

SVILUPPO DI UN NUOVO SISTEMA IMMUNOELETTROCHIMICO PER LA DETERMINAZIONE DEL DEOSSINIVALENOLO

Daniela Romanazzo, Silvia Vesco, Giulia Volpe, Francesco Ricci, Danila Moscone, Giuseppe Palleschi
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

Introduzione

Il Deossinivalenolo o DON appartiene alla famiglia dei sesquiterpenoidi detti Tricoteceni, metaboliti secondari prodotti da funghi del genere *Fusarium*. La maggior parte delle materie prime vegetali è suscettibile di contaminazione da parte di queste tossine e la loro presenza nei prodotti agricoli continua ad essere un problema mondiale a causa dell'azione tossica esercitata sull'uomo e sugli animali. I numerosi Tricoteceni conosciuti sono stati suddivisi in quattro gruppi principali in funzione della loro struttura chimica, tra questi i Tricoteceni di tipo-A (in particolare T-2 e HT-2) e di tipo-B (in particolare DON e Nivalenolo) rappresentano quelli più frequentemente rinvenuti nei prodotti agricoli quali farine, insilati, grano, granturco (1).

L'assunzione di bassi livelli di Deossinivalenolo provoca nell'uomo nausea, vomito, dissenteria e immunosoppressione, il DON viene infatti anche detto vomitossina; l'assunzione di più alti livelli può provocare immunosoppressione.

Il DON è stabile fino a 120°C e non si decompone in condizioni debolmente acide (2), è solubile in acqua e in solventi polari quindi in miscele di acqua e metanolo e acqua e acetonitrile. Inoltre queste caratteristiche di solubilità e polarità giustificano la facilità di tali tossine a penetrare le membrane cellulari e la loro successiva interazione con DNA, RNA e organuli subcellulari. La Commissione delle Comunità Europee ha definito i tenori massimi di talune *Fusarium*-tossine contaminanti presenti nelle derrate alimentari rappresentate principalmente da prodotti a base di cereali quali grano e granturco, come riportato in Tabella 1 (3).

Tabella 1. Deossinivalenolo: tenori massimi pubblicati nel Reg. CE 1126/2007

Matrice	Tenore massimo µg/kg
Cereali non trasformati diversi da grano duro, avena e granturco	1250
Grano duro e avena non trasformati	1750
Granturco non trasformato	1750
Cereali destinati al consumo umano diretto, farina di cereali (compresa la farina di granturco, la semola di granturco e il granturco grits, crusca come prodotto finito commercializzato per il consumo umano diretto)	750
Pasta	750
Pane (compresi piccoli prodotti da forno), prodotti della pasticceria, biscotteria, merende a base di cereali e cereali da colazione	500
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	200

È fortemente sentita da parte delle industrie alimentari la necessità di disporre di metodi semplici, rapidi e affidabili per accertare la presenza di queste tossine nei prodotti alimentari, e per soddisfare tali esigenze sono in via di sviluppo molti metodi di screening per rivelare i più rappresentativi Tricoteceni (4). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di sviluppare un nuovo metodo di screening per la rivelazione del Deossinivalenolo in matrici alimentari a base di cereali; il sistema è rappresentato da un sensore immunomagnetico enzimatico elettrochimico.

Materiali e metodi

Il saggio immunomagnetico enzimatico elettrochimico ELIME (*Enzyme Linked ImmunoMagnetic Electrochemical assay*) utilizza il format del classico saggio *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ma è finalizzato ad elevarne l'efficienza. A tale scopo l'immobilizzazione dei bioreagenti è eseguita su micropalline magnetiche (IMB). Le microparticelle immunomagnetiche sono particelle superparamagnetiche costituite da una dispersione di ossidi di ferro ricoperta da un sottile guscio polimerico utile per l'immobilizzazione di una grande varietà di molecole, per questo lavoro sono state scelte particelle magnetiche tosilattivate. Gli *step* immunologici si susseguono in microtubi di poliestere e al termine di ogni *step* i microtubi vengono inseriti in un apposito concentratore magnetico che trattiene le microparticelle sulle parete interna del tubo; in questo modo si possono alternare nei tubi le soluzioni contenenti i diversi bioreagenti lasciando indisturbate le microparticelle magnetiche. I principali *step* immunologici sono i seguenti: il *coating*, al termine del quale le microparticelle magnetiche si troveranno legate a numerose molecole di DON; il bloccaggio, utile ad evitare legami aspecifici tra le microparticelle e i bioreagenti delle fasi successive al *coating*; la competizione, in cui le microparticelle legate a molecole di DON e bloccate vengono incubate con una soluzione contenente un'adeguata diluizione di anticorpo anti-DON (in difetto) e il DON da dosare (presente nel campione o negli standard) che competerà con quello legato alla superficie per i limitati siti anticorpali. L'anticorpo utilizzato nell'analisi è costituito da un frammento Fab (*Antigen Binding Fragments*) specifico per il DON coniugato con una molecola di biotina. L'ultimo *step* è il *labelling*, in cui le microparticelle a cui è legata la catena antigene-Fab-biotina vengono incubate con un complesso molecolare avidina-n(biotina-HRP) allo scopo di legare il Fab-biotina non ad una ma a numerose molecole di enzima perossidasi (HRP).

Al termine di tutti gli *step* immunologici, le particelle immunomagnetiche vengono concentrate sulla superficie dell'elettrodo di lavoro di un elettrodo *screen printed* (SPE) "usa e getta" grazie all'aiuto di un piccolo magnete fissato sotto la sua superficie. Instaurato il contatto elettrico tra l'SPE e il rivelatore di segnale (potenziostato da banco o portatile tipo PalmSens) si misura, con tecnica cronoamperometrica, la corrente generata (potenziale applicato costante di $-0,1$ V) dalla riduzione all'elettrodo di lavoro del prodotto della reazione enzimatica tra HRP e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) ridotta in presenza di H_2O_2 (5). L'intensità di tale corrente è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene.

Il saggio ELIME sfrutta la selettività degli anticorpi, la sensibilità della rivelazione elettrochimica, la maneggevolezza degli elettrodi screen printed e la possibilità di concentrare le particelle magnetiche sulla superficie di un elettrodo di lavoro. Lo schema che descrive l'immunosensore è riportato in Figura 1.

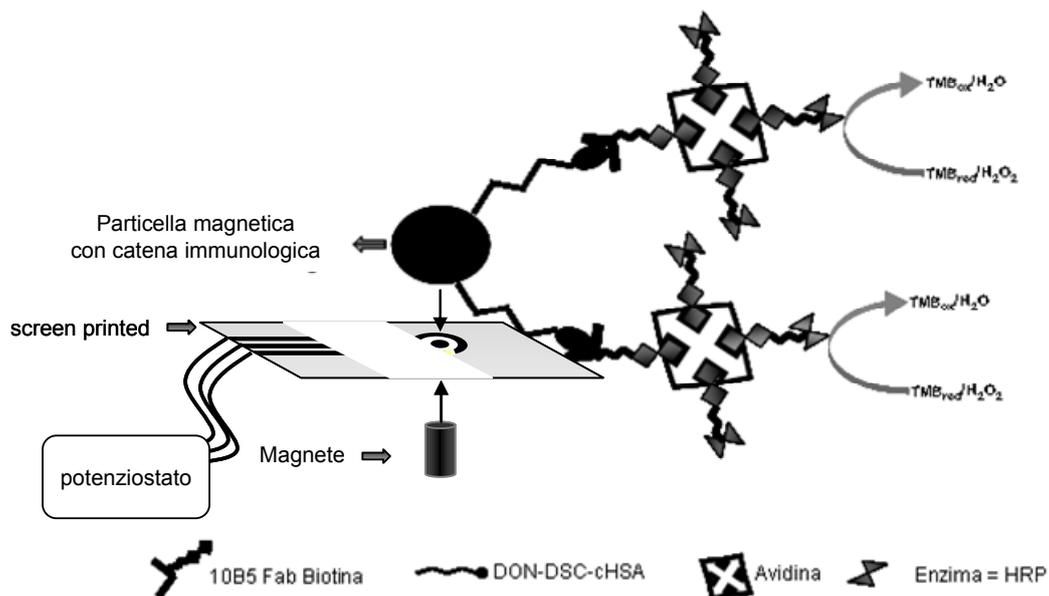


Figura 1. Schema di un saggio competitivo indiretto con l'uso di particelle immunomagnetiche

Saggio ELIME preliminare

Il saggio competitivo definitivo (di cui in Figura 2 si riporta la curva di taratura), in presenza dell'antigene da dosare presente negli standard, è stato eseguito in funzione dei risultati acquisiti nelle prove di ottimizzazione: prove di *binding* antigene-anticorpo hanno permesso di controllare e confermare l'attività dell'anticorpo anti-DON e di scegliere la migliore diluizione di anticorpo da impiegare nel saggio competitivo, risultata di 1:10000 v:v da una soluzione madre di 1 mg/mL. La concentrazione di DON-HSA legato sulle micropalline magnetiche è minore di quella suggerita nel protocollo generale della ditta che le commercializza e corrisponde a 375 µg/mL, dato che il legame tra anticorpo e antigene libero da dosare risulta ovviamente ostacolato da alte concentrazioni di antigene legato che compete.

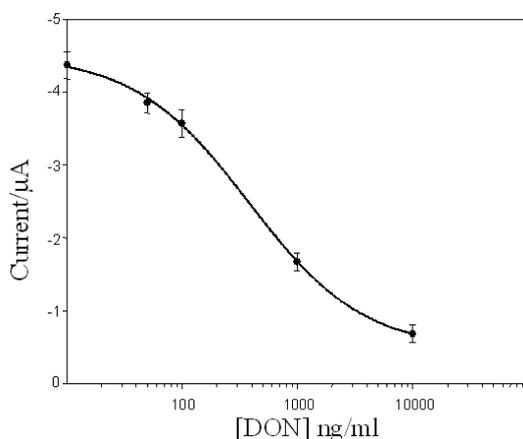


Figura 2. Curva di taratura del saggio competitivo indiretto ELIME

I parametri analitici dell'immunosensore elettrochimico per il DON ottenuti dall'equazione logistica a quattro parametri riferiti alla curva mostrata in Figura 2 sono: LOD = 63 ng/mL, *Median Effective Concentration* (EC_{50}) = 380 ng/mL, intervallo di lavoro = (100-4500) ng/mL, tempo totale di analisi = circa 1 ora e 30 minuti.

Studio dell'effetto matrice

All'ottimizzazione del saggio ELIME in tampone segue lo studio delle possibili interferenze dovute alla matrice alimentare: a tale scopo si mostreranno i risultati ottenuti con campioni di cereali da colazione e con campioni di alimenti per l'infanzia a base di cereali. Al fine di ottenere risultati ottimali, sono state valutate diverse procedure estrattive che sfruttano le caratteristiche di polarità del DON: estrazione con acqua/acetonitrile (84:16), estrazione con acqua/acetonitrile (84:16) e purificazione con Mycosep, estrazione con acqua/acetonitrile (84:16) e purificazione con Bondelut, estrazione con acqua/metanolo (80:20), estrazione con acqua/metanolo (80:20) e purificazione con Bondelut. Alla fine di ogni processo di estrazione, il campione è stato seccato e risolubilizzato in un adatto volume di tampone al fine di far corrispondere il limite di tollerabilità in esame (200 per gli alimenti destinati all'infanzia e 500 per i cereali da colazione) all'interno dell'intervallo lineare della curva di riferimento. Alla matrice così trattata sono state addizionate soluzioni standard di DON, al fine di valutare l'effetto matrice mediante confronto con la curva di taratura in tampone Tris.

A seguito dei test eseguiti sui campioni di alimenti non contaminati, la procedura di estrazione che offre il miglior compromesso tra semplicità di esecuzione e interferenza nell'analisi è risultata la seguente: un'aliquota di 25 g di campione macinato è stata estratta con 100 mL di una soluzione di acetonitrile/H₂O (84:16) e omogeneizzata per 3 minuti. L'omogeneizzato è stato centrifugato per 10 minuti a 6000 rpm. 4 mL di supernatante sono portati a secco sotto atmosfera d'azoto. Il campione di cereali da colazione è stato risolubilizzato in 2 mL di tampone Tris mentre il campione di alimenti destinati all'infanzia in 0,4 mL di tampone Tris. Il recupero medio risultato da questa procedura di estrazione è del 95% per i cereali da colazione e del 105% per gli alimenti destinati all'infanzia.

Cereali da colazione: campioni sperimentalmente contaminati

Si è proceduto con l'analisi di campioni di cereali da colazione sperimentalmente contaminati con concentrazioni di DON pari a 100, 300, 500, 700 e 1000 ng/g. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2. I valori riportati (deviazione standard relativa RSD e recupero medio) sono la media di 9 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 2. Analisi ELIME di campioni di cereali da colazione sperimentalmente contaminati con concentrazioni note di DON confrontata con quella degli standard

DON aggiunto (ng/g)	DON trovato (ng/g)	RSD %	Recupero (%)
100	n.d.	–	–
300	268	20	89
500	410	12	82
750	716	15	95
1000	1098	9	110

Cereali da colazione: campioni naturalmente contaminati

Campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati dalla tossina DON sono stati analizzati con l'immunosensore ELIME ottimizzato. I risultati sono mostrati in Tabella 3. I valori riportati sono la media di 6 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 3. Valori di recupero ottenuti dall'analisi, con DON-immunosensore, di campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati

Contenuto di DON (ng/g)	DON trovato (ng/g)	Recupero (%)
485±61	475±80	98
364±47	432±55	119
242±31	201±17	83
121±16	n.d.	–

Alimenti per l'infanzia: campioni sperimentalmente contaminati

Si è proceduto con l'analisi di campioni di alimenti destinati all'infanzia a base di cereali sperimentalmente contaminati con concentrazioni di DON pari a 50, 100, 200, 400 e 1000 ng/g.

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4. I valori riportati sono la media di 9 determinazioni per ogni livello di concentrazione.

Tabella 4. Valori di recupero del DON-immunosensore ottenuti analizzando campioni di alimenti per l'infanzia sperimentalmente contaminati

DON aggiunto (ng/g)	DON trovato (ng/g)	RSD %	Recupero (%)
50	n.d.	–	–
100	97±33	33	97
200	198±20	10	99
400	434±52	12	108
1000	1050±157	15	105

Conclusioni

È stato messo a punto un sistema immunomagnetico elettrochimico (ELIME) per la determinazione del DON in matrici alimentari a base di cereali. Ottimizzate le condizioni per il saggio ELIME, è stato valutato l'effetto interferente di diverse matrici: cereali da colazione e alimenti per l'infanzia trattati secondo diverse procedure di estrazione. Per entrambe le matrici la procedura di estrazione che offre il miglior compromesso tra semplicità di esecuzione e interferenza nell'analisi è quella che usa come solvente la miscela acetonitrile/acqua in un rapporto 84/16. Affinché l'immunosensore ELIME ottimizzato possa rivelare il DON nei limiti pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, l'estratto deve essere seccato e risolubilizzato in un volume di acqua pari alla metà di quello della miscela estraente per i cereali da colazione e in volume minore di dieci volte rispetto a quello della miscela estraente per gli alimenti per l'infanzia; prima della procedura di essiccazione con questo metodo non è necessario alcun passaggio di purificazione. Gli ottimi risultati acquisiti nei test eseguiti su campioni di cereali da colazione naturalmente contaminati dimostrano l'elevata efficienza di

questo immunosensore, ulteriori test sono attualmente in esecuzione allo scopo di dimostrare l'effettiva trasferibilità del sistema.

Bibliografia

1. Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state of the art in the analysis of type-A and type-B trichothecene mycotoxins in cereals. *Journal of Analytical Chemistry* 2001;371:285-9.
2. Hsueh C, Liu Y, Freund M. Indirect electrochemical detection of type-B trichotecene mycotoxins. *Analytical Chemistry* 1999;71:4075-80.
3. Unione Europea. Regolamento (CE) n. 1126/2007 della Commissione, del 28 settembre 2007, che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari per quanto riguarda le Fusarium -tossine nel granoturco e nei prodotti a base di granoturco. *GUCE L 255*, 29 settembre 2007.
4. Schneider E, Curtui V, Seidler C, Dietrich R, Usleber E, Märtlbauer E. Rapid methods for deoxynivalenol and other trichotecenes. *Toxicology Letters* 2004;153:113-21.
5. Volpe G, Compagnone D, Draisci R, Palleschi G. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst* 1998;123:1303-7.