

# Le micotossine





*Divolo Laura*

*Esame di Stato 2010 – 2011*

## Indice

|  |         |
|--|---------|
| Articoli di cronaca  | Pag. 2  |
| Funghi & muffe   | Pag. 7  |
| Micotossine – definizione  | Pag. 8  |
| Caratteristiche delle micotossine:                                     |         |
| • <i>Perché vengono sintetizzate le micotossine?</i>                   | Pag. 8  |
| • <i>Fattori che influenzano la sintesi delle micotossine</i>          | Pag. 8  |
| • <i>Substrato attaccato e aree del pianeta maggiormente attaccate</i> | Pag. 11 |
| Classificazione delle micotossine e tipo di azione lesiva:             | Pag. 13 |
| • <i>Meccanismo d'azione a livello cellulare e di DNA</i>              |         |
| Prevenzione e trattamenti di bonifica                                  | Pag. 25 |
| Glossario  | Pag. 26 |

|   |  |   |   |   |
|---|--|---|---|---|
| <b>OGGI</b><br>Inerte ad<br>uccidimenti. Venti<br>all o moderati<br>dentati. Mare<br>bralmente mosso.<br>IFA 849x 90 - 10/11/04 | <b>PREVISIONI METEO</b><br> Aumento della nuvolosità<br>con pioggia o temporali.<br>Venti moderati da<br>Sud-Ovest. Mare mosso o<br>molto mosso.<br>UMBRE 10/11/04 - 10/11/04 | <b>DOMANI</b><br> 10<br>22 | <b>NOTIZIE UTILI</b><br>Dimanti, come tutti i giorni 9999, divieto di circolazione<br>dalla ore 03.00 alle 06.00, per le vetture non caricate in<br>sicurezza di forze e mezzi; obbligo di<br>dell'assessore comunale alla mobilità | <b>NUMERI</b><br>Per fare telefonate a distanza degli<br>clienti: 800 012055<br>(gratuito), 800 012056 (gratuito)<br>clienti: 800 012057 (gratuito) |
|---|--|---|---|---|

Rilevate sostanze cancerogene sui prodotti importati da Turchia, Brasile e Costa d'Avorio

# Cereali contaminati nel porto

Sequestrati carichi di mais con micotossine. Allarme anche per caffè e frutta secca

## Al bando la paprika in Ungheria: contiene tossine

Allarmanti i livelli di aflatossina nella spezia base della cucina ungherese.

Produzione locale mischiata con polvere dai tropici.

CRONACHE del 29.10.2004

Corriere della Sera

## Dati rassicuranti

*L'Italia è una delle nazioni europee più attente al problema delle micotossine, tanto che la normativa italiana, in vigore dal 1999, è stata adottata nel 2001 dall'Ue.*

«Il problema delle aflatossine esiste ed è serio, - dice Corrado Galli, presidente della Federazione delle Società Europee di Tossicologia e docente all'Università di Milano - ma è anche uno di quelli più seguiti con regolarità dalle autorità sanitarie internazionali e dalla European Food Safety Authority. La questione va quindi analizzata in modo scientificamente rigoroso, altrimenti si rischia di creare inutile allarmismo». «In Italia il problema è sotto controllo - precisa Marina Miraglia dell'Istituto Superiore di Sanità -. Nel nostro reparto c'è una sezione che opera da 25 anni su questo argomento. In Europa siamo una delle nazioni più attente, tanto che la normativa italiana, del 1999, è stata adottata nel 2001 dall'Ue. E anche per i prodotti destinati alla prima infanzia i valori italiani del '99 sono da poco divenuti norma Ue». «La legge europea prevede come limite massimo accettabile per l'aflatossina M 1 del latte un valore di 50 ppt (parti per trilione, 50 parti su 1000 miliardi). Quando si riscontrano valori superiori, il latte per legge va distrutto» spiega Galli. «Questo limite legale è del tutto precauzionale, perché il livello di tossicità effettivo è almeno 100 volte superiore. Anche il Codex Alimentarius (organismo internazionale che fissa i parametri di sicurezza dei contaminanti alimentari) ha stabilito per l'aflatossina nel latte un intervallo di sicurezza da 50 a 500 ppt, valori adottati in USA e in alcuni paesi del Sud America, fino a dieci volte superiori al limite europeo». Per

quanto riguarda la presenza di aflatossine B 1 nelle farine di mais i limiti di accettabilità in vigore nell'Ue sono di 2 microgrammi per kg. Anche in caso si tratta di valori prudenziali. La presenza di aflatossine M 1 nel latte in misura superiore ai limiti di legge deve ritenersi un caso eccezionale.

### **Riscontri**

Un test su 31 campioni di latte pubblicato da Altroconsumo (associazione di consumatori specializzata nell'analisi dei prodotti alimentari) nella primavera del 2003 non evidenziava la presenza di aflatossine in 24 marche. In altri 7 campioni i valori erano comunque decisamente inferiori rispetto ai limiti di legge. Le conferme sulla sicurezza delle farine di cereali (frumento, mais, avena, orzo...) emergono da uno studio pubblicato l'anno scorso e realizzato dal gruppo di Patrizia Restani del Dipartimento di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano su 422 campioni (di cui 192 di farine biologiche) acquistate presso negozi al dettaglio (e farmacie per i prodotti destinati ai bambini). Tutti i campioni sono risultati a norma per quanto riguarda i livelli di Ocratossina A (micotossina che si sviluppa nei cereali) con valori ben al di sotto dei limiti di legge. Per i baby food solo 4 campioni avevano valori leggermente superiori ai limiti, che per i prodotti per l'infanzia sono particolarmente restrittivi. [

### **La crisi del 2003**

«L'unica situazione critica negli ultimi anni - precisa Corrado Galli - risale alla torrida estate del 2003, quando per settimane si registrarono 30-35 gradi in tutta la penisola. In quel periodo i valori di aflatossina M 1 nel latte delle mucche alimentate con mangime a base di mais arrivarono a 60-70 ppt (superiori ai 50 ppt previsti dalla legge). Il forte caldo e l'umidità, infatti, sono fattori climatici che favoriscono lo sviluppo delle muffe produttrici di micotossine. L'azione fu immediata e milioni di litri di latte e lotti interi di mais vennero distrutti in diverse regioni, anche se non si poteva comunque parlare di allarme per la salute». Un'altra ricerca, condotta da Amedeo Pietri, docente di Scienze degli alimenti e della nutrizione dell'Università Cattolica di Piacenza (ricerca cui ha fatto riferimento Umberto Veronesi, manifestando i timori sulle aflatossine) ha riscontrato su 80 campioni di latte, prelevati nei punti vendita tra novembre 2003 e febbraio 2004, solo 2 con valori fuori norma. Per la farina di mais, invece, il 25% dei campioni superava il livello consentito (2 microgrammi per kg). Anche in questo caso, secondo gli esperti, i livelli superiori erano da correlare al clima eccezionalmente caldo dell'estate. Dopo la "crisi" del 2003, prese il via un monitoraggio con costante prelievo di mais e latte, che è ancora in corso. Un programma di ricerca, finanziato dal Ministero delle politiche agricole, poi, vuole approfondire il problema della contaminazione mais-latte e prevedere le situazioni favorevoli alla formazione di aflatossine. Oltre a ciò va sottolineato che i controlli delle aflatossine nel latte rientrano nelle analisi di routine di tutte le aziende. Per il test servono 8 minuti

e segue il blocco del carico in caso di riscontri positivi. «Il problema vero per il mais italiano è la fumonisina, - precisa Pietri - micotossina diffusa nei raccolti, che però è 1000 volte meno tossica delle aflatossine. L'Ue sta elaborando limiti che dovrebbero entrare in vigore nel 2007».

29 marzo 2005

**Corriere della Sera**

## **Funghi microscopici, ma ultravelenosi**

*Salute: un pericolo a lungo sottovalutato. Le micotossine sono talvolta presenti in cereali, caffè, spezie e frutta secca: le norme europee.*

Le micotossine sono sostanze velenose prodotte (in particolari condizioni ambientali) da funghi filamentosi microscopici (miceti) comunemente chiamati «muffe». Possono essere presenti nei cereali, nei semi oleosi, nel caffè, nel cacao, nelle spezie, nella frutta secca. La presenza di miceti nei mangimi è un problema di vaste proporzioni, tenuto conto della ricaduta nei cibi di origine animale. Il pericolo maggiore è rappresentato dal fatto che possono provocare nell'uomo neoplasie in vari organi (fegato in particolare, rene, polmone). I cibi a rischio sono quelli provenienti dal Terzo Mondo, dove sono ancora applicate tecnologie primitive in regioni con clima tropicale e sub tropicale. Nei paesi industrializzati i casi di intossicazione da micotossine sono fortunatamente rari, ma il problema richiede una continua sorveglianza. L'Unione Europea ha stabilito in Italia (Parma) la sede dell'Authority Europea per la sicurezza degli alimenti, un organismo creato per rafforzare l'attuale sistema di assistenza tecnico-scientifica e dare impulso alla ricerca anche in questo settore. Oltre agli immigrati dal Terzo Mondo che tendono a conservare e a trasmettere le loro abitudini alimentari (oggi è di moda la cucina «fusion») anche in condizioni climatiche diverse da quelle del loro paese, sono esposti al rischio i vegetariani e i cultori degli alimenti «biologici» che utilizzano cibi costituiti da materie prime vegetali non trattate con fitofarmaci (antiparassitari, anticrittogamici) che, conservate in condizioni «naturali» (ma non necessariamente le migliori), possono essere contaminate con funghi produttori di micotossine. I danni causati da miceti sono di antica data, ma le conoscenze sono state approfondite soltanto in epoca recente in conseguenza di una drammatica moria di polli, tacchini, suini e bovini avvenuta in Inghilterra nel 1960. Il responsabile dell'ecatombe è stato identificato in una farina di arachidi proveniente dal Brasile usata nella preparazione di mangimi che risultò contaminata da un aspergillo (*A. flavus*) produttore di metaboliti fortemente tossici denominati «anatoossine». Attualmente sono state individuate oltre duecento molecole nella struttura chimica e relativa tossicità appartenenti a questa classe di sostanze: ocratossine, tricoteceni, patuline, fumolisine, zearalenone, oltre a numerose aflatossine. In passato le tossine prodotte da

funghi hanno causato gravi epidemie: è sufficiente ricordare quella dovuta all'ingestione di farine di segale contaminate da *Claviceps purpurea*, che provoca dolori lancinanti alle estremità, vaste lesioni cutanee, febbre e senso di bruciore insopportabile. L'intossicazione (denominata ergotismo) fu erroneamente etichettata come malattia infettiva. Per soccorrere l'ingente numero di colpiti sorse l'Ordine degli Anteniani del Delfinate e Sant'Antonio fu considerato il Patrono protettore con ospedali e chiostri dotati di porte tinteggiate in rosso, simbolo del fuoco. Nella medicina popolare la denominazione di «fuoco di Sant'Antonio» è attribuita anche all'Herpes Zoster, che invece non ha nessun rapporto con l'ergotismo. Il «Libro Bianco sulla sicurezza alimentare» dell'Unione Europea sottolinea che gli europei non hanno mai goduto di un livello di sicurezza alimentare così elevato come l'attuale, però molto resta da fare. In futuro, nella lotta contro le micotossine, potremo avere un aiuto anche da alcune tipologie di cereali OGM, dotati di resistenza agli insetti e minori possibilità di attacco da parte delle muffe.

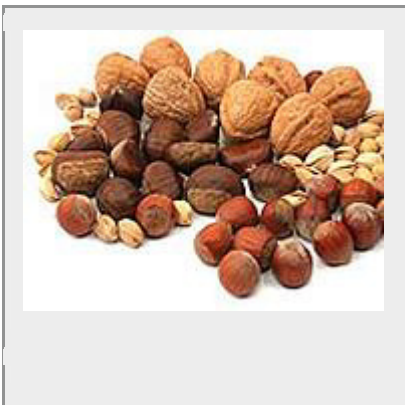
*Renzo Pellati*

*(02.02.2005)*

**TuttoScienze - numero 1165**

## **Tossine nella frutta secca, la UE aumenta la soglia consentita**

*Via libera di Bruxelles all'innalzamento dei limiti per le aflatossine: consumatori a rischio?*



**MILANO** - L'ok dovrebbe arrivare domani: il Comitato dei Rappresentanti dei 27 Stati dell'Unione Europea non si opporrà alla proposta della Comunità Europea di innalzare i limiti consentiti delle aflatossine nella frutta secca. L'ultima parola sul nuovo regolamento spetterà poi al Parlamento europeo, che si pronuncerà entro i prossimi tre mesi: se la proposta passerà si potranno trovare in pistacchi, mandorle e noccioline concentrazioni di tossine anche doppie rispetto a quelle attuali.

**TOSSINE** – Le aflatossine fanno parte della famiglia delle micotossine e sono sostanze tossiche prodotte da alcune muffe che si possono trovare in diversi alimenti, fra cui appunto tutta la frutta secca ma anche mais, riso, fichi, oli vegetali grezzi e semi di cacao. Non sono distrutte dalla cottura né da altri processi di trasformazione dei cibi ma sono ormai riconosciute come fattori potenzialmente cancerogeni, per cui l'idea di sgranocchiarne in quantità assieme ai pistacchi o alle arachidi di uno stuzzichino non pare allettante. Il nuovo regolamento, che stabilirà gli incrementi autorizzati per ogni tipo di prodotto (compresi cereali, derivati dai

cereali e alcuni semi oleosi), è di fatto un adeguamento alle decisioni del Codex Alimentarius, l'Ente creato dalla FAO e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità per stabilire gli standard alimentari che nel 2008 aveva stabilito di portare il livello massimo di aflatossine totali in noci, pistacchi, nocciole e affini a 10 microgrammi per chilo: attualmente, invece, l'Europa consente un massimo di 4 microgrammi per chilo. A essere maligni, pare una di quelle regole fatte apposta per allargare il mercato: alzando la soglia consentita, infatti, potranno importare in Europa i loro prodotti anche paesi in via di sviluppo dove le tecniche di raccolta e stoccaggio non sono proprio senza nei e per questo consentono una crescita più indisturbata delle tossine. Prevenire e controllare la formazione delle muffe infatti è l'unico modo per garantire prodotti senza aflatossine.

**PERICOLI** – Ma che cosa rischia l'ignaro consumatore che tuffa la mano nelle arachidi o nei pistacchi dell'antipasto? Spiega Carlo Brera, ricercatore del Dipartimento di Salute Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Istituto Superiore di Sanità – Reparto OGM e Micotossine: «L'Unione Europea da alcuni anni ha demandato le valutazioni in materia di sicurezza alimentare all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA). L'autorizzazione all'innalzamento della soglia di aflatossine consentite arriva a seguito di un parere positivo dell'EFSA, che è consultabile anche online: secondo l'ente europeo, alzare i limiti non provocherà un aumento significativo di pericolo per la salute pubblica. Il nostro Istituto in realtà ha assunto una posizione diversa, perché non riteniamo sufficienti i dati e le argomentazioni portate dall'EFSA per innalzare i limiti di sostanze che sono certamente nocive: non a caso il Governo italiano, accogliendo il nostro parere, è stato l'unico a votare contro». I dubbi ci sono non solo per la frutta secca, ma anche e soprattutto per altri prodotti di uso più abbondante, come i cereali: non a caso proprio Brera, assieme alla collega Marina Miraglia e in collaborazione con l'Associazione Italiana Celiachia, ha da poco iniziato il primo studio italiano di valutazione dell'esposizione dei celiaci ad aflatossine e altre micotossine del mais. I celiaci infatti sono grandi consumatori di questo cereale perché è privo di glutine, ma la pianta di mais è geneticamente molto suscettibile alla contaminazione con aflatossine: valutare quanto e come sono esposti questi pazienti potrà dare informazioni utili anche a tutta la popolazione, per capire davvero quante aflatossine ci arrivano nel piatto.

*Elena Meli*

*12 gennaio 2010*

***Corriere della Sera***

## **Funghi e muffe**

### ***Funghi***

Il regno dei funghi o miceti, classificati scientificamente da Linneo nel 1753 e inizialmente accorpati alle Piante, comprende specie di organismi aventi le seguenti caratteristiche:

- Alimentazione eterotrofa;
- Completa mancanza di tessuti differenziati e di elementi conduttori;
- Sistema riproduttivo attraverso elementi detti spore (e non attraverso uno stadio embrionale come avviene per animali e piante).

Al regno dei Funghi appartengono organismi, da molto semplici, unicellulari a più complessi, pluricellulari, con struttura vegetativa organizzata in cellule filamentose dette ife o micelio primario. A differenza delle cellule vegetali, che hanno una parete costituita prevalentemente da cellulosa, la parete cellulare dei Funghi è costituita da un altro polisaccaride, la chitina, polimero della N-acetil-glucosamina. La chitina, rispetto alla cellulosa, è molto più resistente alla degradazione da parte dei microbi, al caldo, al freddo e alla siccità. Le cellule che costituiscono le ife possono essere mono o polinucleate e possono essere divise da setti. La presenza o meno dei setti è una caratteristica distintiva di alcuni gruppi di funghi rispetto ad altri. Negli Zigomiceti, infatti, le ife non sono settate, cosa che invece è presente negli Ascomiceti, nei Basidiomiceti e nei Deuteromiceti. Il setto può essere:

- intero, senza poro;
- perforato, con poro centrale che consente il passaggio del protoplasma e di organi cellulari;
- a barile (o doliporo), con poro circondato da un bordo costituito da fibre di chitina che arriva a formare una struttura cilindrica (presente in alcuni gruppi di Basidiomiceti).

Le ife si sviluppano all'interno del substrato di crescita fino a formare un reticolo intrecciato detto micelio.

Una delle caratteristiche di alcuni funghi è quella di emettere luce, come ad esempio la clitocibe dell'ulivo (*Omphalotus olearius*), che si illumina per via delle lamelle bioluminescenti.

### ***Muffe***

Le muffe si differenziano dai funghi per il loro corpo fruttifero meno visibile; sono in grado di ricoprire alcune superfici sotto forma di spugnosi miceli e solitamente si riproducono per mezzo di spore. È comunemente chiamata muffa un agglomerato di questi sottili miceli, formati su materia vegetale o animale, generalmente come uno strato schiumoso o filamentoso, come segno di decomposizione e marcescenza.

## **Micotossine**

Le micotossine sono sostanze chimiche naturali, altamente tossiche, derivate dal metabolismo secondario di alcune specie di funghi (o macromiceti) e muffe (o altre specie microscopiche) parassite. I generi fungini maggiormente interessati alla produzione di tali tossine sono: *Aspergillus* (le cui specie sono fortemente aerobiche e prediligono substrati come patate, amido e cereali), *Penicillium* e *Fusarium*. Tuttavia, solo un ridotto sottoinsieme di specie aerobiche, appartenenti a tali generi, sono in grado, in condizioni microclimatiche favorevoli, di attivare le vie metaboliche secondarie per la sintesi delle micotossine. Esse vengono classificate come "metaboliti secondari" poiché non si è in grado di attribuire loro alcun ruolo evidente nella crescita dell'organismo che le produce. Vengono inoltre prodotte solo durante una fase del ciclo vitale della specie fungina e derivano da alcuni precursori formati durante il metabolismo primario dell'organismo: glucosio - derivati (polisaccaridi, peptidopolisaccaridi, ecc.), derivati dell'acetato - malonato nella sintesi degli acidi grassi, (fenoli, ecc.), derivati dell'acido mevalonico (terpeni). Le micotossine, non costituiscono pertanto una classe chimica ma presentano tra loro strutture molto diverse; se infatti, il metabolismo primario è fondamentalmente uguale per tutti gli esseri viventi, quello secondario dipende invece dalla specie e talvolta dal ceppo fungino produttore della tossina. Da ciò ne deriva la gran diversità delle molecole sintetizzate. Si è riscontrata inoltre la capacità di alcune singole specie fungine di sintetizzare diversi tipi di micotossine.

Le micotossine si differenziano dalle tossine batteriche in quanto presentano basso peso molecolare, hanno natura lipofilica, non mostrano attività antigenica ed hanno una notevole resistenza nei confronti di agenti chimici e fisici, come il calore. Non vengono infatti distrutte dalle normali operazioni di cottura, né dai diversi trattamenti cui vengono normalmente sottoposte le derrate alimentari durante i processi di preparazione degli alimenti. Sono, dunque, termostabili e fotostabili. Le stesse micotossine o loro derivati possono persistere per lungo tempo dopo la crescita vegetativa e la morte del micete ed essere presenti anche su prodotti non ammuffiti. Pertanto, l'assenza di ceppi fungini negli alimenti non indica necessariamente l'assenza di micotossine.

## **Caratteristiche delle micotossine**

### ***Perché vengono prodotte le micotossine?***

Lo sviluppo di muffe tossinogene e la successiva sintesi di micotossine dipende strettamente dalla crescita fungina. La crescita contemporanea di più specie fungine sullo stesso substrato riduce, tuttavia, la produzione di micotossine. La sintesi di questi metaboliti secondari riguarda dunque o un fenomeno concorrenziale nutritivo, avente come risultato il contenimento dello sviluppo di muffe tossinogene oppure una biodegradazione, ad opera di specifici enzimi, di tossine già presenti, prodotte da altre specie di muffe.

Si è potuto riscontrare così, che, in coltura pura le muffe producono una maggiore quantità di tossine e ciò avviene essenzialmente su substrati come granella, farine, mangimi, mentre, su substrati come i foraggi, si osserva una

crescita contemporanea di molte specie fungine che determina una minore produzione di tossine.

### ***Fattori che influenzano la sintesi di micotossine***

Le muffe in grado di produrre micotossine sono ubiquitarie, possono cioè vivere in molti tipi di ambienti, adattandosi bene ad un ampio intervallo di temperature, da quelle elevate senza escludere quelle più basse e in presenza di un'elevata percentuale di umidità. Possono presentare una colorazione bianco – verdastra o nera e il loro aspetto pulverulento è dovuto ad una fitta rete di ife, o filamenti e sporangi, i contenitori delle spore. Sono in grado di invadere l'ospite infiltrandosi in modo capillare e solo ad un certo punto del loro sviluppo e in particolari condizioni ambientali i filamenti si riproducono attraverso la produzione di un corpo fruttifero, lo sporangio, dalle cui spore si origineranno nuovi individui.

Numerosi sono i fattori che influenzano la sintesi di micotossine, ad opera di muffe e specie fungine:

- tipo di ceppo fungino/ specie della muffa;
- fattori intrinseci, legati al ceppo fungino;
- livello iniziale di contaminazione, che influenza la quantità di tossine sintetizzabili;
- fattori estrinseci, costituiti dall'insieme delle condizioni ecologiche che determinano la crescita fungina e, di conseguenza, la sintesi di tossine;
- fattori chimici, fisico – chimici e fisici quali l'umidità, l'acqua libera (aw), la temperatura, la natura del substrato, la composizione gassosa (atmosfera) e i danni meccanici alla cariosside;
- fattori biologici quali gli insetti, sia come vettori di spore fungine, sia come agenti di lesione alle cariossidi, favorendo l'insediamento delle muffe, la microflora, con risultante competizione tra le specie fungine, lo stress della pianta (es. siccità) e la resistenza del substrato, intesa sia come resistenza genetica, sia come integrità delle cariossidi.

### *Umidità ambientale o acqua libera (aw)*

Il fattore che richiede maggiore attenzione è l'umidità ambientale o acqua libera (aw). La colonizzazione fungina degli alimenti si verifica più frequentemente di quella batterica a livelli di aw inferiore a 0,85; questo non perché i funghi non siano in grado di crescere a tenori più elevati, ma piuttosto perché i batteri sono fortemente competitivi e diventano la microflora predominante a valori di aw compresa tra 0,85 e 1,00. Con un'aw compresa tra 0,85 e 0,93 solo alcuni batteri sono in grado di crescere e la colonizzazione da parte di muffe e lieviti è superiore a quella batterica.

In base alle loro differenze di comportamento in funzione della disponibilità d'acqua le specie fungine sono state classificate in: igrofile (a più alti valori di aw), mesofile e xerofile (a più bassi valori di aw).

Il valore minimo di aw nella quale si è riscontrata una crescita fungina è di 0,61; tuttavia, non si conoscono specie tossinogene in grado di crescere con

valori di  $a_w < 0,78$ . inoltre, i livelli minimi per la sintesi delle micotossine sono generalmente superiori a quelli necessari per la crescita fungina.

A valori di  $a_w$  bassi (0,25-0,30), l'acqua è fissata al substrato con legami energetici forti, ma mano a mano che questi livelli aumentano, cresce il suo grado di disponibilità (o di libertà) ed i suoi legami con il substrato diventano più deboli.

Infine, la disponibilità di acqua dipende anche da fattori ambientali; così, l' $a_w$  limite per la tossinogenesi è tanto più bassa quanto più la temperatura si avvicina a quella ottimale per una determinata specie fungina.

La relazione tra  $a_w$  e umidità non è lineare e ogni tipo di derrata ha una sua propria curva di assorbimento, o curva di equilibrio acqua-substrato, detta isoterma di assorbimento dell'acqua; questo fattore spiega come il tenore in acqua corrispondente al valore di  $a_w$  da non superare (0,65 circa) per assicurare una buona conservazione, sia diversa in funzione dell'alimento. Ad esempio, a temperature di 25°C, l'umidità non deve superare il 13-13,5%, per i cereali, e il 7-8% per i semi oleosi.

### Temperatura

Le temperature ideali per lo sviluppo di una muffa sono comprese tra i 15°C e i 30°C, con un optimum di 20-25°C. Tuttavia, alcune specie presentano una crescita apparente a -6°C ed altre possono manifestarsi su pesce congelato a -20°C. Altre specie ancora non hanno subito alcun trauma dopo esser state incubate per 77 ore nell'idrogeno liquido a -253°C e per diverse ore in aria liquida a -190°C.

Ad alte temperature, invece, il micelio non si manifesta, fatta eccezione per alcune specie patogene come *A. fumigatus* che alle temperature corporee attacca le prime vie respiratorie e resiste a temperature pari o superiori ai 50°C.

Ben oltre i 35-40°C sopravvivono le forme di riproduzione di molte specie mentre alcune muffe possono crescere indiscriminatamente sia a temperature basse che elevate, presentando una crescita veloce sia a 20°C che a 5°C.

### pH e ossigeno

Lo sviluppo del micelio avviene a valori di pH compresi tra 4 e 8; tuttavia, alcune muffe possono manifestarsi anche a valori più bassi o più elevati, modificando opportunamente l'acidità del mezzo, mano a mano che il micelio si sviluppa.

Le muffe sono generalmente organismi aerobi che si sviluppano sulla superficie dei substrati. Diverse specie tuttavia possono crescere anche in profondità o in mezzi liquidi, con basso tenore di ossigeno, assumendo un aspetto levuliforme o gelatinoso, o ancora in atmosfera modificata con CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>.

### Tossinogenesi

Se sussistono le condizioni ambientali favorevoli, lo sviluppo delle muffe negli alimenti è poco influenzato dalla natura del substrato. Non è tuttavia, il caso

della sintesi delle micotossine, dove il tipo di substrato e le condizioni ambientali assumono dei limiti molto più delineati e specifici. La tossinogenesi richiede infatti valori di aw più elevati rispetto a quelli richiesti per la crescita fungina e sempre vicino a 0,90. l'umidità del substrato è sempre il vincolo principale per prevenire la tossinogenesi di un alimento, perciò, il suo controllo è indispensabile.

Relativamente alle condizioni termiche è difficile individuare limiti di contenimento, se si esclude la produzione di una determinata classe di micotossine, le aflatoxine, che non sono mai state isolate a temperature <10°C anche in substrati fortemente ammuffiti.

Il tenore di ossigeno e l'acidità del substrato rappresentano fattori irrilevanti per il potenziale tossinogenico delle muffe.

Il tipo di substrato è invece l'elemento che probabilmente più di ogni altro influenza la tossinogenesi.

I vegetali favoriscono la produzione di micotossine, più dei substrati animali; la presenza soprattutto di amido sembra incrementare la micotossinogenesi e, in particolare, la presenza di zinco limitatamente alla sintesi di aflatoxine.

***Substrato attaccato, fasi in cui avviene la sintesi di micotossine e aree del pianeta maggiormente interessate.***



La sintesi di micotossine può avvenire in qualsiasi fase del ciclo di produzione e preparazione dell'alimento, a partire dalla coltivazione, alla conservazione e alla trasformazione, fino ad arrivare al consumo.

**Formazione delle micotossine durante la coltivazione**

Una delle fasi principali durante la produzione di un alimento a cui non si presta in genere sufficiente attenzione è quella della coltivazione. Questa risulta di estrema importanza per la presenza delle micotossine sintetizzate dai funghi della specie *Fusarium*.

Frumento e mais sono i più colpiti. Il fungo persiste a lungo nel suolo, nei residui di tessuti vegetali, dopo la mietitura, sotto forma di ascospore e macroconidie che rappresentano le sue forme di sopravvivenza.

L'infezione della pianta è favorita dall'antesi (apertura del fiore) ed è necessaria una superficie umida per 48-60 ore, a temperatura non inferiore a 15°C. Il mais è il più soggetto ad ammuffimento dopo una pioggia di 6-90 giorni.

Oltre ai fattori climatici, l'attacco da parte degli insetti è particolarmente predisponente all'infezione. Essi, tuttavia, causano una differenziazione tra le specie fungine: un determinato insetto favorisce una specie piuttosto che un'altra.

I ceppi di *Fusarium* tossinogeni rappresentano un problema di ordine mondiale e sono stati isolati in Norvegia, Argentina, Austria, Bulgaria, Canada, Cina, Francia, Germania, Grecia, Ungheria, Italia, Giappone, Corea, Nepal, Polonia, Portogallo, Russia, Svezia, UK, Yemen, Spagna, Olanda, Brasile, Finlandia, Egitto, Nigeria, India, Sud Africa, Australia e Nuova Zelanda.

Inoltre, colpiscono molte piante tra cui frumento, mais, orzo, avena, riso, sorgo, segale, patate, banane, semi di mostarda, semi di soia, mango, arachidi, semi di girasole, cassava e anche gli steli alti dell'erba.

Il marciume della patata rappresenta un grosso problema in America e nell'Europa con elevate concentrazioni di micotossine.

Le banane sono spesso molto contaminate; è stato osservato che quelle che provengono dall'India presentano livelli che superano i 90 mg/Kg. Nel 1994, il 100% delle banane provenienti da Ecuador, Panama e Canarie sono infette da ceppi tossinogeni.

Normalmente le piante sono resistenti all'infezione fungina ma in condizioni di stress (carenze minerali, aumento della salinità del suolo, attacco da insetti, stress idrico) diventano suscettibili.

Per quanto riguarda le aflatossine, *Aspergillus flavus* e *A. parassiticum* possono virtualmente sintetizzarle su qualsiasi pianta infettata, ma il pericolo esiste soprattutto nelle regioni a clima tropicale e simili. Elevati livelli di contaminazioni sono state osservate su mais, arachidi, noci, pistacchi, cotone, copra, mandorle, uva, spezie, fichi, mentre soia, fagiolo, leguminose, cassava, sorgo, frumento, orzo, avena e riso sono normalmente resistenti.

Tra gli alimenti di origine animale, il latte è uno dei prodotti in cui la migrazione di aflatossine è più evidente, qualora le vacche siano alimentate con prodotti zootecnici molto contaminati.

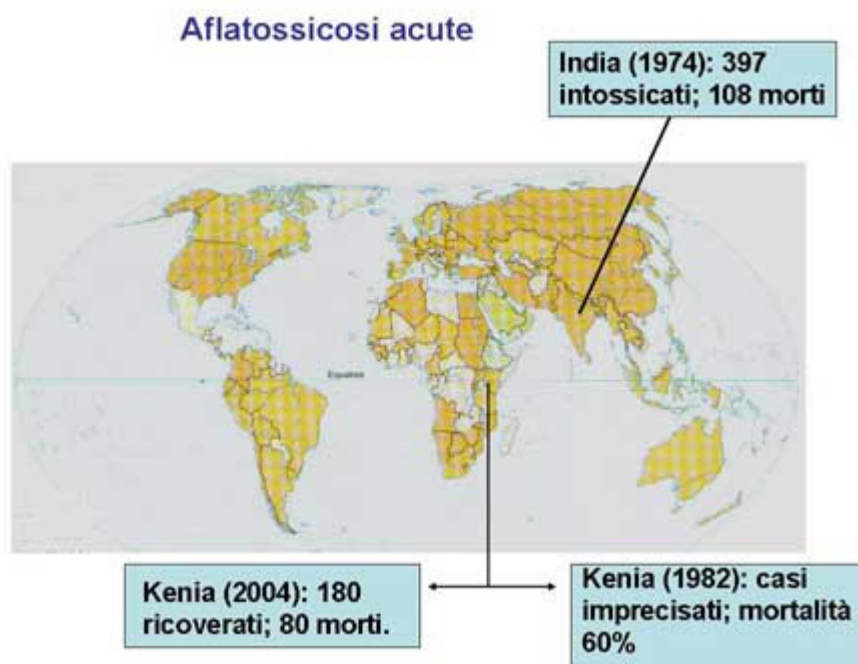
In tal caso, nel latte, compaiono molecole idrossilate delle aflatossine B1 e B2, denominate M1 e M2, associate alle proteine. E' stato calcolato che, quando le vacche ingeriscono alimenti contaminati da aflatossina B1, la trasformazione nella forma M1 è, 24 ore dopo l'assunzione, in un rapporto compreso tra 0,6 e 0,3% (fattore di conversione compreso tra 170 e 300; occorrono cioè da 170 a 300 ppb di aflatossina B1 nell'alimentazione delle vacche per produrre 24 ore dopo 1 ppb di aflatossina M1 nel latte).

Essendo legate alle proteine, le aflatossine si possono anche nei prodotti lattiero-caseari. Va considerato che nei formaggi è possibile ritrovare, oltre alle aflatossine, altri prodotti tossici elaborati dalle muffe presenti sulla crosta.

Nel fegato, il fattore di conversione delle aflatossine è stato stimato a valori pari a 14000, per il bovino, 800 per il suino e 1200 per il pollo.

L'ocratossina A è stata invece rilevata in mais, frumento, sorgo, avena, riso e caffè ma anche in frutta e suoi succhi, principali veicoli non solo di ocratoossina ma anche di patulina. L'orzo e l'avena, che crescono nei paesi scandinavi ed in particolare in Danimarca, presentano spesso elevati livelli di contaminazione.

Il più alto contenuto di micotossine nei cereali sembra dovuto alle piogge, in particolare durante l'ultima fase di accrescimento e prima della raccolta. Se da un lato le piante possono, grazie a diversi sistemi enzimatici, modificare il contenuto di micotossine, dall'altro sembrano traslocare tale sostanze dal sito di produzione al baccello e al fusto, e quindi alle foglie. Le micotossine si ritrovano pertanto nei foraggi.



### Formazione delle micotossine durante lo stoccaggio

Mentre la sintesi delle micotossine da *Fusarium* (zearalenone, vomitossina, ...) avvengono principalmente durante la fase di coltivazione, quelle da *Aspergillus* e *Penicillium* (aflatossina, ocratoossina) si verificano soprattutto durante lo stoccaggio degli alimenti.

Al contrario di quanto si verifica durante la coltivazione (formazione di aflatossine in paesi tropicali e sub-tropicali), la sintesi delle aflatossine durante lo stoccaggio può avvenire anche nelle zone temperate e più fredde.

Per quanto riguarda i prodotti carnei, è ormai stabilito che applicando basse temperature nella produzione e nella conservazione, il rischio di micotossinogenesi è estremamente limitato; su prosciutti crudi stagionati è

stata messa in evidenza la possibilità di produrre ocratossina da parte di *Aspergillus ochraceus* solo se la temperatura di conservazione raggiungeva i 25-30°C; in tal caso, dopo 21 giorni di mantenimento a questa temperatura, la micotossina era penetrata nella massa carnea fino a mezzo centimetro di profondità, in quantità pari a due terzi della produzione totale della muffa.

Anche per le carni fresche e conservate, è stato messo in evidenza, utilizzando esclusivamente le basse temperature, l'impossibilità per i ceppi fortemente tossinogeni, insemenzati sperimentalmente, di produrre metaboliti tossici, almeno in quantità degne di nota.

Anche la contaminazione delle uova da micotossine è rara; può eventualmente derivare dalla contaminazione dei mangimi utilizzati per l'alimentazione delle galline ovaiole.

In sintesi: le Aflatossine B1, B2, G1, G2 si possono trovare in cereali (mais, frumento, orzo, avena, segale ecc), semi oleaginosi (arachidi, girasole, semi di cotone ecc.), verdura e frutta secca, essiccata e fresca (mandorle, noci, nocciole, fichi secchi, uva, mele, pere, carote, pomodori, ecc.) e spezie (peperoncino, pepe, zenzero, ecc.); le Aflatossine M1 e M2 in latte e derivati (prodotti lattiero - caseari come formaggi, ecc.); l'Ocratossina A in cereali, spezie, cacao, caffè, carni suine e avicole, vino e birra; le Fumonisine e lo Zearalenone nel mais e la Patulina nei succhi di mele, pere, carote, ecc.

| <b>Fattore di conversione in prodotti di origine animale</b> |                        |                |
|--|------------------------|----------------|
| Prodotto   | Fattore di conversione | Aflatossine    |
| Latte  | 170 - 300              | M1, M2         |
| Uova   | 2200                   | B1, B2, G1, G2 |
| Fegato bovino  | 14000                  | B1, B2, G1, G2 |
| Fegato suino   | 800                    | B1, B2, G1, G2 |
| Fegato di pollo  | 2200                   | B1, B2, G1, G2 |

## **Classificazione delle micotossine e tipo di azione lesiva**

Le micotossine, oltre ad essere molto diverse tra loro dal punto di vista chimico, mostrano una notevole gamma di effetti biologici dovuti alla loro capacità di interagire con diversi organi e/o sistemi bersaglio. Per tale ragione, esse sono classificate in:

- immunotossine: Aflatossine, Ocratossine che riducono o inibiscono l'attività del sistema immunitario;
- dermatossine, che causano dermatiti da contatto;
- epatotossine: Aflatossine, Fumonisine;
- nefrotossine: Ocratossine;
- neurotossine: Fumonisine, che causano la morte diretta dei tessuti nervosi nel cervello amplificando la sensibilità di alcuni organi. I segni

clinici sono: tremori, movimenti scoordinati, debolezza di uno o più arti, vertigini e improvviso collasso muscolare. In alcuni casi, si registrano complicazioni quali: diarrea, emorragie del tratto digestivo, ipersalivazione, rifiuto del cibo e cancrena agli arti, alle orecchie e alla coda.

Sulla base del loro effetto cronico vengono invece classificate in:

- mutagene: Aflatossine;
- cancerogene: Aflatossine, Ocratossine, Fumonisine, a livello epatico, renale, polmonare, del sistema urinario e del tratto digestivo;
- teratogene: Ocratossine.

In particolare, le Aflatossine vengono sintetizzate soprattutto dal genere *Aspergillus*, le Fumonisine, lo Zearalenone e Tricoteceni dal genere *Fusarium* e le Ocratossine e le Patuline dal genere *Penicillium*.

La tossicità di tali molecole biologiche è dovuta ad interazioni delle micotossine e loro derivati con DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici e costituenti di membrana.

Gli effetti tossici osservati raramente possono dare origine a fenomeni patologici di tipo acuto ed il rischio maggiore risiede nel loro accumulo che può originare sintomatologie di tipo cronico.

In base ai segni e sintomi riscontrati, le patologie vengono classificate in micotossicosi acute primarie, croniche primarie e croniche secondarie.

Il primo gruppo comprende patologie, talvolta mortali, dovute all'introduzione di micotossine in quantità molto elevate in un periodo di tempo molto limitato.

Al contrario le micotossicosi croniche primarie sono fenomeni meno pericolosi sul breve termine, difficilmente diagnosticabili.

In ogni caso, le micotossine causano seri danni alla salute umana e possono provocare notevoli danni economici negli allevamenti e negli impianti zootecnici dovuti ad un calo nella fasi produttive e riproduttive.

L'impatto delle tossine fungine sulla salute dipende dalla quantità di micotossina assunta con gli alimenti, dalla tossicità del composto, dal peso corporeo dell'individuo, dalla presenza di altre micotossine e da fattori dietetici. Per stabilire un rapporto di causalità tra l'ingestione di micotossine e una specifica malattia umana devono essere soddisfatti alcuni criteri: presenza di micotossine negli alimenti; accertata esposizione alle micotossine; correlazione fra esposizione e incidenza di una determinata malattia; riproducibilità dei caratteristici sintomi negli animali da esperimento; simile modalità di azione nell'uomo e nei modelli animali.

I sintomi e gli effetti delle micotossicosi, ossia le sindromi tossiche derivanti dall'esposizione dell'uomo e degli animali alle micotossine, sono noti da tempo. Nel XIX secolo fu chiarita l'associazione tra ingestione di segale contaminata dagli alcaloidi *Claviceps purpurea* i cui effetti sono una vaso-costrizione che provoca una sindrome cancrenosa e azioni sul sistema nervoso centrale con riduzione dell'attività dei centri vasomotori ed aumento di quelli ipotalamici dai quali derivano allucinazioni e convulsioni; comparsa di ergotismo, una patologia caratterizzata da necrosi degli arti.

Successivamente fu descritta una sintomatologia tossica dell'uomo dovuta all'ingestione di pane ottenuto con frumento infestato da *Fusarium*

graminearium. Negli anni 1942-47, diversi villaggi rurali della Russia furono colpiti dalla leucopenia tossica alimentare (Alimentary Toxic Aleukia, ATA) causata dal consumo di frumento e di miglio contaminati da *Fusarium sporotrichioides* e *F. poae*.

Il duplice aspetto sanitario ed economico delle micotossine fu pienamente rilevato nella sua importanza solo a partire dal 1960, anno in cui in Inghilterra si ebbe la comparsa della malattia X del tacchino (turkey X disease) causata da una partita di farina di arachidi contaminata da una tossina prodotta da *Aspergillus flavus*, l'aflatossina, che provocò la morte di numerosi tacchini, ma anche di anatroccoli, suini e bovini.

### Aflatossine

Le Aflatossine sono prodotte da funghi appartenenti alla classe degli Ascomiceti, genere *Aspergillus* e in particolare da alcuni ceppi di *A. flavus* e da quasi tutti i ceppi di *A. parasiticus*. Hanno basso peso molecolare, alto punto di fusione ed elevata termostabilità. Chimicamente sono dei derivati della cumarina\*<sup>1</sup> e vengono denominate con le sigle B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> (rispettivamente metossi-difuro-cumarone e metossi-difuro-cumaro-lattone, fuse con un anello ciclopentenoico), G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> (loro diidroderivati), M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> (metaboliti idrossilati rispettivamente di B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> che si riscontrano nel latte di lattifere alimentate con mangimi contaminati da aflatossine B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>).

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

La produzione di aflatossine è generalmente la conseguenza di una presenza combinata di specie fungina, substrato e ambiente. Quanto alla specie fungina, la produzione di aflatossine avviene a sviluppo vegetativo ultimato e cioè allo stadio di formazione delle spore; la spora comunque non è aflatossinogena.

I fattori che influiscono sulla produzione di aflatossine possono suddividersi in fisici, nutrizionali e biologici. I fattori fisici includono temperatura, umidità relativa, luce, grado di aerazione e pH.

La temperatura ottimale dipende dal substrato; in mezzo liquido, la temperatura ottimale per *A. flavus* è 25°C, mentre per *A. parasiticus* varia tra 25 e 35°C. La produzione si blocca sotto i 13°C e sopra i 42°C. In generale la temperatura ottimale è compresa nell'intervallo 25-28°C. Un clima caratterizzato da temperatura elevata seguita da brusco calo (giornate calde e notti fredde, temporali) favorisce la produzione di aflatossine, così come in generale qualsiasi fattore di stress, come ad esempio la rottura meccanica delle muffe. La produzione di aflatossine risulta particolarmente abbondante in stagioni con temperature superiori alla media e piovosità inferiore alla media; gli insetti sono da considerare tra i maggiori responsabili della contaminazione sia per la veicolazione delle spore fungine, sia per il danneggiamento alla pianta.

L'umidità relativa ambientale minima per la produzione di aflatossine varia tra l'83% e l'88%. Il grado di aerazione è un fattore importante, visto che sia la crescita fungina che la produzione di aflatossine sono processi aerobi; Un

aumento della concentrazione di anidride carbonica dal 20% al 100% inibisce gradualmente la produzione.

Le quantità maggiori di aflatossine sono prodotte a pH acidi. Valori di pH < 6 favoriscono B1 e B2, valori di pH > 6 favoriscono G1 e G2. Valori massimi di aflatossine si ottengono in un intervallo di pH tamponato tra 5 e 6.

Quanto al substrato su cui crescono le muffe, questo condiziona, talvolta in modo decisivo, la produzione di micotossine. *A. flavus* è aflatossinogeno su arachidi, pistacchi, spezie, frumento, mais, orzo, crusca, semi di soia, semi di cotone, piselli, sorgo e miglio. Non ne produce affatto su riso dalla cui fermentazione con tale micete si ottiene la bevanda sakè e la produzione industriale dell'enzima diastasi. In generale, la produzione di aflatossine è più abbondante su substrati ricchi di carboidrati; infatti, le fonti preferite di carbonio per la biosintesi di aflatossine sono glucosio, saccarosio e fruttosio. Glicina e acido glutammico sono amminoacidi essenziali per la produzione. L'effetto dei minerali è

variabile: zinco e manganese sono essenziali, cadmio e ferro in miscela stimolano la produzione. Numerose sono le sostanze che riducono la produzione di aflatossine: selenite, nitrati, etilene, acido benzoico, ossigeno, azide, derivati epossidici e perossidici, acido sorbico, BHA, solfito di potassio, tracce di metalli pesanti e caffeina.

Le Aflatossine sono essenzialmente delle epatotossine dotate anche di attività cancerogena (1 ppb di aflatossina B<sub>1</sub> nella dieta della trota è sufficiente per causare il cancro del fegato), mutagena e probabilmente teratogena. Il loro ampio spettro d'azione scaturisce dalla peculiare capacità di reagire con gli acidi nucleici e le nucleoproteine cellulari, determinando effetti deleteri sulla sintesi proteica e sull'integrità cellulare. Le Aflatossine sono anche da considerarsi tossine oncogene ed immuno - soppressive poiché riducono sensibilmente le difese immunitarie dell'organismo, alterando il metabolismo degli interferoni coinvolti nelle risposte immunitarie e nelle reazioni anti - infiammatorie. Si è osservato che nei consumatori di stupefacenti ottenuti da piante che veicolano le Aflatossine, l'infezione da virus di epatite B e HIV è più aggressiva.

Tra le Aflatossine, la più tossica è l'Aflatossina B<sub>1</sub>, avente come organo bersaglio il fegato che può essere così colpito da epatocarcinomi e cirrosi epatiche. Essa è altamente tossica per somministrazione acuta in tutte le specie studiate; la dose letale di Aflatossina B<sub>1</sub> per l'uomo oscilla tra 0,6 e 10,0 ppm (ppm=mg/Kg).

Le aflatossine sono assorbite nel tratto gastrointestinale dove vengono o attivate metabolicamente o detossificate nella mucosa intestinale e nel fegato. La biotrasformazione della AFB<sub>1</sub> varia molto da specie a specie ed è largamente influenzata da fattori endogeni ed esogeni. Tale biotrasformazione avviene attraverso processi di epossidazione, ossidrilazione, O-demetilazione, coniugazione e processi non enzimatici. In particolare, l'AFB<sub>1</sub> subisce un'ossidazione, dipendente dal citocromo P-450 che porta sia a vari metaboliti polari ossidrilati, meno tossici ed eliminabili con l'urina, sia all'8,9-eossido<sup>\*2</sup>, elettrofilo instabile e altamente reattivo dal punto di vista biologico che forma addotti covalenti con DNA (soprattutto AFB-N7-guanina), RNA e proteine.

Mentre la formazione di addotti con il DNA è responsabile dell'attività cancerogena, la reazione tra l'eossido e le proteine potrebbe essere responsabile della tossicità acuta di questa tossina.

Nell'uomo c'è un'ampia variazione interindividuale per quanto concerne l'attivazione metabolica dell'aflatossina B<sub>1</sub> e in studi recenti furono trovati addotti al DNA dell'aflatossina B<sub>1</sub> in campioni di placenta umana e cordone ombelicale in Taiwan, un'area che presenta un'alta incidenza di cancro epatico. Un importante meccanismo di detossificazione dell'8,9-eossido dell'AFB<sub>1</sub> è la formazione del suo derivato con il glutatione, mediata dall'enzima glutatione S-transferasi; l'attività di questo enzima varia molto nelle differenti specie animali e questo è attualmente ritenuto il motivo delle enormi differenze di suscettibilità a questa tossina da parte delle varie specie animali studiate. Infatti, l'AFB<sub>1</sub> è altamente epatocancerogena nel ratto, in misura meno apprezzabile in diverse altre specie, inclusi i primati non umani, mentre il topo adulto ne è completamente resistente in quanto produce quantità elevate di GSH S-transferasi che fornisce una via selettiva di detossificazione per l'eossido reattivo.

Elevate quantità fino 10 ppm, somministrati con la dieta, non producono cancro nel topo, mentre nel ratto sono sufficienti dosi di 0,015 ppm per produrre un aumento significativo di epatocarcinoma. Il topo diventa sensibile agli effetti dell'aflatossina B<sub>1</sub> se viene trattato con agenti che riducono i livelli tissutali di GSH; per contro, il trattamento del ratto con agenti capaci di indurre la GSH S-transferasi, come l'etossichina, l'oltipraz (farmaco utilizzato negli anni '80 contro la schistosomiasi) e il fenobarbitale, protegge l'animale dall'azione tossica ed epatocarcinogena dell'aflatossina.

Studi di laboratorio sugli animali hanno dimostrato che la formazione degli addotti aflatossina-DNA e il conseguente tumore al fegato possono essere inibiti dalla somministrazione dell'oltipraz. In Cina è stato avviato un programma di prevenzione dell'epatocarcinoma basato sulla vaccinazione contro l'epatite da virus B e la somministrazione dell'oltipraz. L'enzima GSH S-transferasi è presente nella maggior parte dei tessuti e ha una più alta concentrazione nel fegato, nell'intestino, nel rene, nei testicoli, nel surrene e nei polmoni. Ha una localizzazione prevalentemente citoplasmatica (>95%) e solo in piccola misura è localizzato nel reticolo endoplasmatico. I suoi substrati hanno in comune le caratteristiche di essere molecole idrofobiche, di contenere un atomo elettrofilo e di essere in grado di reagire efficacemente con il GSH (tripeptide costituito da glicina, cisteina e acido glutammico). La coniugazione con il GSH è un processo di detossificazione importante, in quanto i substrati elettrofili che vengono neutralizzati per combinazione con esso sono specie tossiche capaci di legare molecole nucleofile come le proteine e gli acidi nucleici, causando così mutazioni e altri danni cellulari. È stato visto che le cellule epatiche umane in coltura esposte all'azione dell'aflatossina presentano un danno a carico del gene soppressore p53 e diversi studi sul cancro del fegato umano hanno dimostrato anche che il gene soppressore p53 è più frequentemente mutato in quelle aree dove maggiore è l'esposizione all'azione dell'aflatossina.

L'AFB<sub>1</sub> e i relativi derivati potrebbero essere responsabili di neoplasie epatiche e di epatiti tossiche riscontrate in varie parti dell'Africa e dell'estremo Oriente.

Sia l'etanolo sia l'infezione da HBV potenziano l'azione epatotossica e epatocarcinogena. A tal proposito c'è da dire anche che l'aflatossina acuta, accompagnata da infezione cronica HBV, sarebbe la leva che converte il danno al fegato dovuto all'HBV in carcinoma epatocellulare (ciò è confermato da studi epidemiologici).

Per quanto riguarda l'etanolo, il meccanismo più probabile sembra essere l'induzione del citocromo P450; il che porta a un'aumentata produzione di metabolici reattivi.

Altro enzima in grado di catalizzare la trasformazione dell'AFB<sub>1</sub> nell'8,9-epossido è la prostaglandina H-sintasi (PHS). Nel ratto l'AFB può anche causare neoplasie delle papille renali. A tale livello il contenuto del citocromo P450 è estremamente basso, mentre vi sono quantità alquanto elevate di PHS che si ritiene dunque possa avere un ruolo negli effetti nefrotumorigeni delle aflatossine.

Per quanto riguarda l'escrezione dell'AFB<sub>1</sub>, una frazione della tossina viene eliminata attraverso il tratto intestinale, ma le principali vie di escrezione sono rappresentate da quella biliare (in forma di AFB<sub>1</sub>-glutazione) e urinaria (come aflatossina M<sub>1</sub> e aflatossina B<sub>1</sub>-N7-guanina). Anche il latte è una via di escrezione dell'AFB<sub>1</sub> (come AFM<sub>1</sub>), costituendo in tal modo a causa della rilevante tossicità di questo metabolita una potenziale fonte di assunzione per i giovani organismi durante la fase della lattazione.

Le aflatossicosi possono manifestarsi sia come malattie acute con improvviso decesso dei soggetti più colpiti, sia come malattie croniche. Casi di aflatossicosi sono tuttora ricorrenti in allevamenti di specie aviarie, suini, bovini, conigli, cani, pesci e animali da pelliccia.

Comunque, in considerazione delle concentrazioni di aflatossine che normalmente si ritrovano nei mangimi, appare evidente che le aflatossicosi sub-acute, anche se meno drammatiche che quelle acute, sono molto più diffuse e economicamente più importanti.

I quadri clinici dipendono dall'età dell'animale, dal sesso, dallo stato di salute generale, dalla dose e dal tempo di esposizione alla micotossina.

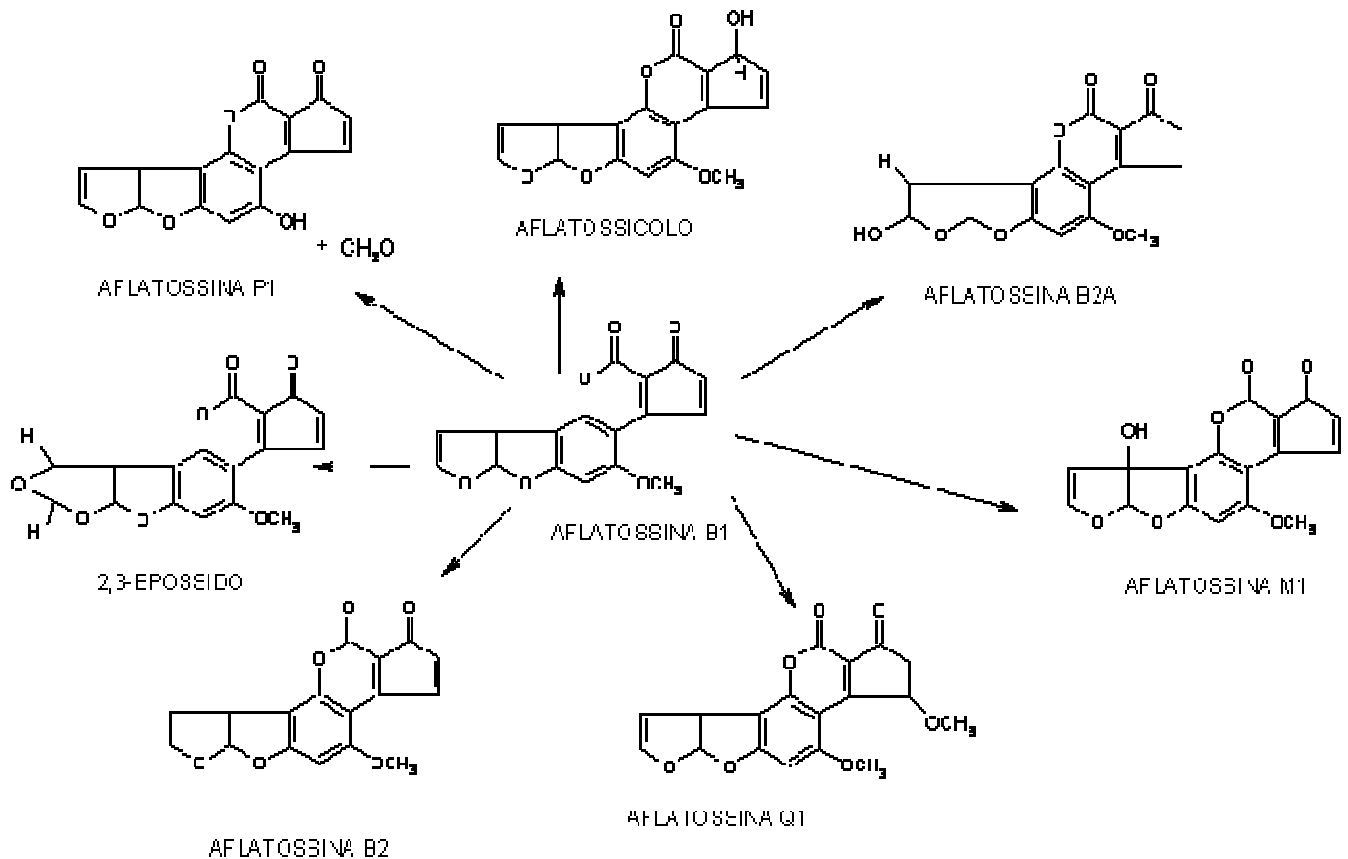
Gli animali più giovani sono sempre molto più colpiti rispetto agli adulti e i mammiferi poligastrici sono nell'insieme più resistenti dei monogastrici (per l'azione detossicante operata da batteri e protozoi). I segni dell'intossicazione da aflatossina sono stati studiati sia dopo intossicazione naturale sia in esperimenti di laboratorio. L'intossicazione acuta in genere si manifesta con grave apatia, perdita dell'appetito, febbre più o meno elevata e morte dell'animale in tempi varianti a seconda della sensibilità specifica. Generalmente, il fegato appare pallido, aumentato di volume con necrosi del parenchima. I reni possono presentare delle lesioni da glomerulonefrite, mentre a livello polmonare si osservano fenomeni congestizi.

I danni legati all'intossicazione cronica sono di tutt'altro ordine. I segni più visibili consistono in inappetenza, rallentamento della crescita accompagnato da perdita di peso; ma è il fegato che risente maggiormente dell'attività tossica: esso risulta congestionato e presenta delle zone emorragiche e necrotiche e, quando l'intossicazione è prolungata, si manifestano processi cancerogeni. I reni sono congestionati e occasionalmente si può osservare enterite emorragica. Inoltre, compaiono stato depressivo e disturbi nervosi,

quali incoordinazione motoria, perdita di equilibrio e spasmi muscolari. Si può inoltre verificare la morte embrionale, l'inibizione ormonale e aborti spontanei in animali gravidi.

La detossificazione delle Aflatossine può avvenire per coniugazione delle stesse con acido o solfato glucuronico ed eliminazione attraverso le feci.

I metodi più frequentemente utilizzati per l'analisi delle aflatossine sono l'HPLC, l'ELISA e la TLC (Thin Layer Chromatography = Cromatografia su Strato Sottile)



### Zearalenone

Gli zearalenoni sono micotossine prodotte da specie tossinogene del genere *Fusarium*, in particolare da *F. graminearum*, da *F. culmorum*, e da *F. equiseti*. Il composto che riveste la maggiore importanza micotossicologica è lo Zearalenone o gli Zearalenoli (isomeri alfa e beta), che a volte si ritrova assieme allo Zearalenolo. Lo Zearalenone è un lattone dell'acido resorcilico non dotato di tossicità acuta che, negli animali, a concentrazioni inferiori a un ppm, determina uno sconvolgimento delle attività ormonali legate alla riproduzione con conseguente ipofertilità e iperestrismo (ovulazione prolungata) e, a concentrazioni superiori può causare problemi al concepimento, dovuti ad un mancato impianto dell'ovulo e conseguente sviluppo fetale. Gli Zearalenoni quindi, andrebbero meglio considerati come sostanze ormonali dotate di attività anabolica e utero trofica anziché come micotossine. Lo Zearalenone è spesso associato al Deossinevalenone che ne potenzia l'azione.

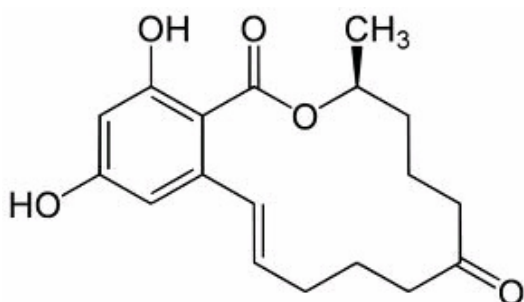
Nell'uomo, gli zearalenoni non sono considerate sostanze teratogene ma rappresentano certamente delle genotossine. Il loro meccanismo d'azione è

sempre di tipo ormone-simile; alterano in maniera sensibile il ciclo riproduttivo con fenomeni di ipofertilità ed iperestrisimo. Il loro bersaglio è rappresentato dai recettori proteici citosolici degli ormoni estrogenici.

Si osservano, inoltre, delle pseudo-gravidanze e diminuzione della libido. Sono stati accertati, nella zona di Porto Rico, numerosi casi di pubertà precoce causati da una costante somministrazione attraverso alimenti contaminati con Zearalenone a bassi livelli.

E' stata accertata, infine, la correlazione tra la presenza degli zearalenoni e l'elevata incidenza di cancro cervicale.

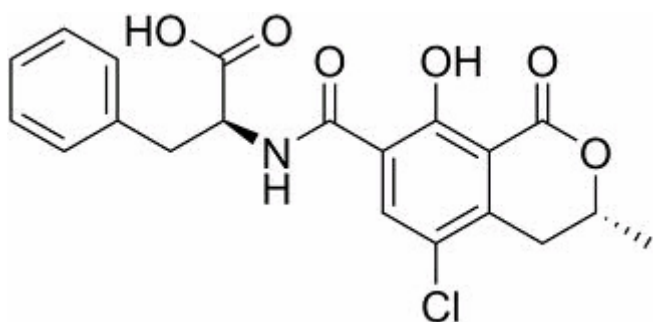
I prodotti soggetti a contenere Zearalenone sono essenzialmente i cereali (cariossidi, sfarinati, mangimi, alimenti) ed in modo particolare il mais. Anche in Italia, è possibile trovare Zearalenone non solo nelle spighe di mais infette. Gli isolati fitopatogeni possono iniziare la loro attività tossinogena nelle colture cerealicole infette (Mais, Frumento, Sorgo, Orzo, Avena) e continuarla durante la raccolta e nei prodotti conservati 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.



*Zearalenone*

### Ocratossina

Le ocratossine sono un gruppo di metaboliti strutturalmente simili, prodotti da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, in particolare da *A. ochraceus* e da *P. viridicatum*. Quelle attualmente conosciute sono l'ocratossina A (OA) e la B (OB) e delle due quella più tossica è la "A". Dal punto di vista chimico l'OA è costituita da un derivato cumarinico legato alla fenilalanina, mentre l'OB consiste nell'analogo senza un atomo di cloro.



*Ocratossina A*

La biotrasformazione dell'OA è dipendente dal citocromo P450 sia nell'uomo sia negli animali e porta alla formazione di intermedi metabolicamente attivi probabilmente responsabili dell'azione cancerogena e di altri effetti tossici. Il suo assorbimento avviene nel tratto gastrointestinale e, attraverso la circolazione entero-epatica, può essere escreta e riassorbita.

Nel sangue l'OA 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 translazione mediante il blocco della fenilalanina RNA sintetasi.

Il principale organo bersaglio dell'OA 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).

Nei ratti la somministrazione ripetuta di piccole dosi di Ocratossina produce lesioni del tubulo prossimale che comportano proteinuria, glicosuria, chetonuria, poliuria e riduzione del trasporto tubulare prossimale di ioni organici.

La somministrazione di una singola forte dose provoca una diarrea grave e la morte dell'animale, con gli ovvi effetti sul rene. Le stesse alterazioni si osservano anche in altre specie animali.

Nel maiale ricorre con carattere endemico in Danimarca e in Scandinavia una malattia renale, nota come nefropatia micotossica dei suini che è stata anche recentemente segnalata in altri nove paesi. Tale malattia, associata all'impiego di mangimi contaminati da OA, sia per gli aspetti tossicologici, sia per quelli epidemiologici, ha molte analogie con una malattia renale dell'uomo, nota come nefropatia balcanica (balkan endemic nephropaty o BEN) che colpisce con carattere endemico alcune popolazioni rurali della Bulgaria, della Romania e della ex Iugoslavia.

La BEN è una nefropatia bilaterale cronica non infiammatoria che si manifesta dopo circa 15 anni di permanenza in una delle regioni endemiche ed è caratterizzata da disfunzioni tubulari prossimali con proteinuria e lenta progressione verso l'insufficienza renale.

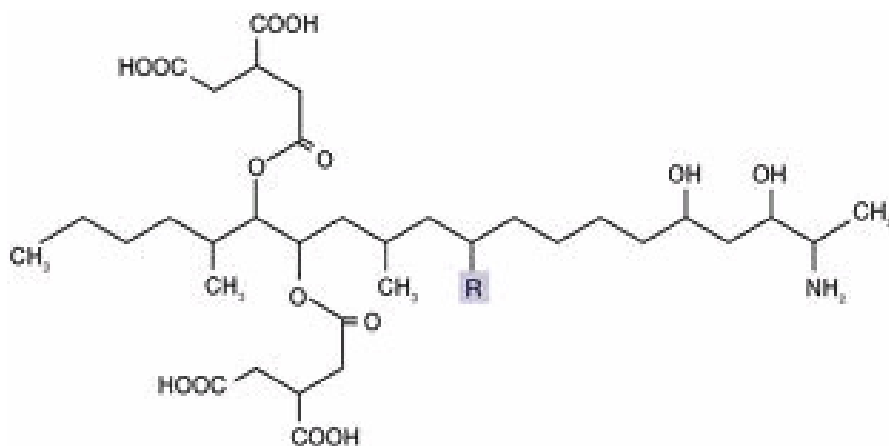
Dal punto di vista anatomopatologico i reni si presentano ridotti di peso e di grandezza e con una diffusa fibrosi corticale. Nelle aree endemiche la nefropatia si associa a una maggiore frequenza di tumori del tratto urinario e, anche se non vi sono prove dirette, si ha ragione di ritenere che la suddetta malattia renale sia legata al consumo di prodotti zootecnici provenienti dagli allevamenti contaminati. Oltre all'azione nefrotossica è riportata per questa tossina un'azione teratogena e immunosoppressiva. Alte concentrazioni di alimenti contenenti Ocratossina A possono causare danni al fegato, necrosi ed emorragie intestinali.

Tra i prodotti che con più frequenza vengono trovati contaminati vi sono l'orzo, il sorgo, il mais, diversi legumi, il caffè crudo in grani (la tostatura denatura le Ocratossine) e vari prodotti da forno; ma più preoccupante è la presenza di OA nei mangimi.

I principali metodi di analisi utilizzati per la rivelazione dell'OA sono l'HPLC con rivelazione fluorimetrica, la TLC e l'ELISA.

### Fumonisina

Le fumonisine sono un gruppo di sostanze strutturalmente correlate prodotte principalmente dalla specie *Fusarium moniliforme* e *F. proliferatum*, sebbene anche altre specie ne siano potenzialmente produttrici. Chimicamente le fumonisine sono diesteri dell'acido tricarballylico e polialcoli e, pertanto, caratterizzati da una struttura molto simile a quella della sfingosina precursore chimico di tutti gli sfingolipidi (sfingomieline, ceramidi e gangliosidi) che esplica un importante ruolo in numerose funzioni cellulari, a livello di crescita, di differenziazione cellulare e di trasmissione degli impulsi nel sistema nervoso.



Anche le fumonisine, come la gran parte delle altre micotossine, sono dotate di una non trascurabile termostabilità. Infatti, la distruzione della struttura molecolare può ottenersi solo a seguito di esposizione termica a temperature non inferiori a 220 °C.

La fumonisina B<sub>1</sub> inibisce un enzima chiave del metabolismo degli sfingolipidi noto come N-acil-transferasi che è implicato nella conversione della sfingosina e sfingamina a ceramidi che vengono successivamente trasformati a sfingolipidi complessi.

La potente azione inibente delle fumonisine sulla sintesi degli sfingolipidi sembra essere alla base degli effetti tossici provocati da queste sostanze e della loro attività cancerogena per perdita da parte della sfingosina della funzione di agente antitumorale endogeno.

Gli studi condotti su queste micotossine hanno evidenziato una tossicità molto differente nelle diverse specie animali. Negli equini sono responsabili della comparsa di una sindrome neurotossica nota come leucoencefalomalacia, malattia risultante in una necrosi liquefattiva della materia bianca del cervello che si manifesta con sonnolenza, paralisi facciale e cecità.

Le fumonisine sono anche epatotossiche, come dimostrato dalle epatosi acute e dal carcinoma epatocellulare indotti nei ratti a seguito della somministrazione di queste tossine.

Sempre nei ratti esse esplicano anche azione nefrotossica con la comparsa di diverse alterazioni quali l'interruzione della membrana basocellulare, rigonfiamento mitocondriale e comparsa di cellule con citoplasma opaco. Inoltre danneggiano il sistema immunitario e nelle anatre e nei suini provocano edema polmonare. Alcuni studi hanno evidenziato un'azione tossica della Fumonisina B<sub>1</sub> a livello del muscolo cardiaco e, in particolari prove sperimentali effettuate sulla rana, hanno evidenziato un blocco nel flusso degli ioni calcio, con conseguente arresto dell'attività cardiaca.

Anche per l'uomo ci sono indizi di cancerogenicità; in particolare, il consumo di cereali contaminati da Fumonisina potrebbe essere all'origine di un'elevata incidenza di cancro all'esofago in certe zone del Sud-Africa, della Cina e nel nord - est d'Italia, come in Friuli, a seguito del consumo di grandi quantità di mais infetto contenuto nella polenta.

### Tricoteceni (Deossinivalenolo)

I tricoteceni sono un gruppo costituito da prodotti da diversi generi fungini, tra cui il genere *Fusarium*. I funghi produttori di tricoteceni sono di due tipi: tipo A e tipo B. Quelli del tipo A sono tipici di climi nordici e crescono soprattutto in campo, mentre le tossine del tipo B oltre che in campo possono essere prodotte anche durante lo stoccaggio, poiché *F. graminearum* e *F. culmorum* continuano la loro attività anche dopo la raccolta, a patto che l'umidità resti superiore al 20-22%.

I tricoteceni sono tutti altamente tossici a livelli subcellulare, cellulare e degli organi; strutturalmente sono dei composti contenenti funzioni idrossiliche OH, polari e solubili in solventi organici polari. Queste caratteristiche dei tricoteceni giustificano la loro facilità di penetrazione attraverso le membrane lipidiche e le loro interazioni con DNA, RNA ed organuli subcellulari. Il loro meccanismo d'azione si basa sull'inibizione della sintesi proteica che può avvenire o nella fase di iniziazione o in quella di allungamento - terminazione. I tricoteceni possono interferire con i processi di sintesi proteica perché interagiscono con la subunità 60s dei ribosomi eucariotici. Dei tricoteceni, quattro sono rinvenuti frequentemente negli alimenti: tossina T-2, vomitossina o deossinivalenolo, diacetossi scirpenolo e nivalenolo. I tricoteceni possono indurre, negli animali, numerosi effetti tra cui dermatiti, leucopenia, emorragie, vomito, disturbi nervosi.

Il Deossinivalenolo, che in ragione dei suoi effetti sul bestiame (inappetenza e scarsa ritenzione del cibo) è conosciuto anche come Vomitossina, si presenta come una tra le più recenti micotossine isolate nelle farine, insilati, granaglie in generale.

Il primo episodio ampiamente documentato, risale al 1994-95 nel Maryland ove questa micotossina è stata isolata e riconosciuta nel mais dolce destinato all'alimentazione umana, durante le fasi di confezionamento.

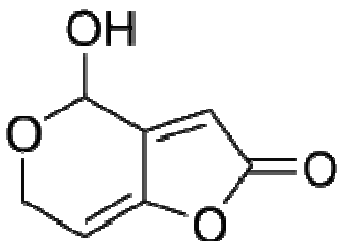
Successivi episodi di carcinoma esofageo si sono registrati anche in Asia, in Africa ed in altre parti del mondo. Clinicamente l'intossicazione è caratterizzata

in generale da vomito, irritazioni cutanee particolarmente evidenti nel suino, lesioni emorragiche, modificazione patologiche degli organi emopoietici, depressione immunitaria.

Nel suino, in particolare, si possono osservare: rifiuto dell'alimento, perdita di peso corporeo. Se l'alimento consumato contiene anche lo Zearalenone (ed è piuttosto frequente), esso diventa responsabile di problemi alla sfera riproduttiva, anche perché la vomitossina, se presente anche a dosi subcliniche senza effetti tossicologici evidenti, potenzia l'azione dello zearalenone. Nel bovino, la vomitossina crea normalmente pochi problemi.

Nell'uomo, la vomitossina è un contaminante soprattutto di cariossidi di riso e di frumento nonché di prodotti di seconda trasformazione quali i fiocchi di avena e di riso, destinati all'alimentazione dei bambini. La leucopenia tossica alimentare è una micotossicosi che ha colpito più volte le popolazioni della Russia Orientale, comportando una progressiva riduzione dei leucociti nel sangue.

### Patulina



La Patulina è prodotta da funghi dei generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochlamys*. È stata rinvenuta in numerosi alimenti ma le principali fonti alimentari sono le mele ed loro derivati. La patulina viene inattivata durante la fermentazione alcolica, pertanto un prodotto come il sidro ne è virtualmente esente, essa è relativamente termostabile, particolarmente a bassi pH.

Trattamenti ad alta temperatura hanno infatti determinato riduzioni di questa micotossina non superiori al 20%. La patulina è dotata di proprietà antibiotiche ed è riconosciuta come genotossica, mentre non vi è accordo sulla sua possibile carcinogenicità. Può causare, tuttavia, emorragie cerebrali, gastriche e polmonari.

### Nuove micotossine

Al momento, in aggiunta alle micotossine, sono state scoperte altre tossine fungine per le quali si hanno sospetti di tossicità come ad esempio la sterigmatocistina. Tale tossina condivide con le aflatossine l'organo bersaglio (il fegato) ed il fatto che il micete produttore sia un *Aspergillo* (*A. flavus*, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. rugulosus*), altre analogie sono poi presenti a livello di struttura chimica. Questa micotossina è stata rinvenuta in cereali e in formaggi ed è da considerarsi come possibile carcinogeno epatico. La citrinina è una molecola nefrotossica sintetizzata sia da *Penicillium* spp. che da *Aspergillus* spp. ed è un contaminante dei cereali, riso in particolare. Viene spesso rinvenuta associata all'OTA, non è considerata cancerogena ma è sospettata di provocare nefropatie. La rubratossina B è una molecola prodotta da *Penicillium rubrum* e *P. purpurogenum*. Ad essa è riconosciuta un'azione prevalentemente epatotossica, ma si è mostrata in grado di ridurre l'attività del sistema immunitario. I cereali sono la principale fonte di introduzione di questi tossici nella catena alimentare.

## **Prevenzione e trattamenti di bonifica (detossificazione)**

La contaminazione da micotossine è possibile sia in modo diretto, mediante attacco di piante di cereali e altre derrate alimentari ad opera delle muffe responsabili della produzione di tali tossine, oppure in modo indiretto, mediante ingestione di foraggio e carni contaminate che, durante i processi digestivi, vengono metabolizzate dall'organismo umano. È di fondamentale importanza, pertanto, porgere particolare attenzione ad alcuni aspetti del sistema agro – zootecnico e alle pratiche colturali, tra cui:

- la scelta di ibridi di mais potenzialmente meno attaccabili dai funghi;
- costante monitoraggio delle condizioni meteorologiche dell'annata agraria per ridurre al minimo lo stress idrico delle colture, condizione ideale di sviluppo delle specie fungine tossinogene (Aflatossine e Fumonisine sono favorite da un clima molto caldo e secco, Tricoteceni e Zearalenone da clima fresco e umido);
- modifica e miglioramento dei sistemi di irrigazione;
- creazione, in campo, di condizioni sfavorevoli all'infezione fungina (eliminazione delle specie di piante infestanti, interrimento dei residui di raccolta, lotta ai parassiti che ledono le derrate facilitando la contaminazione da tossine e buona concimazione);
- pianificare i periodi di raccolta, evitando climi umidi o comunque favorevoli allo sviluppo delle tossine;
- evitare la rottura delle cariossidi con i macchinari e lo stoccaggio di granella ancora umida, essiccandola rapidamente.

Rientrano invece nei diversi processi di detossificazione fisica:

- calore secco e umido (cottura in forno, autoclave, arrostitimento, torrefazione, friggitura);
- irraggiamento solare e con microonde;

Meccanismi di detossificazione chimica:

- Acqua ossigenata ( succhi di frutti, brodi proteici, latte);
- Idrossido di calcio;
- Aldeide formica;
- Etere metilico.

## **Glossario**

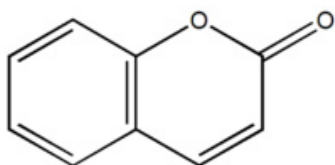
### Furanocumarine

\*1 Le furanocumarine, o furocumarine, sono una classe di sostanze organiche naturali. La struttura chimica delle furanocumarine consiste di un anello furanico fuso con una cumarina. L'anello furanico può essere fuso alla cumarina in due modi principali, dando luogo a due classi di isomeri, le furanocumarine lineari (capostipite psoralene) e le furanocumarine angolari (capostipite angelicina).

Molte furanocumarine sono tossiche e fotomutagene e sono prodotte dalle piante principalmente come meccanismo di difesa dai predatori.

Le furanocumarine associate a raggi UVA stimolano infatti la melanogenesi ed hanno effetti antiproliferativi.

### Cumarina



La cumarina (nome IUPAC: *1-benzopirano-2-one*) è un composto aromatico. A temperatura ambiente si presenta in forma di cristalli incolori, dall'odore caratteristico.

È la capostipite di una classe di composti derivati - detti cumarine - che hanno in comune la struttura benzopiranic della cumarina.

Le cumarine idrossilate in posizione 4, come il dicumarolo, presentano una forte azione anticoagulante solo se utilizzati per via endovenosa; sono infatti degradati dai processi digestivi in composti sicuri. Le cumarine normali (non idrossilate in tale posizione) non presentano tale attività, o solo in misura minore.

### Epossido

\*2Un epossido è un etere (legame tra 2 gruppi alcolici) ciclico in cui l'ossigeno è uno degli atomi di un anello a tre termini. Vengono classificati come eteri, ma a differenza di essi presentano una reattività del tutto eccezionale e delle sintesi differenti.

La reattività degli epossidi è causata dalla tensione angolare dell'anello a tre termini. Infatti l'ibridazione  $sp^3$  presuppone angoli di legame di  $109^\circ$ , contro i  $60^\circ$  formati dagli epossidi. Questo porta ad una facile apertura dell'anello.

### Carcinogeni chimici

I carcinogeni chimici possono essere divisi in due gruppi: carcinogeni primari (reagiscono direttamente con il DNA); carcinogeni secondari (hanno prima bisogno di essere attivati). L'attivazione dei carcinogeni secondari può avvenire spontaneamente o essere mediata da un catalizzatore enzimatico.

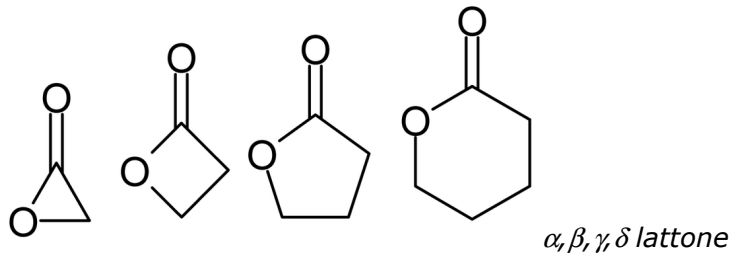
In particolare, è stato dimostrato che il citocromo P 450, nonostante sia coinvolto in numerosi processi di detossificazione, è in grado di attivare anche processi radicalici su una molecola non tossica rendendola dunque propensa ad avviare il processo di carcinogenesi. Un carcinogeno, tuttavia, può subire anche una inattivazione con conseguente escrezione.

### Tecnica di rilevamento di micotossine: ELISA

1. Anticorpi (monoclonali o policlonali) adsorbiti sulla superficie del pozzetto;
2. Aggiunta del coniugato antigene - enzima e competizione con l'antigene in soluzione (campione reale);
3. Risultato della reazione di competizione

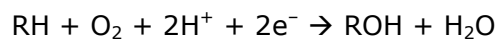
### Lattone

I lattoni sono una tipologia di composti chimici la cui struttura è costituita da un estere ciclico. Essi sono ottenuti tramite condensazione quando un alcol ed un acido carbossilico, entrambi presenti nella medesima molecola, reagiscono fra loro. I prefissi nei nomi dei diversi lattoni possono indicare la dimensione dell'anello:  $\beta$ -lattoni (anello a 4 unità),  $\gamma$ -lattoni (anello a 5 unità),  $\delta$ -lattoni (anello a 6 unità),  $\epsilon$ -lattoni (anello a 7 unità), ecc...



## Citocromo P450

La famiglia del citocromo P450 è una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutti i domini dei viventi, appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista. I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su una 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:



Il citocromo P450 deriva il suo nome dal caratteristico picco di assorbimento massimo ad una lunghezza d'onda di 450nm, quando il ferro del gruppo eme si trova nello stato ridotto  $\text{Fe}^{2+}$  e legato al monossido di carbonio.

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.

Meccanismo di reazione:

1. legame del substrato al citocromo P450;
2. riduzione dell'atomo di ferro del gruppo eme con elettroni forniti da NADH o NADP(H);
3. legame dell'ossigeno molecolare al citocromo;
4. trasferimento di un secondo elettrone;
5. formazione di una molecola d'acqua;
6. catalisi della specifica reazione.

1: Il substrato si lega al sito attivo dell'enzima, nelle vicinanze del gruppo eme, sul lato opposto della catena peptidica. Il substrato legato induce un cambiamento nella conformazione del sito attivo, spesso eliminando una molecola d'acqua e talvolta cambiando lo stato del ferro eme da fondamentale ad eccitato. Questo causa un cambiamento nelle proprietà spettrali dell'enzima, con un aumento dell'assorbanza a 390nm e una diminuzione a 420nm. Tale variazione può essere misurata dalla spettrometria. Se non ci sono equivalenti riducenti a disposizione, questo complesso può rimanere stabile, permettendo di stabilire il grado di legame da misure di assorbimento "in vitro".