatossine, con conseguente maggior rischio per la salute dell'uomo.

Per quanto riguarda la Turchia, anch'essa presenta i problemi pressoché analoghi dell'Iran, solamente riferiti alle nocciole. Il paradosso è che l'Italia rappresenta il primo produttore europeo di nocciole, con una produzione del 81% e secondo nel mondo, ma è il maggior importatore di nocciole turche dell'Unione Europea. Come detto in precedenza, la Turchia presenta le stesse lacune tecnologiche e scientifiche che contraddistinguono l'Iran, e quindi non riesce a mantenere basso il livello di aflatossine nelle noci.

5 MODELLI PREVISIONALI

La difesa delle colture dalle malattie ha subito, negli ultimi anni, una profonda evoluzione, portando radicali cambiamenti nell'intendere la fitoiatria. I sistemi ed i servizi di supporto alle decisioni, di cui i modelli epidemiologici fanno parte, sono nati in risposta a queste esigenze, come strumenti capaci di fornire all'operatore una serie di conoscenze sulla cui base formulare le decisioni da prendere in merito alla difesa delle colture dalle malattie (Rossi, 2002). I Disciplinari di Produzione Integrata (DPI) sono strumenti che definiscono le linee di difesa e supportano i tecnici nelle decisioni relative agli interventi; tuttavia, i criteri decisionali sono talvolta poco circostanziali, così da introdurre aspetti soggettivi. Spesso è necessario eseguire i trattamenti quando si presentano le condizioni favorevoli, per esempio, all'instaurarsi delle infezioni. Sulla base della sola esperienza in campo, è difficile stabilire se e quando si presentano le condizioni meteorologiche ed alle fasi fenologiche della coltura sono molto complesse e variabili nel corso della stagione. I modelli si pongono di definire, in modo univoco e semplice, la presenza di condizioni favorevoli allo sviluppo di vari patogeni. L'Università Cattolica di Piacenza ha sviluppato alcuni modelli di previsione del rischio micotossine nel mais. Questi modelli utilizzano principalmente i dati meteorologici come input, ma possono tener conto di qualunque altro fattore influente, qualora siano disponibili dati quantitativi sull'effetto nei riguardi dello sviluppo dei funghi e delle micotossine. La messa a punto di modelli previsionali richiede la disponibilità di molte informazioni, sia in relazione alle esigenze ecologiche dei funghi sia relative alla

coltivazione. I modelli, inoltre, richiedono un'accurata fase di validazione, che necessita la raccolta di ulteriori dati in situazioni geografiche ad annate diversificate. Studi recenti riguardo ad *A. flavus*, Battilani *et al.*, (2008), hanno sviluppato una funzione che consente una descrizione del rischio di presenza di aflatossine sulla base degli indici di aridità calcolati a partire dalle temperature e ai dati relativi alla piovosità. Per la realizzazione di questo modello, sono stati raccolti i dati relativi alle contaminazioni da aflatossine nel mais, analizzando 280 campioni provenienti da 5 regioni del Nord Italia (Friuli Venezia Giulia, Veneto, Lombardia, Piemonte ed Emilia Romagna) nelle annate tra il 2002 e il 2004, ad altri 350 campioni provenienti dall'Emilia Romagna raccolti nelle annate dal 2004 al 2006. I dati meteorologici riguardanti la temperatura dell'aria (T) e la quantità di pioggia caduta (R), sono stati raccolti giornalmente dal primo giugno al 30 settembre di ogni anno dal 2002 al 2005, da 67 stazioni distribuite in queste regioni.

Successivamente, si è calcolata la sommatoria di T ed R per ogni decade e questi valori sono stati utilizzati nel calcolo di 2 parametri: AURC (area under rein curve) e AUTC (area under temperature curve), utilizzati nel successivo calcolo dell'indice di aridità (AI).

$$\text{AURC} = \text{sommatoria } ((x_i + x_{i+1})/2)$$

$$\text{AUTC} = \text{sommatoria } ((y_i + y_{i+1})/2)$$

Dove i= numero di decadi considerate; n= numero totale di decadi; x=pioggia caduta in ogni decade; y= temperatura media di ogni decade

$$\mathbf{AI = AURC - AUTC}$$

Valori di AI < 0 indicano condizioni di aridità nel sito considerato.

Successivamente, mediante SPSS (Statistical Package for Social Science, versione 11.2.1, 2002, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), i dati raccolti sono stati messi in correlazione tra di loro (coefficiente Pearson) e i dati riguardanti il contenuto di aflatossine nei campioni di mais sono stati suddivisi in 2 gruppi: campioni contaminati e campioni non contaminati con una soglia di 1,5 µg/kg (variabili dipendenti). LA regressione logistica, una tecnica per stimare la probabilità che un evento accada, è stata applicata ai dati. Essa può essere scritta come segue:

$$\text{probabilità (campione contaminato)} = 1/1 + e^{-z}$$

Dove: e è la base del logaritmo naturale; Z è la combinazione naturale $Z = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_pX_p$, dove: $B_0, B_1, B_2, \dots, B_p$ sono coefficienti stimati dai dati; X_1, X_2, \dots, X_p sono variabili indipendenti

In questo caso, gli AI sono stati usati come variabili indipendenti. Il valore in uscita dalla regressione logistica è stato basato su una scala da 0 a 1; quando il valore era maggiore di 0,5 l'evento è considerato ricorrente e viceversa.

Per verificare la capacità di adattamento del modello le probabilità di contaminazione stimate sono state confrontate con i dati ottenuti dai campioni analizzati evidenziando che la funzione tende a sovrastimare la contaminazione.

Di può quindi affermare che AI è un buon indice per sommare le condizioni meteorologiche in relazione alla concentrazione di AFB1 nel mais. L'89% dei campioni sono stati classificati correttamente dal modello, nessun campione è stato sottovalutato e i campioni stimati in modo errato (11%) erano "falsi allarmi". Questo semplice modello inoltre, consente già una prima previsione già a metà luglio, con indicazioni più precise dalla metà agosto e dati definitivi a settembre, periodo ottimale per pianificare un eventuale gestione dei cereali contaminati.

CONCLUSIONI

Un aspetto fondamentale nella tematica della sicurezza alimentare è senza dubbio l'assenza di contaminanti nelle derrate alimentari. Questo perché, oltre ad attuare uno scadimento qualitativo del prodotto, può produrre tossine che risultano nocive per l'uomo e gli animali. Tra tutte le tossine che possiamo ritrovare sugli alimenti, le micotossine rivestono un ruolo di particolare rilievo, rappresentando una problematica di recente introduzione, attualmente in fase di sviluppo ed evoluzione. Data l'elevata tossicità intrinseca che sviluppano, possono causare danni anche grave alla nostra salute e a quella degli animali; per questo, l'Unione Europea ha varato numerosi leggi per porre dei limiti massimi a questi contaminanti negli alimenti. Questa legislazione, ancora in via di sviluppo, è un elemento fondamentale nella politica europea relativa alla qualità degli alimenti, in particolare alla loro salubrità e sicurezza. Nell'ottica di garantire al consumatore un prodotto sempre sano e controllato, un grande apporto deriva anche dall'introduzione di un nuovo ed innovativo concetto, la rintracciabilità della filiera. Questo concetto cardine della qualità degli alimenti, rappresenta una sicurezza per il consumatore, dato che ogni azienda che concorre alla produzione e trasformazione della materia prima, garantisce di poter identificare l'origine, risalendo la filiera dal produttore al consumatore. Nell'ottica delle micotossine, il concetto di rintracciabilità risulta fondamentale, dato che, come abbiamo visto, le micotossine si possono sviluppare in ogni passaggio della filiera produttiva.

Nel nostro paese, l'alimento che risente di più delle micotossine, è il mais, utilizzato sia per l'alimentazione umana che zootecnica. Nelle recenti indagini condotte nella Pianura Padana, si è riscontrato che il mais risulta essere maggiormente contaminato da fumonisine; ma le aflatossine, anche se meno presenti e riscontrate soltanto in annate particolarmente avverse (per esempio il 2003), hanno assunto una grande rilevanza data la loro capacità di cancerogena, e la loro presenza in alimenti sia di origine vegetale che animale. A causa del fenomeno del "carry-over", i mammiferi che ingeriscono AFB1 attraverso i mangimi contaminati, ne eliminano una quota parte sottoforma di AFM1 nel latte.

Il problema della contaminazione da aflatossina, rappresenta un problema anche per alimenti presenti sul mercato in modo massiccio, primo tra tutti l'arachide. Questa

problematica nel nostro paese si può verificare solamente in annate particolarmente ostiche, ma comunque la coltura dell'arachide ne risente in modo irrilevante data la presenza di patogeni maggiormente adatti ai nostri climi. Il problema reale per il nostro paese, si riscontra quando vengono importate ingenti partite di sementi da paesi con limiti più alti o assenti del tutto. Il caso degli Stati Uniti è esemplificativo, dato che il mercato dell'arachide è uno dei motori dell'agricoltura statunitense. Oltre agli Stati Uniti, che negli ultimi anni hanno limitato il problema grazie a parecchi studi, paesi come Turchia ed Iran, rispettivamente leader nella produzione di nocciole e pistacchi, hanno registrato forti problemi nelle esportazioni, data la forte presenza di aflatossine. Già l'Unione Europea ha bloccato nel 1997 la totale importazione di pistacchi dall'Iran, data la presenza fino a 200 volte oltre il limite di aflatossina. Nel recente regolamento 165/2010, l'Unione Europea ha voluto alzare il limite massimo di aflatossine da 4 µg/kg a 10 µg/kg negli alimenti destinati al consumo umano. Da parte della Coldiretti e da varie associazioni dei consumatori, è subito scattata la protesta, dato che così facendo, si aprirebbe il mercato a partite di alimenti ad un prezzo più basso ma con una maggior quota di aflatossine. Il problema non è solamente medico, associazioni produttrici di nocciole e pistacchi hanno subito sottolineato il fatto che se il mercato si dovesse riempire di questi alimenti a prezzi minori e con qualità minore, la produzione nel nostro paese ne risentirebbe, dato che della qualità, queste associazioni ne fanno la loro bandiera.

La necessità di individuare modalità rapide ed efficaci nell'individuare le partite contaminate, ha portato alla diffusione di sistemi di screening rapido, composti da una lampada a radiazione ultravioletta (UV), le quali mettono in evidenza la presenza di *A. flavus* e di conseguenza stimano la quantità di aflatossine. Il sistema, è in grado di discriminare tra campioni con bassi e alti livelli di contaminazione da AFB1, ma non consente di ottenere dati molto accurati.

Come più volte rimarcato, la raccolta, associata con il trasporto e lo stoccaggio degli alimenti, riveste un parte delicata nella filiera produttiva, dato che sono in queste fasi che si registrano le maggiori contaminazioni di aflatossina. Le operazioni di pulitura, i sistemi di stoccaggio e di essiccazione, devono consentire una rapida diminuzione dell'umidità interna, così da evitare lo sviluppo fungino.

Per quanto riguarda le piante geneticamente modificate, la loro coltivazione è proibita nel nostro paese, però paradossalmente è consentito l'impiego di mangimi

GM. Questa tecnologia ha ottenuto risultati positivi in altri paesi, e rappresenta una modalità per ottenere rese maggiori e maggiore resistenza alle micotossine.

La ricerca di soluzioni contro gli insetti, che possono rivestire una delle principali cause di contaminazione di *A. flavus*, risulta determinante per ridurre eventuali stress della pianta, aumentare la sanità e la quantità di prodotto ottenuto.

Attualmente, alla problematica legata alle micotossine, non esiste una soluzione specifica, ma un'insieme di operazioni coordinate lungo tutta la filiera; solo così si possono ottenere prodotti con ridottissima presenza di questi contaminanti naturali.

Per quanto riguarda il futuro, il miglioramento delle conoscenze attuali tecnico-scientifiche, lo sviluppo di ibridi resistenti e la messa a punto di modelli previsionali, sono obiettivi da ricercare per una sempre più accurata gestione del problema delle aflatossine.

RINGRAZIAMENTI

Dedico questo mio lavoro a tutti quelli, che in questi anni, mi sono stati accanto, nei momenti di gioia e nei momenti più tristi, ma soprattutto lo dedico a mia padre **NEREO**, mia madre **MONICA** e a mia sorella **EMY**. Sono stati loro, nell'arco della mia vita, ma soprattutto in quest'ultimo anno, a darmi il maggior supporto e disponibilità per far sì che arrivassi dove sono ora.

Non posso non ringraziare il **COLLEGIO DON NICOLA MAZZA**, dalla direzione agli studenti, che hanno reso la mia vita universitaria piena di occasioni per mettermi alla prova e vivere intensamente questi miei anni. Ringrazio soprattutto **Damiano, Mirko, Jacopo, Andrea e tutti i ragazzi del 4° piano**, compagni inseparabili nei momenti di "cazzeggio" più estremo. Un particolare ringraziamento va al mio migliore amico **MARCO**, che instancabilmente mi sopporta da anni. Un sentito ringraziamento va al mio relatore, il Prof. **Roberto Causin**, che senza la sua pazienza e volontà non mi avrebbe permesso di arrivare fin qui.

BIBLIOGRAFIA

- **A.A.V.V.**, (2005). La diffusione delle micotossine nelle produzioni italiane di mais. L'informatore agrario 10/2005.
- **Abbas H.K., Zablutowicz R.M. H.A., Abel C.A.**, (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolated. Biocontrol Sci. Technol., 16(5), pp. 37-449.
- **Aguirre J. Hansberg W., Navarro R.**, (2006). Fungal responses to reactive oxygen species. Med. Mycol. 44, pp. 101-107.
- **Amodeo P.**, (2008). Controllo delle micotossine, una questione di filiera. L'informatore agrario 11, pp. 11-12.
- **Battilani P.**, (2004). Ferite alle cariossidi e umidità favoriscono i funghi aflatossigeni. L'informatore agrario 14, pp. 47.
- **Battilani P., Barbaro C., Bertuzzi T., Marocco A., Pietri A., Scandolara A., Scudellati D.**, (2008). Micotossine in Emilia Romagna, risultati incoraggianti. L'informatore agrario 7/2008.
- **Battilani P., Barbano C., Piva G.**, (2008). Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy. World Mycotoxin Journal, 1(4), pp. 449-456.
- **Beardall J. M., Miller J.D.**, (1994). Disease in humans with mycotoxins as possible causes. In J.D. Miller and H.L. renholm (ed.), Mycotoxins in grains, pp. 487-539.
- **Bennet J.W., Klich M.**, (2003). Mycotoxins. In clinical Microbiology review, pp. 25-26
- **Berry C.L.** (1988). The pathology of mycotoxins. Journal of Pathology.
- **Bhatnagar D., Cary J.W., Ehlich K., Yu J., Cleveland T.E.** (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxins production and *Aspergillus* development. Mycopathologia, 162, pp. 155-166.
- **Blandino M., Reyneri A., Vanara F.**, (2008). Effect of plant density on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels. Field Crops Research, 106, pp. 234-241.
- **Bottalico A.**, (2004). Micotossine. In chimica degli alimenti. Cabras P. e MAartelli A., Piccin Nuova Libreria, Padova, pp. 649-686.

- **CAST:** Council for Agricultural science and technology, (2003). Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report n° 139.
- **Causin R.**, (2006). Funghi e micotossine. Mais e sicurezza alimentare. Veneto agricoltura, pp.11-29.
- **Chang P. K.**, (2003). The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxins pathway-specific regulator AFLR. Mol. Genet. Genomics 268, pp. 711-719.
- **Cotty P. J.** (1990). Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxins contamination of developing cotton-seed. Plant Dis., 74(3), pp. 233-235.
- **Dimic D. J.**, Nesic K., Petrovic M., (2009). Contamination of cereals with aflatoxins, metabolites of fungi *Aspergillus flavus*. Biotechnology in Animal Husbandry 25 (5-6), p 1203-1208.
- **Dorner J. W.** (2004). Biological control of aflatoxins contamination of crops. L. Toxicol. Toxin Rev., 23(2&3), pp. 425-450
- **Ehlich K.C., Cary J.W., Montalbano B.G.**, (1999). Characterization of the promoter for the gene encoding the aflatoxins biosynthetic pathway regulation protein, AFLR. Biochim. Et Biophys. Acta 1999; 1444, pp. 412-417.
- **Facco F., Causin R.**, (2010). Mais, alfatossine e sicurezza alimentare.
- **Horn B. W.** (2005) Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97(1), 2005, pp. 202–217.
- **Hussein H.S. e Brasel J.M.**, (2001). Toxicity, metabolism, and impact pf mycotoxins on humans and animals. Toxicology.
- **Klich M. A.** (1986). Presence of *Aspergillus flavus* in Developing Cotton Bolls and Its Relation to Contamination of Mature Seeds. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Oct. 1986, p. 963-965
- **Klich M.A.** (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxins. Molecular Plant Pathology 8(6), pp. 713-722
- **Liu BH, Chu FS.**, (1998). Regulation of *aflR* and its product, AflR, associated with aflatoxins biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol 64(10), pp. 3718-3723.

- **Mahoney N., Molyneux R.J.** (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnuts (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, pp. 1882-1889
- **Moretti A., Logrieco A., Bottalico A.**, (2006). Micotossine nella filiera cerealicola. *Informatore Fitopatologico*, 2, pp. 7-13.
- **Reyneri A., Blandino M., Vanara F., Maiorano A.**, (2005). Fattori agronomici che influenzano la produzione di micotossine. *Informatore Fitopatologico* 55, pp. 3-10
- **Smith J. E., Moss M.O.**, (1985). *Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance*. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 36-41
- **Yu J., Chang P.K., Ehrlich K.C., Cary J.K., Bhatnagar D., Cleveland T.E., Payne G.A., Linz J.E., Woloshuk C.P., Bennet J.W.**, (2004). Cluster pathway genes in aflatoxins biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2004, pp. 1253-1262.