

SVILUPPO DI UN BIOSENSORE QCM (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) PER LA DETERMINAZIONE DELL' AFLATOSSINA B₁ MEDIANTE UN SAGGIO SANDWICH APTAMERO-ANTICORPO

K. SPINELLA, L. MOSIELLO, T. HIANIK, A. POTURNAYOVA, M. SNEJDARKOVA, F. VITALI

ENEA – Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale
Laboratorio di Innovazione Agro-Industriale
Centro Ricerche Casaccia, Roma



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

SVILUPPO DI UN BIOSENSORE QCM (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) PER LA DETERMINAZIONE DELL' AFLATOSSINA B₁ MEDIANTE UN SAGGIO SANDWICH APTAMERO-ANTICORPO

K. SPINELLA, L. MOSIELLO, T. HIANIK, A. POTURNAYOVA, M. SNEJDARKOVA, F. VITALI

ENEA – Unità Tecnica Sviluppo Sostenibile ed Innovazione del Sistema Agro-Industriale
Laboratorio di Innovazione Agro-Industriale
Centro Ricerche Casaccia, Roma

I Rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina
<http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/rapporti-tecnici>

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia.

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

SVILUPPO DI UN BIOSENSORE QCM (QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE) PER LA DETERMINAZIONE DELL' AFLATOSSINA B₁ MEDIANTE UN SAGGIO SANDWICH APTAMERO-ANTICORPO

K. SPINELLA, L. MOSIELLO, T. HIANIK, A. POTURNAYOVA, M. SNEJDARKOVA, F. VITALI

Riassunto

Negli ultimi anni l'impiego degli aptameri in alternativa agli anticorpi ha avuto un largo sviluppo, un'interessante applicazione è costituita dal loro uso come biorecettori con finalità analitiche e diagnostiche e per la realizzazione di biosensori. Gli aptameri sono delle corte sequenze oligonucleotidiche a DNA o RNA, di lunghezza variabile generalmente fra 15 ed 80 nucleotidi, che legano con elevata affinità e specificità una vasta gamma di molecole bersaglio, quali proteine o altre molecole organiche e inorganiche. Sono generati da un processo di selezione in vitro chiamato SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment). Questa tecnica unisce i principi della chimica combinatoria a tecniche di biologia molecolare, e permette di identificare le specifiche molecole di RNA o DNA d'interesse partendo da una vasta popolazione di oligomeri a sequenza casuale. Gli aptameri offrono molti vantaggi rispetto alle proteine o alle piccole molecole farmacologiche, pertanto hanno un potenziale di applicazione in numerosi campi della ricerca e della tecnologia sia come elementi attivi, in grado di interferire con il macchinario biologico di cellule e tessuti, sia come elementi di "etichettatura" per agenti di vario interesse analitico e diagnostico in quanto, se dotati di appropriati linker, possono essere facilmente immobilizzati sulle superfici dei biosensori o di bio-chip con una densità ed una precisione molto alte. Un particolare tipo di biosensori utilizza come trasduttore le bilance microgravimetriche (QCM, Quartz Crystal Microbalance), costituite da un sottile disco di quarzo munito di due elettrodi d'oro, uno dei quali funzionalizzato in modo da essere sensibile alla presenza di un analita. Dato che la frequenza di oscillazione del quarzo è proporzionale alla massa depositata sull'elettrodo funzionalizzato, tali dispositivi sono in grado di fornire misure qualitative e quantitative relative alla presenza/assenza di un analita [Tombelli, S. 2002]. Le applicazioni biosensoristiche degli aptameri spaziano in campi molto diversi: dal settore bio-medicale (biosensori diagnostici in grado di evidenziare malattie e/o predisposizioni genetiche in tempi brevi e a basso costo) [Tang, J. et al., 2006] al settore ambientale (biosensori in grado di monitorare inquinamenti ambientali) [He, J. et al., 2011] al settore agroalimentare (per la valutazione della qualità dei cibi, o per la ricerca di OGM), [Castillo, G. et al., 2012]. Dato il crescente interesse attorno a questa branca della biotecnologie, è stato possibile poter sviluppare sistemi di misura compatti, portatili, di facile utilizzo e di basso costo.

Parole chiave: aptameri, biosensori di massa, Quartz Crystal Microbalance, micotossine, anticorpi

Summary

In recent years the use of aptamers in alternative to antibodies had a large development, an interesting application is constituted by their use as bioreceptors with analytical and diagnostic purposes and for the construction of biosensors. Aptamers are short oligonucleotide sequences in DNA or RNA, of variable length generally between 15 and 80 nucleotides, which bind with high affinity and specificity to a wide range of target molecules, such as proteins or other organic and inorganic molecules. Are generated by an in vitro selection process called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). This technique combines the principles of combinatorial chemistry to molecular biology techniques, and allows to identify the specific DNA or RNA molecules of interest from a large population of oligomers in a random sequence. Aptamers offer many advantages compared to the proteins or to small drug molecules, therefore, have potential application in many fields of research and technology both as active elements, able to interfere with the biological machinery of cells and tissues, both as elements "labeling" for agents of various diagnostic and analytical interest because, if equipped with suitable linker, can be easily immobilized on the surfaces of biosensors or bio-chip with a density and a very high precision. A particular type of transducer used as biosensors scales microgravimetric (QCM, Quartz Crystal Microbalance), constituted by a thin disk of quartz fitted with two gold electrodes, one of which is functionalized so as to be sensitive to the presence of an analyte. Since the oscillation frequency of the quartz is proportional to the mass deposited on the electrode functionalized, such devices are able to provide qualitative and quantitative measures related to the presence / absence of an analyte [Tombelli, S. 2002]. The biosensor applications of aptamers range in very different fields, from bio-medical sector (diagnostic biosensors able to detect diseases and / or genetic predispositions quickly and at low cost) [Tang, J. et al., 2006], the environmental sector (biosensors capable of monitoring environmental pollution) [He, J. et al., 2011] to the agri-food sector (for the evaluation of the quality of the food, or for the detection of GMOs), [Castillo, G. et al., 2012]. Given the increasing interest around this branch of biotechnology, it has been possible to develop systems of measurement compact, portable, easy to use and of low cost.

key words: aptamers, mass biosensor, Quartz Crystal Microbalance, mycotoxins, antibodies

INDICE

Sommario

1. GLI APTAMERI

1.1. Definizione e proprietà degli aptameri	7
1.1.1. Proprietà chimiche.....	9
1.1.2. Proprietà di legame.....	12
1.2. Metodi di produzione degli aptameri.....	13
1.3. Varie applicazioni degli aptameri.....	16
1.3.1 aptameri come strumento terapeutico	17
1.3.2 aptameri come agenti diagnostici	19

2. LE MICOTOSSINE

2.1. La sicurezza alimentare e la salute dell'uomo.....	23
2.2. Aspetti generali.....	24
2.3. Le Aflatossine.....	26
2.4. Valutazione del rischio e dosi di assunzione giornaliera.....	28
2.5. Metodi di analisi delle micotossine.....	30
2.5.1. Metodi immunochimici.....	32
2.5.2. Tecniche cromatografiche.....	33
2.5.3. Biosensori.....	34
2.6. Il problema del campionamento.....	40

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali e metodi utilizzati per il coating dei cristalli di quarzo.....	42
3.2 Immobilizzazione degli aptameri tiolati sulla superficie d'oro.....	42

3.3. Detection dell' Aflatossina B1	44
---	----

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Immunoassay a sandwich per la determinazione dell' Aflatossina B1	46
--	----

BIBLIOGRAFIA

1. GLI APTAMERI

1.1 Definizione e proprietà degli aptameri

Gli aptameri sono delle corte sequenze oligonucleotidiche a DNA o RNA, di lunghezza variabile generalmente fra 15 ed 80 nucleotidi, che legano con elevata affinità e specificità una vasta gamma di molecole bersaglio, quali proteine o altre molecole organiche e inorganiche. Sono generati da un processo di selezione in vitro chiamato SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). La caratteristica fondamentale degli aptameri consiste nel fatto che, trattandosi di molecole a singolo filamento, possono generare accoppiamenti intramolecolari tra le basi complementari o loro analoghi modificati (2'-Fluoro, 2'-O-Metil, 2'-Ammino, Fosforotioati, etc.), che determinano il ripiegamento della molecola in una struttura secondaria con porzioni a doppia elica (*stem*) raccordate da segmenti a singolo filamento (*loop*). L'insieme di svariati ripiegamenti secondari a carico di porzioni multiple della molecola dell'aptamero porta alla formazione di una struttura tridimensionale complessa che fornisce la corretta geometria utile per una salda interazione di legame con la superficie della specifica molecola bersaglio. Queste caratteristiche conferiscono agli aptameri proprietà di riconoscimento molecolare paragonabili a quelle delle biomolecole più utilizzate a tale scopo, quali gli anticorpi, pertanto ha preso consistenza l'ipotesi di impiegarli come loro sostituti. Gli aptameri possiedono, almeno in linea di principio, alcuni vantaggi rispetto agli anticorpi, primo fra tutti è il loro processo di selezione in vitro, che prescinde dai meccanismi multipli di una risposta immunitaria dei sistemi biologici utilizzati nella produzione di anticorpi. Quest'ultima, infatti, può discriminare proteine bersaglio che hanno una struttura simile a proteine endogene. Un altro svantaggio insito nell'uso degli anticorpi consiste nel fatto che questi funzionano solo in condizioni fisiologiche, una limitazione che ne restringe il campo di applicazione e la funzionalità. Gli aptameri, d'altro canto, possono essere ottimizzati e manipolati a livello della regione chiave d'interazione con il bersaglio, inoltre sono molto stabili alle alte temperature e possono essere facilmente rigenerati dopo una denaturazione termica. Sono in generale più resistenti degli anticorpi e quindi hanno, nei diversi ambienti biologici, una vita media più lunga. Una speciale prerogativa a vantaggio degli aptameri è l'alto grado di purezza con cui possono essere ottenuti e l'elevata riproducibilità dei preparati che dipendono dal processo chimico di sintesi e di purificazione che sono

finemente controllabili. Inoltre, degli aptameri è possibile cambiare i parametri cinetici mentre ci è non può essere fatto con gli anticorpi. Per quanto riguarda la scelta dell'acido nucleico, anche se il DNA a singolo filamento può formare delle complesse strutture secondarie e terziarie, la gamma di strutture 3D realizzata da molecole di RNA è senza dubbio più diversificata rispetto a quella del DNA. Pertanto, le possibilità di impiego degli aptameri a RNA sono maggiori e rendono il processo di selezione più semplice. Tuttavia bisogna riconoscere che, una volta selezionato, un aptamero a DNA ha tutte le caratteristiche di uno a RNA. È solo durante il processo di selezione che il DNA presenta un numero ridotto di combinazioni utili. Uno degli svantaggi più importanti degli aptameri a RNA è la loro sensibilità alla degradazione enzimatica. Le ribonucleasi sono infatti enzimi ubiquitari molto rappresentati nei fluidi biologici. Questo problema può essere risolto modificando la posizione 2' del ribosio. È stato dimostrato che aptameri aventi una pirimidina modificata con gruppi 2'-ammino o 2'-fluoro sono più stabili e funzionali nel processo di SELEX. Un'altra tecnica usata per aumentare la stabilità degli aptameri a RNA consiste nel sostituire lo zucchero D-ribosio con lo stereoisomero L-ribosio. La forma levogira infatti conserva la capacità di legare la molecola bersaglio e ha un'elevata stabilità nella cellula. Svantaggi che riguardano l'ottenimento e l'utilizzo degli aptameri sono i costi, ancora molto elevati per la produzione su larga scala, e le difficoltà nella preparazione di sequenze lunghe. La chimica della sintesi in fase solida, difatti, presenta sensibili riduzioni di resa con l'aumentare dei cicli di accoppiamento. Una ulteriore problematica riguarda l'uso come farmaco degli oligonucleotidi; trattandosi di molecole idrofile presentano una elevata affinità per il flusso sanguigno, un fatto che ne limita la biodisponibilità e ne aumenta l'escrezione. A questo si può in parte ovviare coniugando l'aptamero ad un vettore come il polietilene glicole, o con formulazioni liposomiale che aumentano il peso molecolare e quindi il tempo di permanenza della molecola nel plasma. Altri aptameri sono in fase di sviluppo per la prevenzione e il trattamento delle malattie croniche o acute: ARC1779, ad esempio, è un aptamero che funge da potente antagonista selettivo del Fattore VonWillebrand (VWF) e viene valutato in pazienti con diagnosi di sindrome coronarica acuta (ACS) sottoposti a intervento coronarico percutaneo (PCI). Alla fine del 2007 l'aptamero è stato sottoposto agli studi di fase 2. Un'altra classe di aptameri, scoperti dopo quelli a RNA e a DNA, sono gli aptameri peptidici, piccoli e semplici peptidi che hanno una sola regione variabile combinatoria, in genere composta da 10 a 20 amminoacidi, collegata da entrambi i lati ad una impalcatura di proteine, con una buona solubilità e compatibilità. In sintesi si può riassumere come segue:

- La caratteristica più importante degli aptameri è la loro elevata specificità.

- Uno dei principali vantaggi degli aptameri a RNA `e il processo di selezione in vitro, poich  consente un controllo molto pi  selettivo di quello che si pu  compiere in vivo.
- Gli aptameri a RNA possono formare diverse strutture secondarie e terziarie e ci  contribuisce a produrre una geometria altamente specifica per la proteina bersaglio.
- La modifica a livello del ribosio, sia con sostituenti inusuali come OCH₃, F, NH₂, che nel suo stereoisomero levogiro, ne aumenta notevolmente la stabilita.
- Gli aptameri a RNA possono essere manipolati in modo da migliorare la capacit  di legare le loro molecole bersaglio in diverse condizioni.
- Sono un valido strumento per scopi terapeutici, diagnostici e di analisi, inoltre risultano particolarmente adatti come biorecettori per la realizzazione di biosensori.

Le enormi aspettative di applicazione degli aptameri tuttavia, si sono dovute scontrare con una serie di motivi che hanno contribuito ad impedirne la rapida diffusione prevista. Le procedure di selezione, infatti, soffrono di numerosi elementi di criticit  che spesso rendono difficile il raggiungimento degli obiettivi sperati in tempi brevi. Ad oggi infatti, la fase di ricerca degli aptameri `e ancora molto costosa, bisogna comunque sottolineare anche che, una volta ottimizzato, il processo di selezione SELEX, richiede circa 8 settimane per lo sviluppo di un aptamero, mentre quello di produzione degli anticorpi pu  durare fino a 6 mesi.

1.1.1 Propriet  chimiche

Gli aptameri sono molecole costituite da acidi nucleici a singolo filamento e pertanto mostrano, dal punto di vista chimico, tutti i pregi e i difetti di queste molecole. Presentano una duplice natura idrofobica (basi azotate) ed idrofila (scheletro zucchero-fosfato). Questa parte idrofila conferisce alla molecola una carica netta negativa, dovuta ai gruppi fosforici. Gli aptameri, hanno, dunque un'elevata solubilit  in acqua ed una grande predisposizione a formare legami ad idrogeno sia come donatori che come accettori. La resistenza chimica `e diversa a seconda che si tratti di sequenze di DNA o di RNA. Il primo, infatti, `e generalmente pi  `u stabile a variazioni di pH mentre il secondo `e estremamente sensibile a condizioni alcaline. Entrambi temono l'ossidazione, i radicali liberi e gli aggressivi chimici, in particolare gli alchilanti, in grado di agire sulle basi azotate. Tuttavia se opportunamente stabilizzati con appropriati gruppi sostituenti, possono acquisire un'ottima resistenza agli agenti esterni ed agli enzimi nucleolitici. Da un punto di vista strutturale, gli aptameri sopravvivono a trattamenti denaturanti come quelli con la formammide o

con variazioni di temperatura. Possono, infatti, essere sottoposti a cicli ripetuti di denaturazione e rinaturazione senza alcuna perdita di attività perché sono in grado di riacquistare spontaneamente la loro naturale struttura tridimensionale una volta ripristinate le condizioni originarie di temperatura e forza ionica. Grazie a queste proprietà gli aptameri possono essere immagazzinati indefinitamente come polveri liofilizzate e, dopo la solubilizzazione, riacquistare la loro conformazione spaziale divenendo immediatamente attivi. Un grande vantaggio legato all'origine sintetica degli aptameri riguarda l'enorme possibilità di modifiche chimiche che possono essere introdotte nella sequenza allo scopo di ottimizzare le proprietà della molecola o per inserire strutture utili agli usi specifici previsti. Si distinguono:

- modifiche stabilizzanti, per lo più `u a carico dei gruppi fosforici e del ribosio, finalizzate alla protezione della sequenza dagli enzimi nucleolitici;
- modifiche funzionali, per lo più `u a carico delle basi azotate, rivolte all'adeguamento della molecola al tipo di applicazione (es. introduzione di marcatori label, di crosslinkers, etc.).
- modifiche strutturali con l'introduzione di basi rare o di surrogati delle basi azotate in grado di conferire agli aptameri ulteriore plasticità, utile per aumentarne la specificità di legame.

Le modifiche stabilizzanti derivano principalmente da esperienze maturate con lo studio degli oligonucleotidi antisense. Risultano di fondamentale importanza per le applicazioni in vivo: `e noto, infatti, che gli oligonucleotidi sintetici sono fortemente sensibili alle nucleasi che ne riducono l'emivita a minuti (DNA) e secondi (RNA). Il metodo SELEX consente di preparare opportune collezioni di oligonucleotidi anche modificati tali da mostrare maggiore resistenza enzimatica e maggiore affinità per il bersaglio, sempre che le modifiche introdotte siano tollerate dagli enzimi DNA-RNA polimerasi. Anche l'uso di fosfotioati, pur compatibile con il metodo di selezione, `e stato scartato a causa delle interazioni aspecifiche degli atomi di zolfo con proteine e costituenti cellulari. Modificazioni nella posizione 2' dell'anello del ribosio di un RNA, incrementano la resistenza agli enzimi.

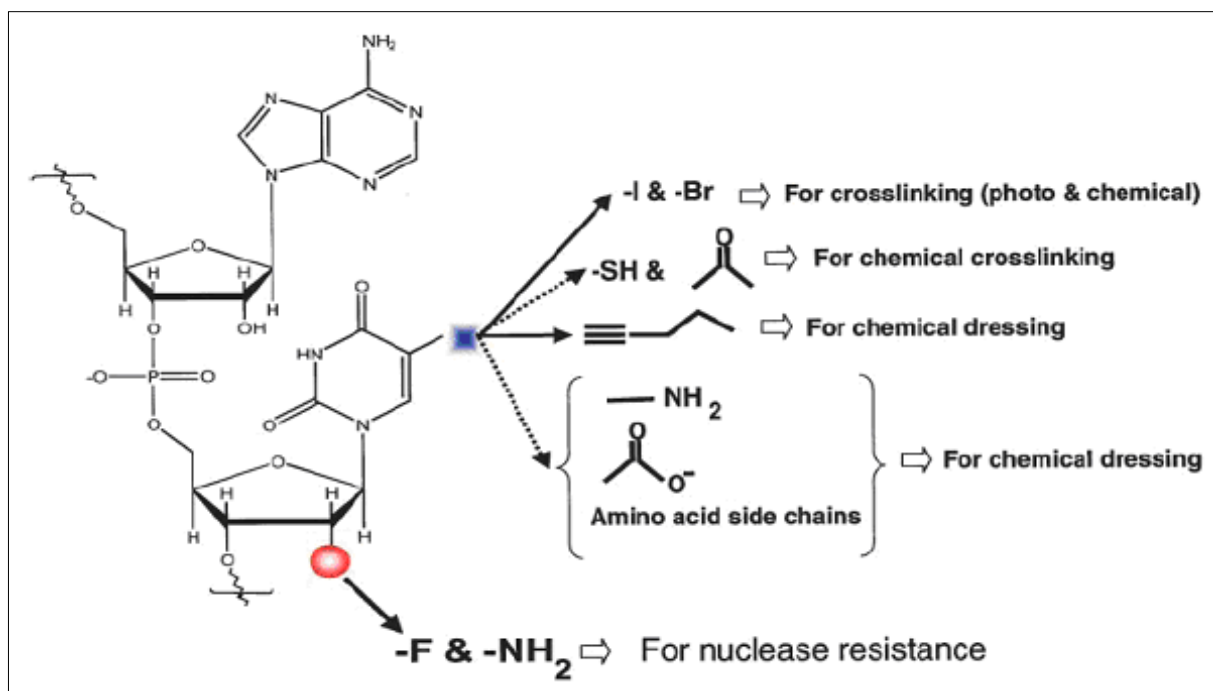


Figura 1. Possibili modificazioni chimiche a carico di una catena oligonucleotidica. Le modificazioni indicate da frecce continue sono già state utilizzate in processi di selezione: quelle indicate con frecce tratteggiate rappresentano alcune delle modificazioni che potrebbero essere usate. [Jayasena S.D. 1999]

Poiché le endo-ribonucleasi più abbondanti in natura sono le nucleasi pirimidino-specifiche, l'introduzione di modificazioni al 2' di citidina, e uracile (2'-Fluoro, 2'-Ammino, e 2'-O-metile pirimidine) proteggono gli oligonucleotidi dalla degradazione e ne aumentano l'emivita, fino a 18h-24h nel siero. La stabilizzazione può essere eseguita facendo incorporare dall'RNA polimerasi 2'-Amino e 2'-Fluoro CTP e UTP nel pool delle sequenze da sottoporre a selezione o alternativamente, può essere attuata a selezione avvenuta introducendo successivamente le modifiche. Spesso però, gli aptameri selezionati usando una collezione di RNA già modificati hanno una affinità e una specificità molto ridotte per il proprio bersaglio [Tahiri-Alaoui A et al., 2002]. Una strategia alternativa per inibire la degradazione è quella di invertire tutti i centri chirali dell'acido nucleico utilizzando nucleotidi "invertiti" durante la selezione ("Tec-5 nologia Spiegelmers", da Spiegel = specchio) in modo da creare molecole di geometria speculare resistenti alle nucleasi del sangue e a quelle tissutali che sono enantiospecifiche. Le esonucleasi, che a differenza delle più attive endo-, degradano le estremità 5' e 3' delle sequenze oligonucleotidiche, possono essere inibite mascherando le estremità dell'aptamero con sostituenti non naturali. Esempi molto usati sono l'introduzione di un legame 3'-3' di timidina all'estremità 3', e la coniugazione con PEG o addirittura il labelling con biotina o fluorocromi dell'estremità 5', per ottenere efficaci capping delle estremità libere. Le

modificazioni introdotte per aumentarne la stabilità alle nucleasi, possono portare il peso molecolare degli oligonucleotidi oltre i 40 kDa e questo consente loro di rimanere in circolazione per tempi maggiori. Inoltre il tempo di permanenza nel plasma può essere prolungato aumentando il peso molecolare dell'aptamero anche tramite la coniugazione ad una macromolecola neutra e questo genere di modifica può migliorare significativamente la clearance plasmatica in misura variabile da ore a giorni. La farmacocinetica di un particolare aptamero può essere finemente modulata, fatto che rende queste molecole molto più appetibili dei rivali anticorpi. Le modifiche funzionali a carico del C-5 delle pirimidine con gruppi come il benzoile che ha un ragionevole ingombro sterico, sono ben tollerati durante gli stadi di polimerizzazione della tecnologia SELEX. Le modifiche strutturali sono possibili con l'aumento della gamma di monomeri utili oltre ai quattro disponibili in natura. Utilizzando delle basi non canoniche si può accrescere la diversità molecolare ottenibile. Infatti, in virtù di appaiamenti diversi da quelli canonici descritti dal modello di Watson e Crick, è possibile aumentare l'assortimento di geometrie tridimensionali in quanto presentano una struttura primaria e secondaria completamente diversa da quelle derivate da collezioni costituite da basi naturali.

1.1.2 Proprietà di legame

Gli oligonucleotidi a singolo filamento hanno un'altissima propensione a formare strutture secondarie e terziarie che danno luogo a diversi motivi strutturali. Il numero di queste strutture termodinamicamente stabili è notevolmente più alto rispetto a quello dei più rigidi peptidi di uguale lunghezza. La formazione di queste strutture secondarie è dovuta semplicemente ai canonici appaiamenti intramolecolari tra le basi. L'altissimo numero di combinazioni possibili all'interno di una sequenza random comporta la formazione di una miriade di figure strutturali totalmente diverse che rappresentano la base probabilistica su cui si fonda la possibilità di generare aptameri contro un'infinita gamma di bersagli. Gli aptameri hanno alta specificità verso i loro bersagli (solitamente 10pM-10nM per bersagli proteici), dovuta alla loro elevata plasticità che consente, non solo di dar luogo a strutture geometriche compatibili con la superficie della molecola bersaglio, ma anche di adattarsi, con ulteriori ripiegamenti, su di essa. Gli aptameri selezionati si legano con alta affinità ai loro targets e possono discriminare tra composti particolarmente simili. Il legame aptamero-target è così finemente strutturato che anche la più piccola modifica nella molecola bersaglio può portare a considerevoli differenze di affinità e persino alla perdita totale del legame. Le porzioni a singolo filamento, loop e bulge,

rappresentano le regioni di riconoscimento più comuni, ed essendo spesso ricche in purine, danno luogo a geometrie del tutto particolari dovute proprio agli appaiamenti non canonici purina-purina mentre la loro capacità di legare il bersaglio dipende dalla capacità di formare legami ad H o di impilarsi (stacking) in virtù `u di interazioni fra gruppi aromatici planari. Spesso le interazioni molecola-aptamero sono stabilizzate dalla formazione di complessi con ioni metallici come Mg^{2+} o Mn^{2+} e da legami che si formano tra porzioni non contigue della molecola che portano a ripiegamenti particolari dell'elica. Alcuni aptameri sono caratterizzati da strutture quadruplex, come ad esempio il TBA (aptamero per la trombina) e l'inibitore dell'integrasi del virus HIV. Gli aptameri riescono dunque a discriminare fra analoghi strutturali, isoforme di una famiglia di proteine [Jellinek D. et al. 1995], di differenti stati conformazionali o funzionali della stessa proteine e isomeri della stessa molecola [Geiger A. et al., 1996].

1.2. Metodi di produzione degli aptameri

Gli aptameri sono generati da un processo di selezione in vitro chiamato SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Questa tecnica unisce i principi della chimica combinatoria a tecniche di biologia molecolare, e permette di identificare le specifiche molecole di RNA o DNA d'interesse partendo da una vasta popolazione di oligomeri a sequenza casuale (Fig.2). Il processo può essere descritto e schematizzato in modo del tutto generale in quattro stadi fondamentali:

1. preparazione di una collezione combinatoria di molecole
2. selezione e recupero degli esemplari più affini al bersaglio scelto
3. amplificazione delle specie selezionate
4. isolamento dell'aptamero specifico

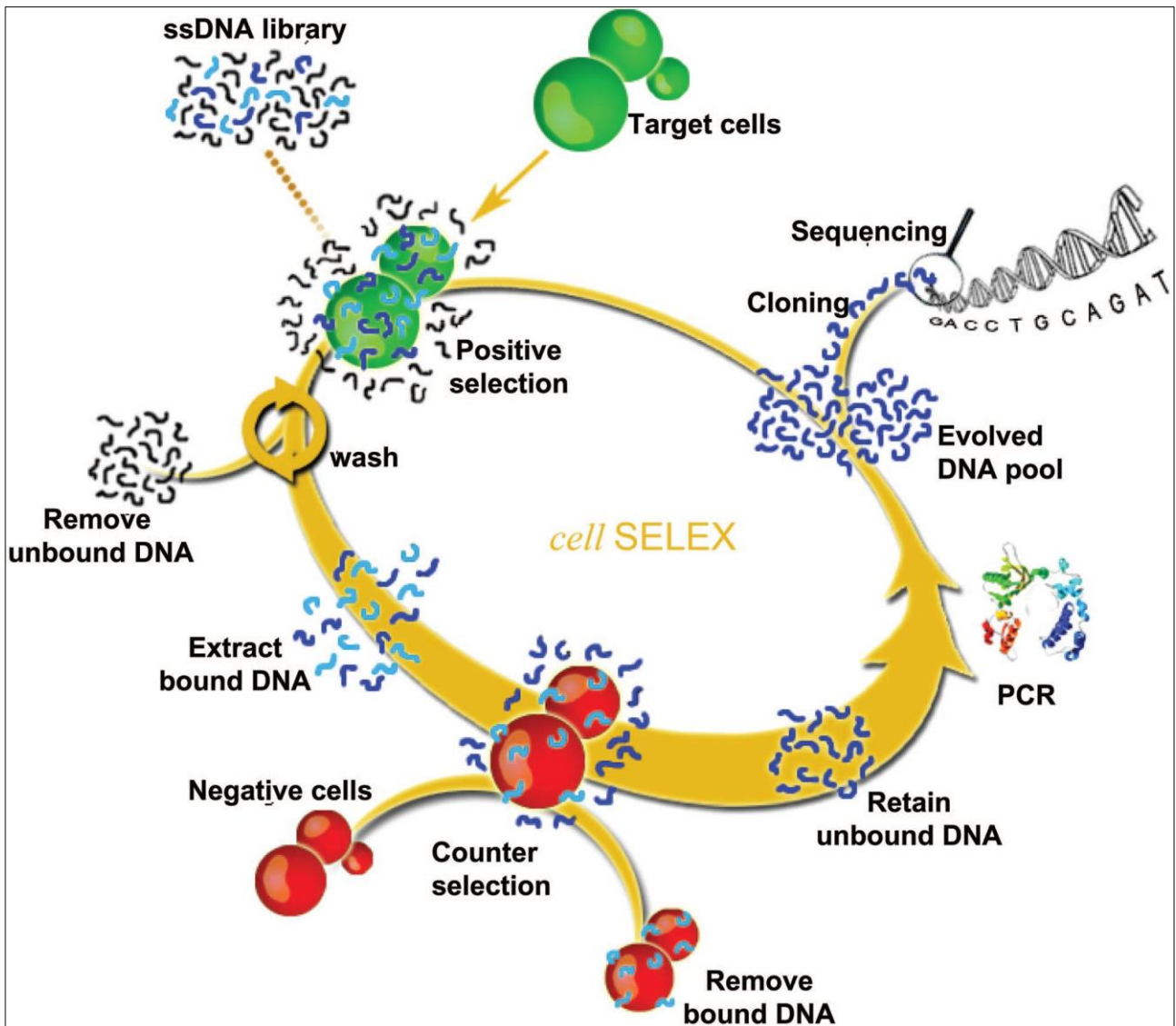


Fig.2 Schema della SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)

1. Preparazione di una collezione combinatoria di molecole. Il processo di evoluzione in vitro ha inizio con la preparazione, tramite sintesi chimica, della collezione combinatoria che è un insieme di sequenze generalmente organizzato in un segmento centrale degenerato di lunghezza definita, detto "regione random" e due regioni fiancheggiatrici fisse, costituite da sequenze note, utili per il legame dei primers specifici necessari sia per l'amplificazione mediante PCR sia per la trascrizione nel caso di aptameri ad RNA. Ogni esemplare all'interno della collezione ottenuta (di solito rappresentativa di 10^{15} - 10^{16} specie differenti) ha una sequenza unica che può assumere una limitata serie di strutture tridimensionali interconvertibili. Una collezione con una sequenza casuale di 100 oligonucleotidi può generare $4^{100} = 1,6 \cdot 10^{60}$ combinazioni di molecole diverse contro le circa $1,2 \cdot 10^{15}$ di un pool con sequenza random di 25 nucleotidi. All'interno della collezione

combinatoria le sequenze aventi la specifica struttura tridimensionale capace di riconoscere il bersaglio devono essere sufficientemente rappresentate per poter essere selezionate, pertanto devono avere una bassa complessità. Un motivo strutturale semplice può, difatti, essere facilmente contenuto ovunque all'interno di una sequenza casuale, sia essa corta o lunga. Le collezioni combinatorie utilizzate nella pratica rappresentano solo delle limitate sottopopolazioni rispetto alla totalità delle combinazioni possibili. Quantità di molecole comprese fra 10^{14} - 10^{16} rappresentano un compromesso utile perché gestibile sperimentalmente e dotato di un valore teorico di molteplicità sufficientemente ampio da fornire consistenti probabilità di selezione. Se invece calcolassimo la quantità teorica necessaria a rappresentare ogni singolo esemplare di tutte le combinazioni possibili di una collezione combinatoria N^3 (dove N indica il numero di nucleotidi casuali), avremmo $4^3 = 64$ x 10^{21} molecole, che corrisponderebbero a 1,96 moli (molecole / numero di Avogadro 6.023×10^{23}) pari a 61,643 kg (massa molecolare media = 30940). Per aumentare le probabilità di selezionare la sequenza necessaria al riconoscimento del bersaglio, la collezione oligonucleotidica viene poi convertita in DNA a doppio filamento tramite estensione e amplificazione per PCR. In questo modo infatti anche le specie meno rappresentate acquistano una relativa abbondanza all'interno della collezione. Successivamente, per ottenere aptameri a RNA, la collezione amplificata, o più spesso una sua parte, viene trascritta per formare un pool di RNA che sarà poi utilizzato per la selezione.

2. Selezione e recupero degli esemplari più affini al bersaglio scelto. In questa fase vengono selezionate le molecole con la maggiore affinità per il bersaglio: la collezione casuale di sequenze nucleotidiche è messa a contatto con il bersaglio (una proteina, una piccola molecola o una struttura macromolecolare) e, dopo un congruo periodo di incubazione, le molecole dotate di bassa o trascurabile affinità rimarranno libere in soluzione e saranno allontanate con i lavaggi, mentre quelle legate, in virtù della affinità con il bersaglio, rimarranno associate alla matrice di selezione. Queste ultime saranno successivamente recuperate sfruttando una delle tante tecniche possibili (competizione con il ligando libero, cambiamento delle condizioni di legame come tampone con diverso pH o diverso contenuto salino, l'uso di agenti denaturanti, riscaldamento etc.) e impiegate nei successivi cicli del processo di selezione, durante i quali le condizioni di associazione con il bersaglio saranno sempre più selettive (stringenti). Durante la procedura SELEX si usa alternare cicli di selezione positiva contro il bersaglio prescelto con cicli di selezione negativa, contro molecole correlate ma non uguali al bersaglio e/o contro il supporto a cui esso è eventualmente legato.

In questo modo si eliminano progressivamente tutti gli esemplari che hanno subito selezioni indesiderate,

3. Amplificazione delle specie selezionate Le sequenze catturate e recuperate dopo la selezione vengono sottoposte ad amplificazione mediante PCR, allo scopo di produrre una congrua quantità della nuova collezione di molecole che, rispetto a quella iniziale, risulta sostanzialmente arricchita degli esemplari con maggiore affinità per il bersaglio. Questa nuova collezione è il materiale di partenza per iniziare un nuovo ciclo di selezione. La reiterazione di questa successione di eventi (selezione, recupero e amplificazione), consente di ottenere collezioni nelle quali il rapporto fra le specie che si legano al bersaglio rispetto a quelle che non si legano si accresce ad ogni ciclo, grazie anche all'utilizzo di condizioni di selezione sempre più selettive verso le molecole ad alta affinità per il bersaglio.

4. Isolamento dell'aptamero specifico. Dopo un numero variabile di cicli, di solito tra i 8 e i 15, la collezione delle sequenze riduce drasticamente la propria molteplicità da un numero elevato 1035, ad un piccolo numero di molecole, capaci di legare fortemente il bersaglio scelto. Queste molecole vengono quindi isolate, clonate e infine sequenziate. La sintesi successiva delle sequenze così ottenute consentirà di misurare e paragonare le loro proprietà in termini di affinità e specificità. In molti casi, gli aptameri isolati possono essere ulteriormente migliorati inducendo mutazioni casuali mediante PCR. Una conseguente reiterazione della selezione viene fatta per identificare i mutanti che mostrano un aumento delle proprietà di legame e mappare le posizioni oligonucleotidiche responsabili del miglioramento, così da eliminare quei nucleotidi che non sono strettamente necessari né al legame con il bersaglio, né alla struttura dell'aptamero.

1.3 Varie applicazione degli aptameri

Gli aptameri offrono parecchi vantaggi rispetto alle proteine o alle piccole molecole farmacologiche, grazie alla loro versatilità d'impiego descritta in precedenza. Pertanto hanno potenziale applicazione in numerosi campi della ricerca e della tecnologia sia come elementi attivi, in grado di interferire con il macchinario biologico di cellule e tessuti, sia come elementi di "etichettatura" per agenti di vario interesse analitico e diagnostico in quanto, se dotati di appropriati linker, possono essere facilmente immobilizzati sulle superfici dei biosensori o di bio-chip con una densità ed una precisione molto alte. Di seguito si riportano degli esempi di applicazione degli aptameri, raggruppandoli per tipo di impiego.

1.3.1 Aptameri come strumento terapeutico

Le terapie con gli aptameri si distinguono dalle altre che utilizzano acidi nucleici perché non intervengono su fasi come trascrizione, splicing, maturazione dell'RNA e traduzione ma modulano direttamente la funzione delle loro proteine bersaglio come gli anticorpi, ovvero legando e regolando l'obiettivo. Non ci sono limiti teorici alla creazione di aptameri contro qualsiasi proteina, (compresi i fattori di coagulazione, recettori, fattori della trascrizione) e possono essere usati per scoprire l'interazione di piccole molecole con tali proteine semplicemente attraverso saggi di legame competitivo. Questo metodo di studio dei farmaci non richiede la marcatura né del bersaglio né dell'aptamero. Molti aptameri sono entrati in uso per il trattamento di malattie come la degenerazione maculare, per le operazioni chirurgiche di bypass coronario, per le coronopatie acute, malattie infettive e per vari tipi di cancro.

1.3.2 Aptameri come agenti diagnostici

Oltre ad avere un eccellente potenziale nel campo terapeutico, gli aptameri hanno molteplici applicazioni scientifiche, tra cui lo sviluppo di sistemi diagnostici, la comprensione dei meccanismi d'azione di alcuni farmaci e la scoperta di nuove molecole terapeutiche. Per esempio, la selezione in vitro di aptameri a RNA leganti antibiotici, come la Neomicina B o la Viomicina, è stata utilizzata per capire i principi che determinano il legame di queste molecole all'RNA ribosomiale [Famulok, M. 1999]. Le strutture tridimensionali di molti tra questi complessi aptamero-anti-antibiotico, sono state determinate tramite spettrometria NMR. La comparazione tra il motivo strutturale dell'aptamero per la Viomicina e quello dell'RNA bersaglio, ha mostrato che entrambi sono costituiti da segmenti di acido nucleico che formano un uguale ripiegamento nel sito di attacco dell'antibiotico. Questi studi hanno permesso di compiere molti progressi nella comprensione delle modalità di riconoscimento dell'RNA da parte di queste molecole e potrebbero fornire nuovi elementi per capire meglio anche il funzionamento dei ribosomi stessi.

Aptameri come elementi di rivelazione. Gli aptameri possono essere utilizzati anche come sostituti degli anticorpi nelle analisi di immunoistochimica o nei saggi ELISA per analizzare campioni di sangue e tessuto in Western blot, Microarray, microscopia a fluorescenza, confocale e a raggi X. Possono essere utilizzati anche come strumenti negli studi ai raggi X e di NMR per mappare il loro sito di legame e risolvere la geometria, per studiare l'interazione fra acidi nucleici e proteine e caratterizzare, ad esempio, i meccanismi di regolazione dell'espressione genica. Esami basati sugli aptameri sono utilizzati per il metodo detto "mix and measure" capace di rivelare in

maniera semplice e senza dover ricorrere a lavaggi e separazioni, quantità molto piccole di analita. Combinando le specifiche proprietà di legame degli aptameri con la sensibilità della "real time PCR" quantitativa è possibile rilevare concentrazioni di analita molto basse, che corrisponde ad una sensibilità mille volte maggiore rispetto ai normali saggi ELISA.

Dal momento che gli aptameri possono essere facilmente legati ad una ampissima varietà di marcatori (piccoli radioattivi, enzimi, ect.) possono essere progettate molteplici applicazioni analitiche. Oltre ai classici biosensori, creati con gli anticorpi, ne sono stati sviluppati dei nuovi congegnati con diversi tipi di aptameri. I biosensori più promettenti si basano sulle fibre ottiche e su aptameri leganti fluorofori quencherati detti aptamer beacons [Yamamoto, R. 2000]. Questi sono una nuova classe di sonde fluorescenti recentemente introdotte per il rilevamento di sequenze di DNA. I beacons sono semplici aptameri a forcina in cui il 3' è legato a un fluoroforo mentre il 5' è legato a un quencher ovvero un cromoforo capace di assorbire l'energia elettromagnetica della fluorescenza emessa dopo eccitazione del fluoroforo al 3' in accordo col fenomeno fisico denominato FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Proprio per via della loro struttura, quando l'aptamero si lega al bersaglio, il conseguente riarrangiamento conformazionale dell'acido nucleico allontana il quencher dal fluoroforo annullando la possibilità che si attui il FRET, di conseguenza l'eccitazione del fluoroforo induce un segnale di emissione facilmente rivelabile. La figura 3 illustra questo sistema.

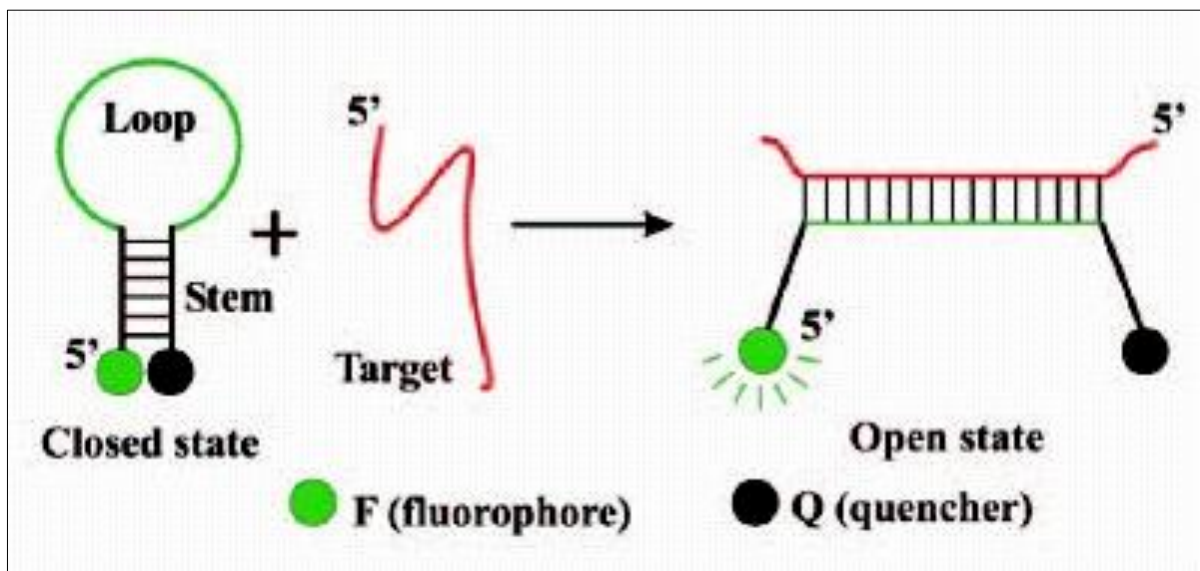


Fig. 3 Rappresentazione schematica della generazione del segnale luminoso da parte di un Aptamer Beacon. [You, K.M. 2003]

Applicazione di aptameri come biosensori Tra i metodi di rivelazione meritano particolare attenzione i biosensori, dispositivi analitici che utilizzano mediatori biologici per rivelare selettivamente e con alta specificità composti biologici o chimici senza la necessità di un complesso pretrattamento del campione. I biosensori utilizzano sistemi costituiti da supporti sottili inseriti in dispositivi per l'iniezione del campione (flow injection devices) provvisti di sistemi automatizzati per l'analisi di composti biomedicali, per il monitoraggio ambientale, ad esempio per la determinazione del glucosio ematico o dell'urea e per la presenza di pesticidi nell'ambiente.

I biosensori sono costituiti da un mediatore biologico (detto componente recettore come ad esempio un enzima, un anticorpo, una cellula o un microrganismo) sensibile ad un opportuno sistema di trasduzione che invia il segnale prodotto ad un sistema capace di convertire la risposta biochimica in un segnale fisico quantificabile e processabile: l'interazione tra il materiale biologico ed il campione sottoposto ad esame modifica uno o più parametri chimico-fisici, il trasduttore capta la variazione nel sistema e produce un segnale elettrico che può essere opportunamente amplificato, elaborato e quindi letto dall'operatore. Nella figura 4 sono indicati i diversi analiti, biorecettori, trasduttori e le relative tipologie di segnale utilizzate per la preparazione di biosensori [Beate, S. 2008].

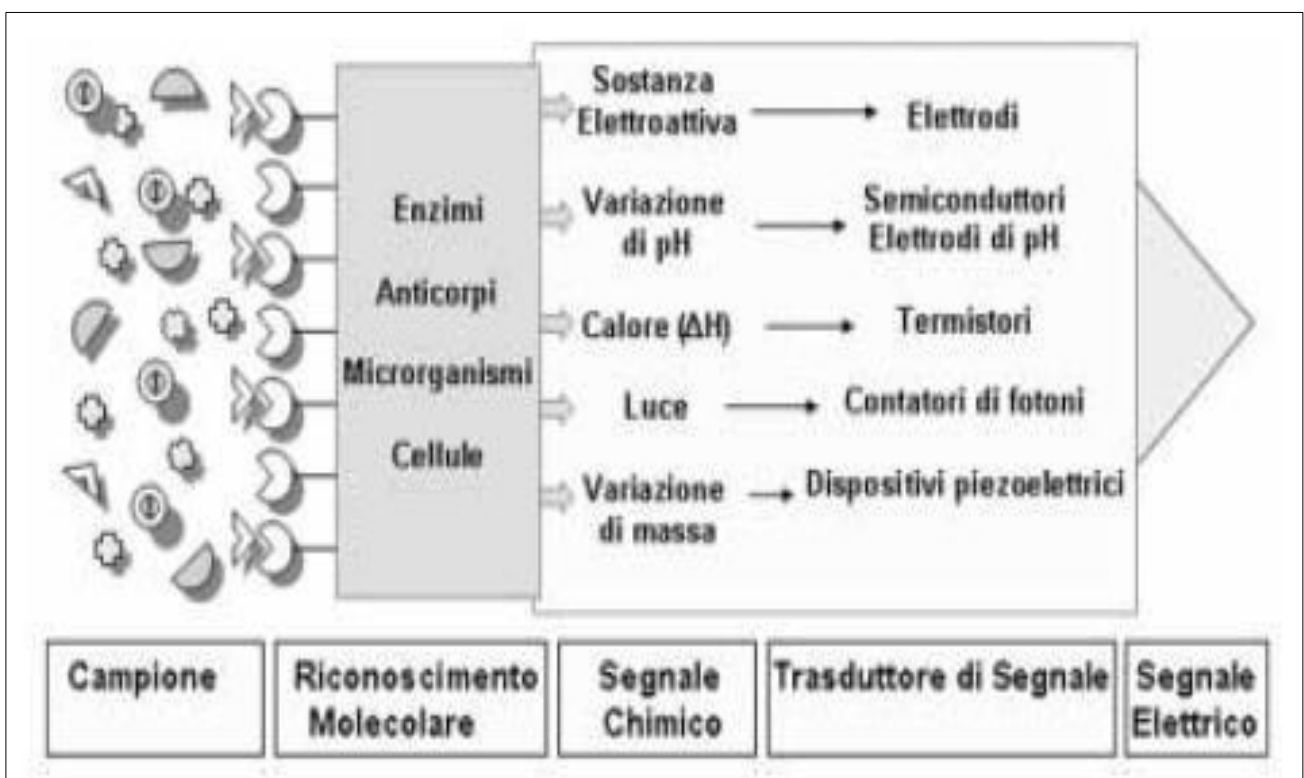


Fig.4 Schema generale di un biosensore

I biosensori possono essere classificati in base alla componente biologica:

- biosensori biocatalitici;
- biosensori di affinità:
- -immunosensori;
- -chemorecettori;
- -sensori a DNA e RNA;
- -sensori ad aptameri.

L'elemento artificiale del biosensore, il trasduttore, dovrebbe essere in grado di convertire il riconoscimento di un evento, in un segnale prelevabile e misurabile da un sistema a valle, tipicamente un sistema di misura elettronico. Dal punto di vista dei trasduttori di segnale più comunemente usati, si suddividono in:

- biosensori elettrochimici:
 - amperometrici (elettrodo di Clark);
 - potenziometrici (ISEs, Ion Selective Electrodes, FET, Field Effect Transistor);
 - conduttometrici (elettrodi di Pt, Au);
- biosensori ottici (fotodiodi, fibra ottica);
- biosensori acustici (cristalli piezoelettrici);
- biosensori calorimetrici (termistori o termopile)

Uno dei fattori che maggiormente ha accelerato lo sviluppo dei sensori è stata l'evoluzione dell'elaborazione dati: lo sviluppo di microprocessori e circuiti integrati specificamente dedicati ha reso possibile ottenere un'elaborazione a basso costo, accurata ed affidabile, aumentando dunque l'intelligenza del sistema. La ricerca in questo campo è sempre più diretta alla miniaturizzazione del trasduttore, alla produzione su larga scala, e alla creazione di biosensori multiparametrici per il controllo della qualità dei prodotti, dell'ambiente e della salute, allo scopo di determinare un generale miglioramento della qualità della vita. Le applicazioni biosensoristiche spaziano in campi molto diversi: dal settore ambientale (biosensori in grado di monitorare inquinamenti ambientali) [Tocco, G.], al settore agroalimentare (per la valutazione della qualità dei cibi, o per la ricerca di OGM), al settore industriale (biosensori, all'interno delle linee di produzione, in grado di valutare il raggiungimento di obiettivi specifici), al settore bio-medicale (biosensori

diagnostici in grado di evidenziare malattie e/o predisposizioni genetiche in tempi brevi e a basso costo).

I biosensori stanno assumendo negli ultimi anni un sempre crescente interesse di mercato, grazie ad alcuni aspetti caratterizzanti quali:

- la facilità di utilizzo: generalmente i campioni non necessitano di particolari preparazioni prima delle analisi
- i tempi di risposta sono ridotti e le dimensioni degli strumenti sono compatte, la sicurezza dell'operatore è garantita, in quanto non necessitano di radioisotopi o marcatori
- i costi, rispetto ai metodi di analisi tradizionali, sono molto più contenuti
- non necessitano di personale tecnico specializzato
- possibilità di seguire i processi in continuo.

I biosensori per l'analisi delle proteine coinvolgono principalmente gli anticorpi, ma gli ultimi sviluppi della ricerca hanno dimostrato che gli aptameri possono rivaleggiare con gli anticorpi in molte applicazioni in quanto garantiscono metodi di identificazione e di purificazione semplici, una sintesi chimica riproducibile, tecniche di immobilizzazione ad alta densità e stabilità anche in condizioni non fisiologiche. Grazie alle loro piccole dimensioni è possibile e attuare una immobilizzazione efficiente e ad alta densità, di conseguenza, la produzione, la miniaturizzazione, l'integrazione e l'automazione dei biosensori possono essere compiute molto più facilmente con gli aptameri.

Infatti gli aptameri possono potenzialmente sostituire gli anticorpi anche nelle applicazioni biosensoristiche, ma è necessario sintetizzarne molti altri prima che si possa arrivare alla creazione di una vera e propria libreria di aptasensori. Nella tabella 1 è stato riportato un breve confronto tra aptameri e anticorpi [Mir, M. 2007].

IgE	DNA thiolated	optical, SPR	2 nM 8.4 ... 84 nM
IgE	DNA biotinylated	mass sensitive, QCM	100 µg/L 0 ... 10 mg/L
IgE	DNA	carbon nanotube FET	250 pM 250 pM ... 20 nM
IgE	DNA	ec impedance spectroscopy, array	0.1 nM 2.5 ... 100 nM
HIV-Tat protein	RNA biotinylated	optical, SPR/ mass sensitive, QCM	n.s./ 0.25 ppm 0 ... 2.5 ppm/ 0 ... 1.25 ppm
HIV-Tat 1 protein	RNA biotinylated	mass sensitive, QCM	0.65 ppm 0 ... 2.5 ppm
Abrin toxin	DNA	optical, luminescence, molecular light switching intercalator	1 nM 1 ... 400 nM
Thrombin, bFGF, IMPDH, VEGF	RNA, DNA, fluorescently labeled	optical array, fluorescence polarization anisotropy	n.s.

Tab.1 Alcuni esempi di bioaptameri

2. LE MICOTOSSINE

2.1. La sicurezza alimentare e la salute dell'uomo

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. 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 e sono stati fissati limiti massimi sulla contaminazione sia degli alimenti sia nei mangimi da parte delle micotossine. 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, mandarine 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, dello sviluppo di particolari cultivar resistenti e del controllo lungo tutti i vari processi produttivi può prevenire la formazione di queste tossine.

2.2. Aspetti generali

Il termine micotossine comprende numerosi metaboliti secondari ad elevata tossicità, prodotti in opportune condizioni microclimatiche da funghi microscopici e filamentosi, meglio noti con il termine di “muffe”, che colonizzano le piante e/o le derrate alimentari nel corso del loro accrescimento. Il termine metabolita secondario significa che non si è in grado di attribuire loro alcun ruolo evidente nella crescita dell'organismo che le produce. Queste tossine non costituiscono una classe chimica, ma hanno strutture tra loro molto diverse, e mentre il metabolismo primario è fondamentalmente per i funghi, quello secondario dipende dalle specie e talvolta dal ceppo fungino. Da ciò la grande diversità di molecole prodotte, anche se per famiglie di prodotti simili [Piva, G. et al., 2006]. Lo sviluppo dei funghi tossigeni e la successiva sintesi di micotossine, può avvenire in qualunque fase di produzione e trasformazione di un prodotto alimentare. In particolare, la produzione di micotossine, può essere favorita già nella fase di coltivazione dei vegetali, da una serie di fattori che, provocando stress alle piante, possono aumentare la loro suscettibilità alle infezioni fungine. Le derrate alimentari, le granaglie ed i mangimi, rappresentano i substrati ideali per l'accrescimento dei funghi produttori di micotossine [Brera, C. et al., 2002]. Esse possono giungere alla nostra tavola sia direttamente attraverso il consumo di prodotti derivati da derrate vegetali contaminate (cerali, prodotti da forno, legumi, caffè, frutta tropicale, frutta secca a guscio, spezie, piante infusionali ecc.), sia indirettamente attraverso prodotti di origine animale derivati da bestiame alimentato con mangimi contaminati, qualora non sussistano casi acuti di micotossicosi tali da indurre l'allevatore a sopprimere l'animale. I funghi responsabili della produzione di micotossine appartengono a molte specie quali *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* ed *Alternaria* [Bennett, J.W. et al., 1997]. Più di 400 di questi metaboliti fungini, che mostrano grande eterogenicità per quanto riguarda la struttura chimica, risultano essere tossici, in particolar modo possono sviluppare cancerogenicità, neurotossicità e teratogenicità [Moss, M.O. 1996; Sweeney, M.J. et al., 1998]. Le più comuni e pericolose tossine sono l'Aflatossina B1 (AFB1), l'Ocratossina A (OTA), i Tricoteceni, gli Zearalenoni e le Fumonisine. Piccole tracce di queste tossine sono in grado di causare allergie e neurotossicità, mentre l'esposizione cronica può determinare effetti teratogeni, cancerogeni (soprattutto a carico di fegato e rene) o immunosoppressivi, sugli animali ma anche sull'uomo. Il potere immunosoppressivo [Ramos, M. et al., 2001 ; Atroshi, F. et al., 2000] di questi metaboliti fungini ha come importante implicazione una ridotta capacità di reagire alle malattie, e di conseguenza un forte impatto sulla salute già precaria delle popolazioni tropicali, particolarmente esposte a questo rischio. Le

micotossine possono causare quattro differenti tipi di tossicità: acuta, cronica, mutagena e teratogena [Hussein, H.S. et al., 2001]. Il più comune effetto descritto di tipo acuto, è l'alterazione della funzionalità epatica e renale, che in casi estremi può condurre alla morte. Le micotossine più importanti, dovuto alla loro tossicità e diffusione, sono:

- ❖ Ocratossine
- ❖ Fumonisine
- ❖ Zearalenone
- ❖ Tricoteceni
- ❖ Aflatossine

In tabella 2 sono riportate le caratteristiche generali delle più comuni micotossine.

Micotossine	Microrganismo	Tossicità	Alimenti contaminati
Aflatossine: B1, B2, G1, G2, M1, M2	<i>Aspergillus flavus,</i>	Epato- cancerogena, teratogena	Arachidi, cereali, noci e mandorle, latte e carne di animali contaminati
Zeralenoni	<i>Fusarium roseum</i>	Iperstrogenismo, ipofertilità	Mais e altri cereali
Ocratossine: A, B	<i>Aspergillus ocraceus</i> <i>Penicillium iridicatum</i>	Nefriti, epatiti	Orzo, mais ed altri cereali: pane, pasta ed altri prodotti da forno
Tricoteceni: - Tossina T2 - Deossinilvalenolo - Nivalenolo	<i>Fusarium roseum, solani</i>	Emorragie, disturbi nervosi, vomito rifiuto del cibo	Mais, orzo ed altri cereali
Rubatrossina A, B	<i>Penicillium rubum, purpurogenem</i>	Emorragia, degenerazione epatica	Mais ed altri cereali
Citrina	<i>Penicillium</i>	Epatiti, nefriti	Cereali

Tab.2 Caratteristiche delle principali micotossine

2.3. Le Aflatossine

Le Aflatossine sono micotossine, sostanze chimiche ad azione tossica nei confronti dell'uomo e degli animali (micotossicosi acute e croniche). Vengono prodotte, in particolari condizioni ambientali, da numerose specie di funghi filamentosi microscopici, chiamati comunemente muffe. Le muffe tossigene più diffuse in Europa appartengono al genere *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. In particolare le aflatossine sono prodotte da *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*.

Le aflatossine, ritenute a ragione le micotossine per eccellenza, sono state oggetto delle ricerche più approfondite e ancora oggi destano le maggiori preoccupazioni in quanto contaminanti dell'alimentazione di larga parte della popolazione mondiale che vive nelle fasce tropicali, dove le caratteristiche del clima e la pressoché totale assenza di refrigerazione facilitano la crescita delle muffe produttrici. Chimicamente sono dei derivati della cumarina e vengono denominate con le sigle B1, B2 (rispettivamente metossi-difurocumarone e metossi-difuro-cumaro-lattone), G1, G2 (loro diidroderivati), M1, M2 (metaboliti idrossilati rispettivamente di B1 e B2 che si riscontrano nel latte di lattifere alimentate con mangimi contaminati da aflatossine B1 e B2) (Fig.5).

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). Al gruppo delle aflatossine appartengono inoltre le M1 (contaminanti del latte di mucche che hanno consumato foraggio contaminato) e le M2, forme ossidrilate delle AFB1 e AFB2.

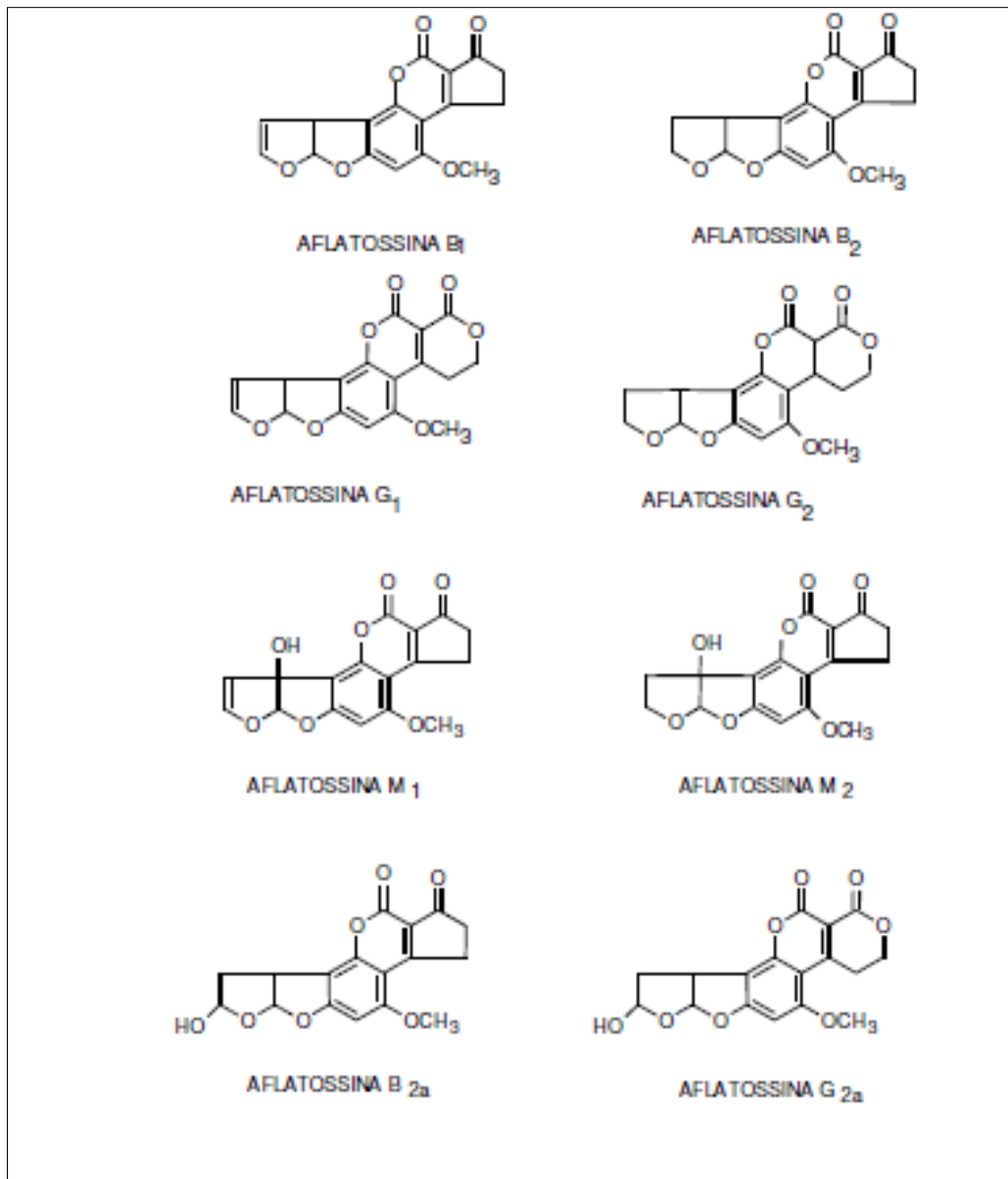


Fig.5 Principali aflatossine prodotte

Questo sottogruppo di micotossine possiede solo il 10% dell'attività cancerogena esplicita nei ratti dall'AFB₁, mentre presenta una tossicità acuta che si avvicina molto a quella della tossina da cui deriva [Hussieh, , D.P. et al., 1984]. AFB₁ è un potente agente epatotossico e epatocancerogeno che, insieme all'epatite B, è implicato nell'eziologia del carcinoma epatocellulare [Groopman, J.D. et al., 1992]. La forma attivata è AFB₁ 8,9-epossido (AFBO) che risulta dal metabolismo del AFB₁ da parte del citocromo-P450 [Gallagher, E.P. et al., 1996]. L'attivazione metabolica dell'AFB₁ da parte della frazione microsomiale epatica, principalmente a carico del CYT-P450, produce un miscela di due stereoisomeri (EXO ed ENDO) con una predominanza della forma EXO, che risulta essere molto più reattiva della ENDO nella formazione di addotti con il DNA e quindi con un'attività mutagena maggiore.

Questa molecola si lega ai centri nucleofili delle macromolecole cellulari come l'azoto in posizione 7 (N7) della guanina nella catena del DNA, mediante attacco elettrofilo, in modo da formare un addotto covalente con il DNA [Eaton, D.L. et al., 1994]. La formazione di questi addotti in vivo può dare come effetto la trasformazione o la morte cellulare. L'interferenza con la sintesi di DNA è il primo effetto biochimico osservabile correlato alla presenza dell'AFB1 e indica che l'AFB1 agisce bloccando la fase iniziale della replicazione del DNA piuttosto che il processo di allungamento [Meneghini, R. et al., 1977]. L'AFB1 sembra avere più affinità per il DNA mitocondriale epatico [Niranjan, A.R. et al., 1982]. Le lesioni conseguenti sono persistenti e l'effetto che si verifica è una persistente inibizione della trascrizione e della traduzione mitocondriale accompagnato da una trasformazione neoplastica delle cellule [Hseih, D.P. et al., 1984]. L'AFB1 possiede una potente azione mutagena e vi è una forte correlazione fra la capacità dell'AFB1 di essere mutagena e quella di essere cancerogena [Smith, C.A. et al., 1985]. Inoltre, il complesso N7,guanina-AFB1 si ritrova nella popolazione con una alta incidenza di cancro al fegato [Autrup, H. et al., 1983].

2.4. Valutazione del rischio e dosi di assunzione giornaliera

A causa delle caratteristiche delle micotossine e dei funghi che le rilasciano, l'eliminazione completa delle micotossine dagli alimenti e dai mangimi, per quanto sia auspicabile e sicuramente perseguita a vari livelli, è praticamente impossibile dal momento che la contaminazione può interessare molte materie prime di base, di fatto largamente utilizzate nell'industria alimentare, per cui l'unico approccio possibile per tutelare la salute umana è di avviare il complesso processo di valutazione/gestione del rischio. La Gestione del rischio è il processo mediante il quale si misura o si stima il rischio e successivamente si sviluppano opportune strategie per limitarlo e per governarlo. La Valutazione del rischio, invece consiste nel processo di quantificare la probabilità del verificarsi di un effetto dannoso a carico di una popolazione, dovuto ad alcune attività o condizioni. Alla base dei criteri di fissazione dei limiti ammissibili di assunzione di micotossine con la dieta esiste l'analisi del rischio proposta nel 1995 da FAO (Food and Agriculture Organization) e WHO (World Health Organization). La valutazione del rischio viene effettuata attraverso l'identificazione e la caratterizzazione del pericolo per la salute umana. Si svolgono studi di ricerca epidemiologica, in vivo e in vitro, e si monitora la presenza di micotossine negli alimenti operando una stima dell'esposizione al rischio. Per quanto riguarda le micotossine la gestione comporta:

- La definizione del livello massimo ammissibile per la salute (normativa)
- La definizione di linee guida per il controllo dei punti critici di filiera (prevenzione e controllo) [Miraglia, M. 2004].

L'UE ha stabilito per legge nell'ordine dei ppb (ug/L) i limiti massimi ammissibili per l'Aflatossina B1 in una gamma di prodotti, quali la frutta secca e i cereali per l'Aflatossina M1 in latte e latticini. Nel Regno Unito ma anche in altre nazioni, la concentrazione di Aflatossina B1 negli alimenti animali è stata ridotta raggiungendo addirittura i livelli minimi ammissibili nell'ordine di ppt (ng/L). La Tabella 3 riporta i valori massimi consentiti per i vari prodotti destinati all'alimentazione animale.

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%
Aflatossina B ₁	Materie prime per mangimi ad eccezione di:	0,05
	arachidi, copra, palmisti, semi di cotone, babassu, granturco e loro derivati	0,02
	Mangimi completi per bovini, ovino, caprino, ad eccezione di:	0,05
	animali da latte	0,005
	vitelli, agnelli, capretti	0,01
	Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,03
	Altri mangimi complementari	0,005

Tabella.3 Limiti indicati dalla Direttiva 2002/32/CE

L'Unione Europea ha recentemente proposto un limite massimo per l'Ocratossina A pari a 5 ug/kg nei chicchi di cereale grezzi compresi i chicchi di riso e di grano saraceno, 3 ug/kg per quanto riguarda i derivati dei cereali e per i cereali che sono direttamente consumati dall'uomo. In Tabella 4 sono riportati i valori massimi di Ocratossina A nei mangimi in Italia. L'Italia in un recente decreto del Ministero della

Salute (15 Maggio 2006) stabilisce i limiti massimi ammissibili di Ocratossina A negli alimenti animali. Tale decreto stabilisce che la presenza di OTA nei mangimi e nelle materie prime utilizzate per la loro produzione non deve superare i valori riportati in Tabella 4.

Substrato	Valore massimo ammesso (ppm)
Materie prime per mangimi	
cereali e prodotti derivati da cereali	0.25
Mangimi completi e complementari e razione giornaliera	
Per suini	0.05
Per pollame	0.1

Tabell.4 Valori massimi di Ocratossina A nei mangimi in Italia

2.5. Metodi di analisi delle micotossine

Le micotossine, come precedentemente visto, possono essere presenti nelle matrici alimentari in concentrazioni anche molto basse, che vengono espresse con le seguenti unità di misura;

ppm (parti per milione)	Mg/kg = ug/g	1 ppm= 1000ppb
ppb (parti per bilione)	ug/kg = ng/g	1 ppb = 1000 ppt
ppt (parti per trilione)	ng/kg	

per questo motivo è necessario sfruttare metodi di analisi estremamente sensibili, rapidi e riproducibili [Krska, R. 2005]. I metodi analitici per la determinazione di micotossine in prodotti agroalimentari prevedono generalmente una prima fase di estrazione della tossina dalla matrice (con una soluzione di metanolo-acqua o etanolo-acqua, a seconda del tipo di analisi successivo), una seconda fase di purificazione, e infine la rivelazione mediante un'opportuna tecnica strumentale. Solitamente i metodi utilizzati sono di tipo cromatografico o immunochimico ma negli ultimi anni si stanno sviluppando tecniche analitiche che utilizzano al posto degli anticorpi, come elementi biologici, gli aptameri. In particolare per la determinazione dell'Ocratossina A (OTA) sono state sviluppate delle colonnine di

estrazione su fase solida contenenti aptameri specifici per l'OTA [De Girolamo, A. et al., 2011]. Per garantire l'affidabilità di un dato analitico è necessario disporre di metodi analitici validati: il CEN (Comitato Europeo di Normalizzazione) ha emanato una norma che fissa criteri specifici per caratterizzare le performance di un metodo di analisi per la determinazione di micotossine, tenendo conto di ripetibilità, riproducibilità, fattori di recupero, solventi di estrazione, applicabilità e tipologia di matrici. Per l'Aflatossina B1 si fa riferimento al regolamento CEN/TC 275 WG5, i metodi validati sono:

- EN 12955; 1999, per la determinazione in mangimi di aflatossina B1 e la somma di aflatossine B1, B2, G1 e G2 in cereali, frutta con guscio e prodotti derivati, metodi HP-LC con derivatizzazione post colonna e purificazione con colonna di immunoaffinità;
- EN 14123; 2003, per la determinazione in mangimi di aflatossina B1 e la somma di aflatossine B1, B2, G1 e G2 in arachidi, pistacchi, fichi e paprica in polvere, metodo HPLC con derivatizzazione post-colonna e purificazione con colonna di immunoaffinità.

I metodi analitici per la determinazione della presenza e della concentrazione delle micotossine negli alimenti possono essere raggruppati in tre categorie:

- I metodi immunochimici
- I metodi cromatografici
- I biosensori

Le metodologie analitiche devono consentire la determinazione di micotossine, almeno al di sotto dei livelli specifici di regolamentazione. Infatti, la Commissione europea dal comitato di regolamentazione (ECR) ha stabilito il livello massimo accettabile per le micotossine :

- Per le aflatossine totali (AFB1, AFG1, AFB2, AFG2) presenti nei cereali, nelle arachidi e nella frutta secca per il consumo umano ,4 ng g⁻¹ e per l' AFB1, 2 ng g⁻¹
- Il livello massimo di AFM1 nel latte è di 0,05 ng mL⁻¹
- Il livello massimo per OTA è di 3 ug kg⁻¹ in tutte i prodotti a base di cereali destinati al consumo umano.

Generalmente si utilizzano test qualitativi o semi-quantitativi rapidi come screening per molti campioni (tendenzialmente con metodi immunochimici) e successive fasi di conferma con una precisa quantificazione per campioni risultati positivi (tendenzialmente con metodi cromatografici).

2.5.1. Metodi immunochimici

I metodi immunochimici possono essere utilizzati come metodi di screening per l'analisi su diverse matrici, quali cereali, latte, formaggi e fluidi biologici. Il metodo più utilizzato come analisi di screening di primo livello, di tipo qualitativo, semi-quantitativo o quantitativo, è il metodo immunochimico competitivo ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Per le aflatossine sono disponibili vari kit commerciali, alcuni dei quali validati da AOAC (Association of Analytical Communities) [Horwitz, W. et al., 1993]. I limiti di rilevabilità variano a seconda del tipo di test e di Aflatossina. Tra i vantaggi di questi metodi si possono citare: la preparazione del campione ridotta alla semplice estrazione, visti i minori problemi di interferenti presenti a causa dell'estrema selettività degli anticorpi; tempi di saggio contenuti in poche ore e possibilità di determinare diverse decine di campioni contemporaneamente; investimento strumentale estremamente contenuto. Tra gli svantaggi invece vanno ricordati la possibilità di avere falsi positivi e la difficoltà di determinare il contenuto di Aflatossine totali (Aflatossine B1, B2, G1 e G2). Sono disponibili anche colonne di immunoaffinità e biosensori ottici e acustici basati su approcci immunologici. Le colonne di immunoaffinità sono in genere usate per la purificazione e la concentrazione delle tossine da una matrice complessa, prima della rivelazione mediante altri metodi, ad esempio cromatografici. Tali colonne di immunoaffinità si basano sull'utilizzo di anticorpi monoclonali o policlonali opportunamente immobilizzati su di una fase solida. I vantaggi, rispetto ai metodi tradizionali di purificazione, sono molteplici: specificità dell'anticorpo che consente l'ottenimento di estratti privi di interferenze, l'applicabilità anche a matrici complesse, buona precisione, rapidità di esecuzione e limitato uso dei solventi. Gli immunosaggi, compresi quelli specifici per il dosaggio di piccole molecole come ad esempio i pesticidi possono presentarsi in diverse forme; immunosensori [Mosiello, L. 2003], saggi immunoenzimatici (ELISA), dipstick assay [Mosiello, L. 1998], immunocard e saggi immunologici Flow through [Paepens, C. 2004] (Fig.6).

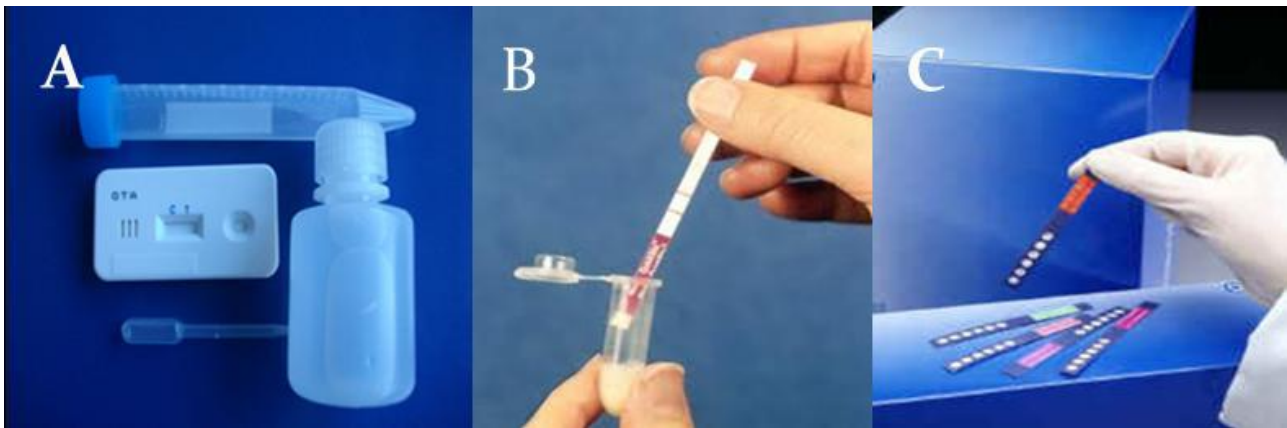


Fig.6 Esempi di vari test immunologici utilizzati per le analisi rapide. A) Immunoassay Flow-through B) Immunoassay Lateral Flow C) Immunoassay Dipstick

L'evoluzione successiva dei metodi immunologici appena citati è sicuramente rappresentata dai sistemi immunologici che dosano simultaneamente più micotossine [Lamberti, I. et al., 2008].

2.5.2. Tecniche cromatografiche

I metodi cromatografici permettono, oltre alla individuazione, anche la quantificazione delle micotossine, con notevole sensibilità e riproducibilità. Presentano però anche alcuni inconvenienti: il campione deve essere sottoposto a un processo di estrazione e purificazione perché l'analisi raggiunga la sensibilità indicata dai limiti di rilevabilità; i tempi di analisi sono piuttosto lunghi; i costi sono molto alti ed è indispensabile che l'analisi sia effettuata da personale specializzato e adeguatamente istruito all'interpretazione dei risultati. Per questi motivi i metodi cromatografici vengono utilizzati come metodo di conferma. Le procedure convenzionali per l'estrazione indicano come solventi acetone, cloroformio, etanolo o loro miscele. Piccole percentuali di acqua migliorano l'efficienza dell'estrazione. In passato è stata largamente utilizzata la cromatografia di strato sottile, TLC, (*Thin Layer Chromotography*) che consente di quantificare le aflatossine a livelli di 1 ng/g, [Trucksess, M.W. 1980]. Sebbene sia stata sostituita da altre tecniche cromatografiche che permettono analisi più accurate e precise, è comunque impiegata in quanto non richiede apparecchiature particolarmente costose e sofisticate e i tempi di analisi sono brevi: è infatti considerato un metodo d'analisi rapido. Attualmente viene utilizzata l'HPLC (*High-Performance Liquid Chromotography*), (Fig.7) in quanto presenta una serie di vantaggi tra i quali, un'elevata sensibilità, accuratezza inoltre è un metodo automatizzato [Omurtag, G.Z. 2004].



Fig.7 Il cromatografo HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

In particolare l'HPLC si rivela un metodo prezioso quando nella matrice sono presenti concentrazioni molto basse di tossina come ad esempio per l'Aflatossina M1 nel latte. La cromatografia liquida in fase inversa (Reverse Phase LC, RP-LC) è tra i metodi maggiormente utilizzati [Xu, B.J. 2003; Yang, M.H. 2005]. La gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa molto impiegata per la ricerca di altri contaminanti chimici degli alimenti, ha avuto al contrario poca diffusione per l'applicazione sulle micotossine dal momento che la gran parte di queste molecole non sono volatili [Ventura, M. 2004].

2.5.3 Biosensori

L'importanza di biosensori si basa sulla loro elevata specificità e sensibilità, che permette la rilevazione di un ampio spettro di analiti in campioni complessi con un minimo pretrattamento dei campioni [Draisci, R. et al., 1998; Moscone, D. et al., 1999]. I biosensori sono costituiti da componenti di riconoscimento biologico come enzimi, tessuti, acidi nucleici, anticorpi, animali o vegetali in intimo contatto con il trasduttore di segnale chimico-fisico [Ye, J. et al., 1997; Rishpon, J. 1997]. Di seguito sono riportati alcuni biosensori utilizzati per la determinazione dei contaminanti alimentari, e in particolare per le micotossine.

- Immunosensori Elettrochimici

Quando un anticorpi o frammenti di anticorpo sono usati come elemento di riconoscimento molecolare per analiti specifici (antigeni) per formare un complesso stabile, il dispositivo è chiamato immunosensore. A seconda del metodo di

trasduzione del segnale gli immunosensori si possono suddividere in quattro gruppi base [Luppa, P.B. et al., 2001]:

- Elettrochimici
- Ottici
- Piezoelettrici
- Termometrica

Gli anticorpi o gli antigeni a seconda del format che scegliamo sono marcati con una molecola che mi consenta di vedere se è avvenuto il binding. Per la marcatura si possono utilizzare diversi metodi di rilevamento (per esempio la perossidasi di rafano può essere impiegato per immunosensori elettrochimici o ancora per la rivelazione chemiluminescente può utilizzare un sensore a fibra ottica). La maggior parte degli immunosensori sviluppati utilizzano per l'analisi un saggio competitivo se le molecole hanno un peso molecolare (PM) basso (cioè erbicidi, tossine) o a sandwich se le molecole hanno un PM alto (proteine, cellule) [Marquette, C.A. 2006].

I due approcci possono essere seguiti per lo sviluppo di immunosensori competitivi: un primo format in cui gli anticorpi (Ab) sono immobilizzati sul supporto e reagiscono con gli antigeni liberi (Ag) che competono con gli antigeni marcati (Ag*) per il legame con l'anticorpo (Fig. 8A) o un secondo format in cui gli antigeni sono immobilizzati sul supporto e competono con gli antigeni presenti in soluzione per gli anticorpi liberi marcati (Ab*) (Fig.8D). Al fine di favorire l'immobilizzazione e l'interazione con l'anticorpo, gli antigeni, soprattutto quelli a basso peso molecolare, sono solitamente coniugati con una proteina (vale a dire Ag-BSA, Ag-KLH, Ag-OVA). Entrambi questi approcci sono definiti, immunosaggi competitivi diretti. Il secondo format è generalmente preferito e elude tutti i problemi legati all'immobilizzazione dell' anticorpo (perdita di affinità e del corretto orientamento dell'anticorpo) e viene utilizzato anche quando gli enzimi coniugati agli anticorpi primari non sono disponibili per l'analita selezionato. In questo caso viene usato per la marcatura un enzima anti-IgG (comunemente chiamato anticorpo secondario), che si lega alla regione Fc dell'anticorpo primario ed il format è indicato come immunodosaggio competitivo indiretto (Fig.8E). In un saggio a sandwich, dopo l'interazione tra gli anticorpi immobilizzati (Ab) e gli antigeni liberi, vengono aggiunti gli anticorpi marcati (Ab*, si legano su un secondo sito di legame per l'antigene), a questo punto, l' Ag è "sandwich" tra due anticorpi (Ab e Ab*) (Fig.8B). I trasduttori, come i sensori piezoelettrici (microbilancia ai cristalli di quarzo, QCM) e i sensori ottici basati sulla *Surface Plasmon Resonance* (SPR), consentono un sistema di rilevamento label free con una quantificazione diretta del

immunocomplesso (Ab-Ag). Per l' SPR e il QCM, solo alcuni esempi si basano sull'uso di un saggio diretto, dove viene rilevato il legame semplice tra antigene ed un anticorpo (Fig.8C e F).

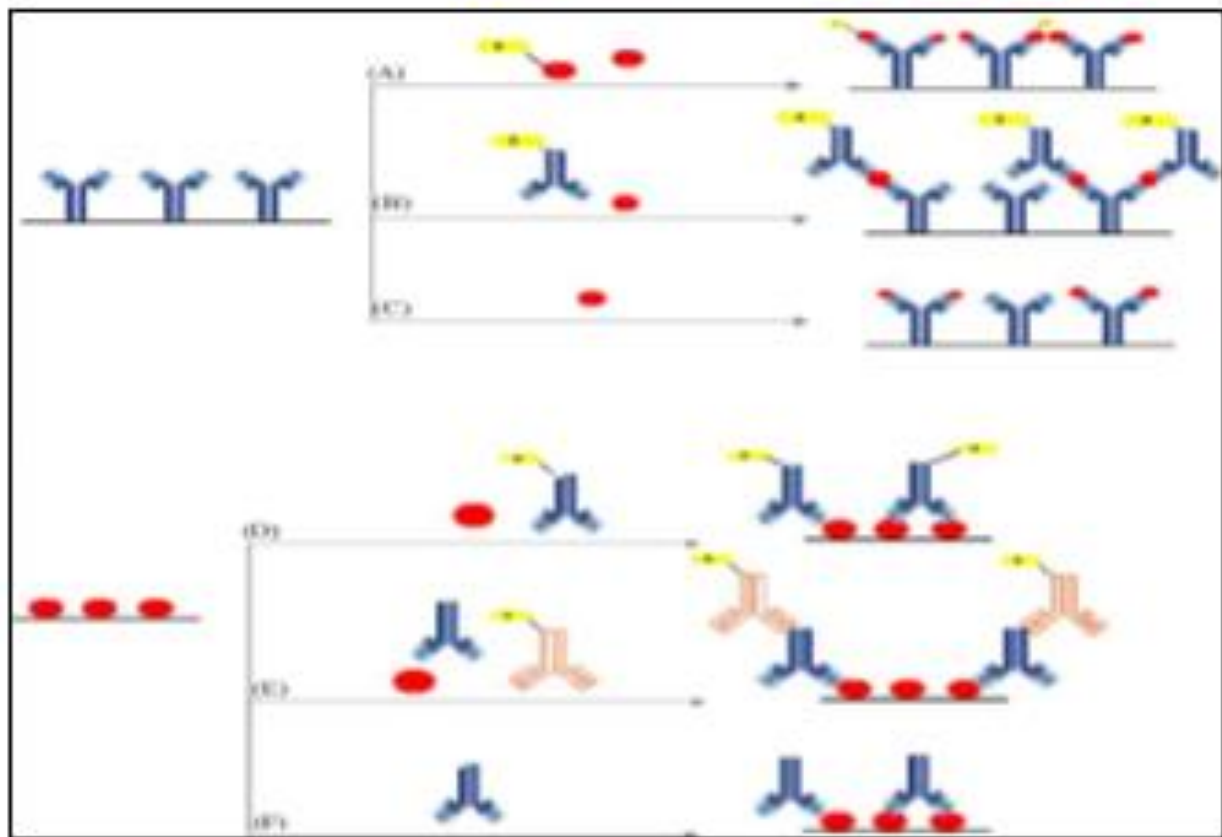


Fig.8 Immunoassay format. L'anticorpo (Ab) è immobilizzato sul supporto: (A) saggio competitivo diretto con l'antigene (Ag) marcato con l'enzima; (B) saggio a sandwich utilizzando anticorpi marcati con l'enzima; (C) test diretti (per SPR e QCM). (In basso) Antigeni (Ag) immobilizzati sul supporto: (D) saggio diretto competitivo con l'AB primario marcato con L' enzima; (E) saggio indiretto competitiva utilizzando un anticorpo secondario marcato con l'enzima. (F) dosaggio diretto (per SPR e QCM).

Rispondendo alla necessità di conseguire un elevato livello di sensibilità per la determinazione delle micotossine, sono stati recentemente riportati in letteratura diversi immunosensori elettrochimici per la rilevazione in particolare di AFB1 nel mais e nell'orzo [Piermarini, S. et al., 2007] e di AFM1 nel latte [Micheli, L. et al., 2006]. In particolare, per la determinazione dell'AFB1, è stato utilizzato un immunoassay competitivo indiretto (Fig8E) utilizzando monouso elettrodi screen-printed di carbonio (Fig.9).

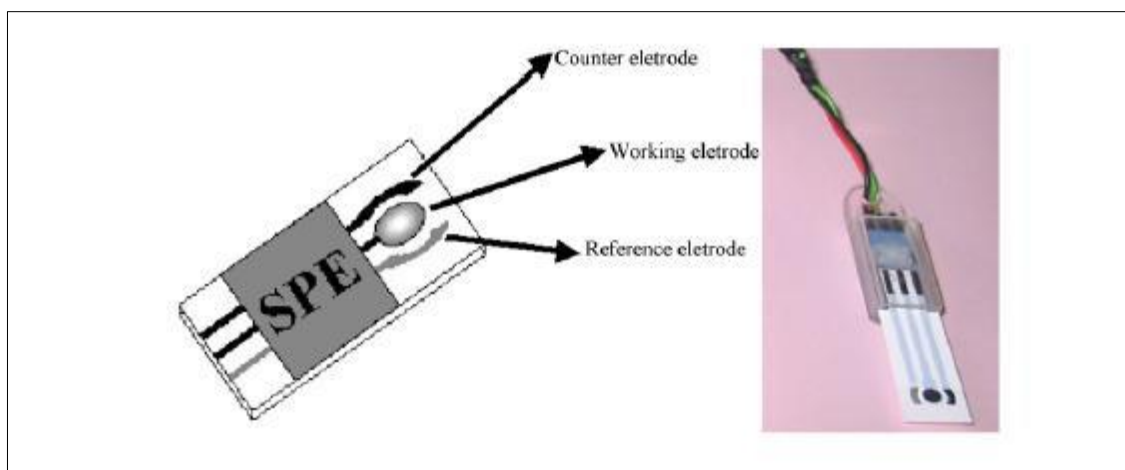


Fig.9 Schema (a sinistra) e figura (a destra) di un comune elettrodo screen-printed

La specificità dei test è stata valutata studiando la cross-reattività del MAb verso altre aflatossine. I risultati hanno indicato che il MAb potrebbe distinguere facilmente l'AFB1 da altre tossine, con l'eccezione di AFG1. Il sistema proposto ha mostrato un basso effetto matrice per l'orzo e un buon recupero dei campioni. I risultati ottenuti sono stati confermati mediante l'HPLC accoppiato con rivelazione di fluorescenza. Recentemente Piermarini et al. [Piermarini, S. et al., 2007] ha apportato un miglioramento rispetto ai metodi precedentemente descritti, per la determinazione di AFB1 nel mais utilizzando un piattaforma elettrochimica multicanale (Fig.10).

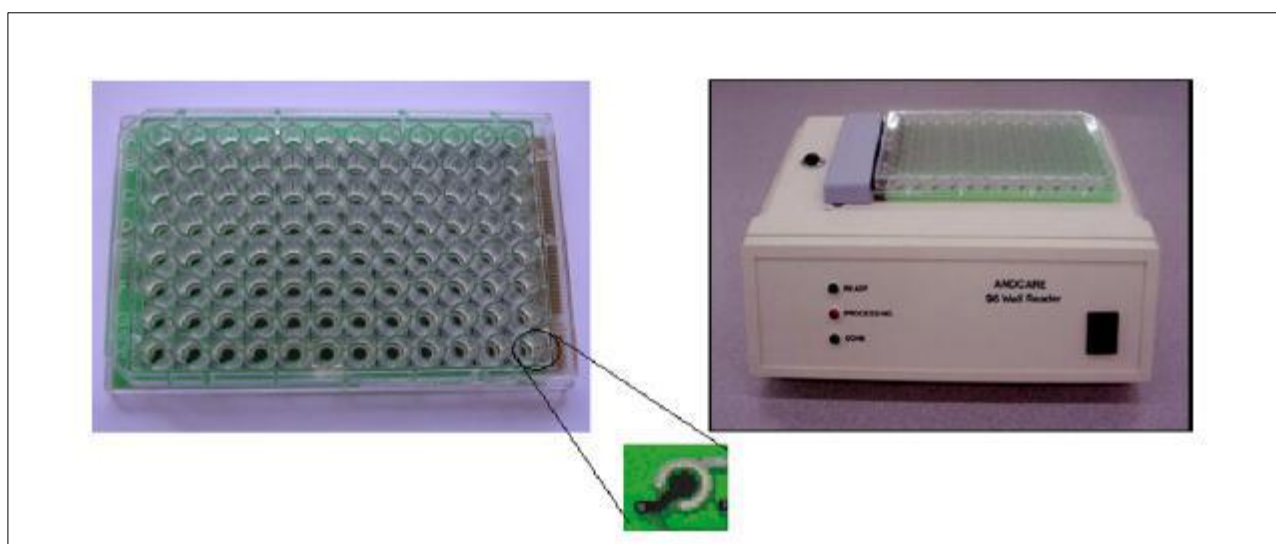


Fig.10 Piattaforma multicanale per immunosaggi elettrochimici (MEI) (a sinistra), il primo piano di un singolo pozzetto e il lettore (a destra).

Un sistema di biosensing (un sistema in cui il materiale biologico viene immobilizzato su una fase solida, ma non in intimo contatto con il trasduttore) è stato realizzato da Badea et al. [Badea, M. 2004] per il rilevamento di AFM1 nel latte crudo. Questo metodo automatizzato e a basso costo combina la rapidità e la

riproducibilità del flow-injection con l'elevata selettività e sensibilità delle reazioni immunochimiche. Il metodo proposto è un adattamento dell' immunodosaggio flow-injection (FI-IA) basato sulla rilevazione amperometrica della perossidasi di rafano (HRP), utilizzata come marcatore enzimatico dell'analita nell'eluato. Lo schema generico di questo sistema (Fig.11) si basa sull' incubazione dell' antigene (Ag), del tracciante (Ag*, enzima-antigene marcato) e dell'anticorpo (Ab) fino al raggiungimento dell'equilibrio.

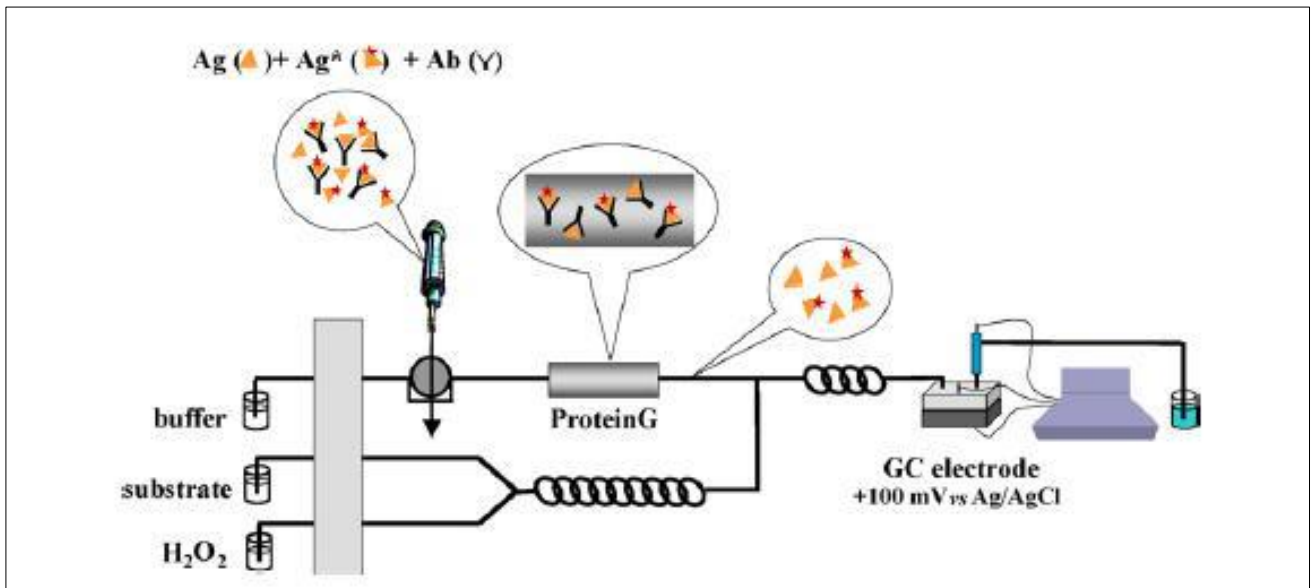


Fig.11 Schema di un sistema a flusso (FI-IA). Il sistema è basato sulla rilevazione amperometrica dell' enzima perossidasi (HRP). Ag = antigene, l'antigene Ag * marcato con HRP; Ab = anticorpo primario.

Quindi, questa miscela è stata introdotta in un sistema a flusso dove il complesso antigene-anticorpo (Ab-Ag e Ab-Ag*) è intrappolato su una colonna Protein G, mentre l'antigene libero coniugato con l'HRP è stato eluito e rilevato attraverso la rivelazione amperometrica dell'attività enzimatica. Diversi campioni di latte sono stati analizzati e i risultati erano in buon accordo con quelli ottenuti mediante l'HPLC. Entrambi i metodi elettrochimici (immunosensori e FI-IA) presentano come svantaggio il fatto che per le analisi è necessario un campione di latte non trattato.

- Biosensori ottici

Sebbene i metodi di trasduzione elettrochimici sono ampiamente utilizzati, i sistemi basati su biosensori ottici si sono rivelati altrettanto validi per la detection di analiti target e in particolare per la determinazione delle micotossine. I biosensori ottici possono impiegare un numero elevato di tecniche per rilevare la presenza dell'analita

bersaglio e si basano su metodi quali la chemiluminescenza, l'assorbanza, la fluorescenza, la fluorescenza e la polarizzazione della luce. Tra i metodi ottici, l'SPR (*Surface Plasmon Resonance*) è attualmente la tecnica più utilizzata [Rich, R.L. et al., 2005 ; Karlsson, R. 2004].

- SPR (Surface Plasmon Resonance)

Sono stati condotti diversi studi sull'uso della tecnologia SPR per l'analisi di micotossine e alcuni risultati sono molto promettenti [Daly, S.J. et al., 2000; Mullett, W. et al., 1998]. Sono state analizzate simultaneamente diverse micotossine, quali; l'Aflatossina B1, lo Zearalenone, l'Ocratossina A e la Fumonisina B1 in un intervallo di tempo di 25 min, con limiti di rilevabilità rispettivamente per ogni micotossina di 0.2, 0.01, 0.1, 50ppb [Van der Gaag, B. et al., 2003]. Il metodo SPR ha diversi vantaggi, quali:

- E' necessario un volume molto piccolo di campione (in unità l L)
- Il chip di metallo può essere riutilizzato
- Può rilevare la cinetica della reazione anticorpo-antigene
- Può rilevare una vasta gamma di analiti
- Il metodo è semplice.

Tuttavia, la sensibilità può essere un ostacolo per alcuni sistemi di SPR. Inoltre, la strumentazione richiesta per l'SPR è molto costosa.

- Immunosensore a fibra ottica

Negli immunosensori a fibra ottica viene generata un'onda evanescente all'interfaccia tra una fibra ottica e un materiale con un indice di rifrazione più basso (Fig.12). Le molecole fluorescenti in questa regione possono assorbire l'energia dall'onda evanescente ed emettere fluorescenza. Una porzione della fluorescenza è "retro-accoppiata" alla fibra e può essere rivelata. Il segnale generato nel saggio corrisponde alla concentrazione dell'antigene contro cui è diretto l'anticorpo. E' stato condotto uno studio sul rilevamento della Fumonisina B1 utilizzando un immunosensore a fibra ottica, questo sistema presenta un'elevata specificità (range di detection 10-1000 ng / mL con un limite di rilevamento di 10 ng / mL) [Thompson, V.S. et al., 1996]. I vantaggi di questa tecnica, sviluppata per esempio per la rivelazione di tossine, sono: alta specificità, miniaturizzabilità e possibilità di effettuare monitoraggio in tempo reale; un limite è la sensibilità.

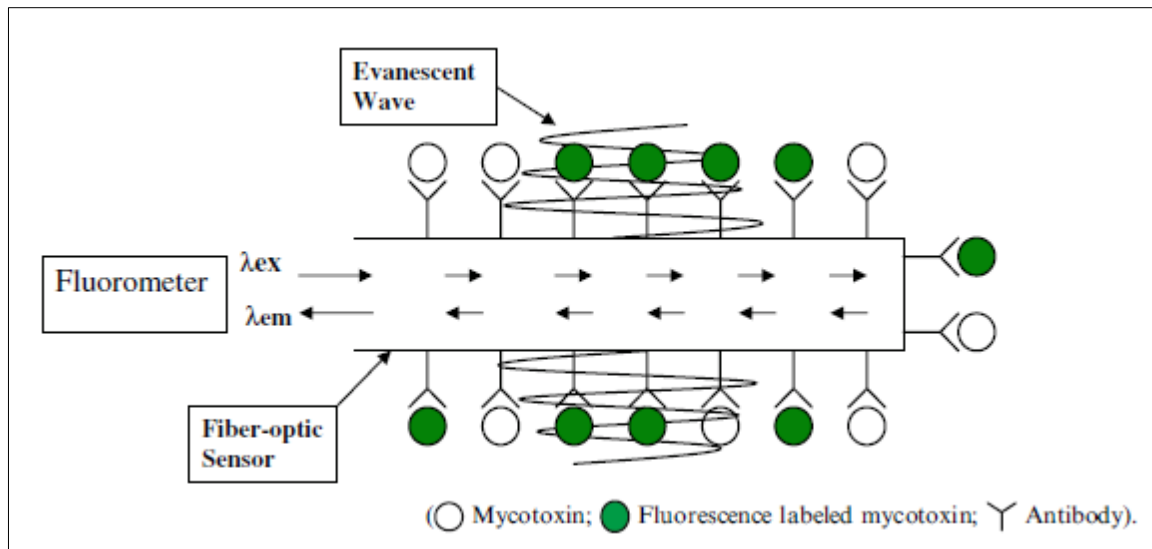


Fig.12 Schema generale di un immunosensore a fibra ottica

2.6. Il problema del campionamento

Appare ormai chiaro come la necessità di disporre di metodi in grado di rilevare, rapidamente e a basso costo, concentrazioni molto basse di micotossine negli alimenti, renda indispensabile il continuo miglioramento delle tecniche analitiche. Bisogna, tuttavia, sottolineare che anche le tecnologie più sofisticate, come ad esempio i biosensori, non saranno mai sufficienti, a garantire una corretta valutazione del livello di contaminazione se a monte non sarà effettuato un corretto campionamento. Errate procedure di campionamento rappresentano, nel caso della contaminazione da micotossine, la fonte principale di errore, soprattutto perché tali analiti possono essere distribuiti in modo eterogeneo all'interno del campione. L'ampiezza dell'errore dovuto al campionamento è molto più grande di quella derivante dall'analisi. Tutte le operazioni di campionamento dovrebbero essere condotte in condizioni tali non soltanto da garantire la sicurezza degli operatori, ma anche la protezione del campione da eventuali contaminazioni esterne. La quantità di campione, per essere adeguata all'analisi delle micotossine, deve essere il più possibile rappresentativa della partita iniziale da campionare, considerando che la distribuzione delle micotossine è molto variabile in funzione del tipo di matrice da campionare. Le matrici liquide, come il latte, sono considerate omogenee e un adeguato campionamento richiede in genere soltanto un'accurata agitazione del prodotto prima di effettuare i prelievi dei campioni destinati all'analisi delle micotossine. Nei prelievi di latte di massa effettuati in azienda, ad esempi, il campionamento può essere effettuato direttamente dalla vasca di refrigerazione, dopo

aver azionato il sistema di miscelazione. Matrici quali le farine e i mangimi in polvere sono ritenuti abbastanza omogenei, anche se deve essere valutata la rappresentatività del campione anche in relazione alle condizioni di stoccaggio. Invece, nelle matrici quali le granelle, i seni, i fieni e gli insilati (cereali conservati nel silos) sono disomogenei e in genere la distribuzione delle micotossine è molto casuale. I cereali sono spesso stoccati in cumuli o silos generalmente di notevoli dimensioni; il prelievo di campioni rappresentativi da masse di questo tipo è molto difficoltoso e oneroso, inoltre la contaminazione da micotossine ha spesso una distribuzione a macchia di leopardo che rende difficile ottenere campioni adeguati, nonostante l'applicazione dei rigorosi protocolli di campionamento previsti dal Reg. CE 401/2006 [TECNOALIMENTI S.C.P.A,2006].

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali e metodi utilizzati per il coating dei cristalli di quarzo

Sodio Dodecil Solfato (SDS), acido cloridrico, mercaptoetanolo, DTT, anticorpo policlonale di coniglio per l'aflatossina B1 (Rabbit anti-Aflatossina B1), Aflatossina B1 (20 mg / ml in metanolo, di serie analitica) da *A. flavus* (*Aspergillus flavus*), sono stati acquistati dalla Sigma -Aldrich (St. Louis, USA). Sono state preparate soluzioni di AFB1 a diverse concentrazioni diluendo in modo seriale le soluzioni standard. Le soluzioni sono state conservate a 4 C al buio. Metanolo (99,5%), etanolo assoluto (99,9%), acetone (96%), sono stati acquistati dalla Slavus (Bratislava, SK). L'acqua Millipore è stato prodotto da uno strumento classico Purelab (ELGA, ParisIK, Francia). Colonne MicroSpin per la purificazione del DNA sono stati acquistati da GE Healthcare (Buckinghamshire, Regno Unito). Abbiamo usato tampone fosfato PBS * della composizione seguente 138 mM NaCl, 1,6 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, contenente 0.2 mM CaCl₂. Le HPLC DNA purificato aptameri sono stati acquistati da Thermo Fisher Scientific (Ulm, GermanyUSA, Massachusetts). Abbiamo usato il aptamero DNA ottimizzato che si lega selettivamente aflatossina B1 con la seguente composizione dei nucleotidi: 5'-tiolo GTT GGG CAC GTG TTG TCT CTC TGT GTC TCG TGC CCT TCG CTA GGC CCA CA-3'.

L'AFLAB1 è un potente cancerogeno è pertanto necessario evitare il contatto e lavorare in condizioni di sicurezza. I materiali contaminati devono essere adeguatamente scartati.

3.2 Immobilizzazione degli aptameri tiolati sulla superficie d'oro

Per la preparazione del aptasensore abbiamo usato quarzi AT-cut con una frequenza di 8 MHz, rivestito su entrambi i lati da strati sottili di oro che fungevano da elettrodi (area di lavoro 0,2 centimetri²). Gli aptameri sono stati immobilizzati sullo strato d'oro del sensore. A questo scopo il trasduttore è stato accuratamente pulito (vedere tabella 4 per i dettagli) e montato fra due anelli di silicio nella cella di incubazione.

Step di lavaggio	Tempo
Sodio Dodecil Solfato (SDS)	30'
H ₂ O	15'
Acetone	5'
Etanolo	5'
Metanolo	5'

Tab 4. Step di lavaggio del sensore

Precedentemente all'Immobilizzazione degli aptameri tiolati sullo strato d'oro, è stato usato il ditiotreitolo (DTT) come agente di deprotezione per il DNA tiolato, in quanto quest'ultimo ha la tendenza a formare dimeri in soluzione, specialmente in presenza di ossigeno. La dimerizzazione abbassa notevolmente l'efficienza di immobilizzazione del DNA sulla superficie d'oro. Il DTT (1 mM) è stato incubato con PBS * (+ 0,2 mM CaCl₂) e 1 aptamero DNA-tiolato-(5 mM) per 1 ora e lasciato reagire. Successivamente il DTT viene rimosso per filtrazione, utilizzando colonne MicroSpin e il campione viene purificato per centrifugazione. Il corretto ripiegamento dell'aptamero nella struttura nativa è anteriore alla sua immobilizzazione riscaldandolo in PBS* a 90° C per 3 min. La soluzione è stata raffreddata e poi lentamente riportata alla temperatura desiderata di 25 ± 1 ° C. Gli aptameri disciolti in tampone di legame (PBS *), in una concentrazione di 5 mM sono stati aggiunti alla superficie dell'elettrodo d'oro del cristallo di quarzo, precedentemente installato in una cella chiusa impedendo l'evaporazione del solvente, per 17 h. Successivamente gli elettrodi d'oro sono stati sciacquati in acqua deionizzata e asciugati con una leggera corrente di azoto gassoso e incubati con Mercaptoetanolo ad una concentrazione di 100µM per 30 minuti per rimuovere gli aptameri fisicamente assorbiti e per bloccare la superficie dell'elettrodo nudo, evitando così il legame non specifico. I cristalli rivestiti con gli aptameri sono stati installati in cella a flusso continuo. Il sensore è stato lavato con PBS* ad una portata di 50 microlitri al min-1 fino al raggiungimento della *baseline*, successivamente è stato introdotto l'analita, ogni soluzione è stata applicata e rimossa aspettando il raggiungimento della stabilizzazione dei due parametri (frequenza di risonanza e resistenza). Abbiamo cercato di rigenerare il cristallo con HCl, testando diverse concentrazioni di HCl (10 mM, 100 mM) a diversi tempi di esposizione (50 sec, 2 min, 3 min, 5 min) ma senza successo. Abbiamo anche cercato di utilizzare per la rigenerazione il sodio dodecil solfato (SDS 1%) per 3 min e urea (6 M) per 5 min con scarsi risultati (dati non riportati). Presumiamo che non sia possibile rigenerare il cristallo. Nella fig.13 è indicata lo schema dell'immunoassay sandwich utilizzato,

sulla superficie del cristallo di quarzo rivestito con gli aptameri è stato aggiunto all' AFLAB1 e dopo l'Ab contro AFLAB1, le interazioni aspecifiche sono state rimosse con il lavaggio in PBS*. L'interazione tra aptameri e anticorpi è stata testata per poter utilizzare queste biomolecole di affinità per il rilevamento dell' aflatossina B1. L'aggiunta di diverse concentrazioni di anticorpi policlonali (1 nM, 10nM, 100 nM) sulla superficie d'oro rivestita con gli aptameri non ha portato a una diminuzione della fs e ad un aumento di Rm e questo significa che non vi è interazione tra aptameri e anticorpi (questi risultati non sono mostrati).

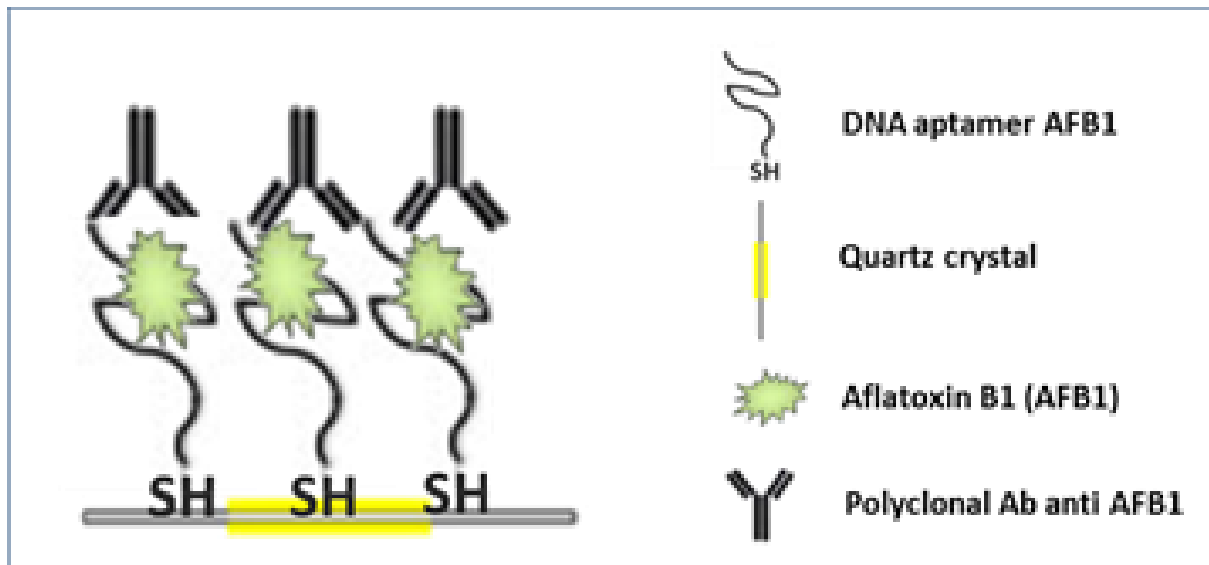


Fig. 13 Schema di immobilizzazione degli aptameri sulla superficie dell'elettrodo d'oro del cristallo di quarzo

Abbiamo utilizzato anche un buffer diverso (10 mM HEPES + 120 mM NaCl + 5 mM KCl + 20 mM CaCl₂, pH = 7) al fine di valutare il diverso funzionamento e scegliere quello che avesse presentato la migliore performance. L'aggiunta della aflatossina (0,01 ppb) diluita in tampone HEPES ha prodotto un complesso cambiamento della Rm e della fs. Dopo che la superficie del sensore era stata lavata in buffer, questo ha prodotto una instabilità del sistema (dati non mostrati). Questo fenomeno è probabilmente correlato all'effetto dei sali che possono modificare le proprietà superficiali ma l'instabilità del sistema è inspiegabile. Abbiamo deciso di continuare gli esperimenti con il PBS* come buffer.

3.3. Detection dell' Aflatossina B1

Il legame aptamero-AFLAB1 è stato analizzato mediante il QCM. Il QCM oltre alla massa determina anche il contributo di viscosità derivante dalla frizione tra il *biolayer* e il buffer circostante. Questo è importante per il rilevamento di piccole molecole, come l'AflaB1.. Un QCM è costituito da un disco sottile di quarzo

costituito da elettrodi in oro depositato su entrambi i lati del cristallo. A causa delle proprietà piezoelettriche e dell'orientamento del cristallo di quarzo, l'applicazione di una tensione tra gli elettrodi causa una deformazione del taglio del cristallo, per cui si genera un'onda acustica che si propaga attraverso lo strato sensibile nel liquido. Questa onda acustica può essere caratterizzata da processi di immagazzinamento e di dissipazione dell'energia. L'impedenza elettrica misurata dal sensore è collegato al complesso di impedenza acustica. La parte immaginaria dell'impedenza rappresenta l'accumulo di energia ed è proporzionale ad una variazione della frequenza di risonanza, f_s , mentre la parte reale è collegata alla dissipazione di energia ed è correlata alla resistenza meccanica, R_m . Ciò si riflette in un aumento della R_m e una diminuzione della f_s . Gli esperimenti sono stati eseguiti a $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Immunoassay a sandwich per la determinazione dell' Afla B1

Il biosensore QCM consente di verificare tutte le fasi di preparazione del sensore e di studiare il legame di aptameri-AFLAB1. Nella prima serie di esperimenti abbiamo studiato le variazioni della frequenza di risonanza, Δf , e della resistenza ΔR_m della superficie del cristallo di quarzo. Come si vede dalla fig. 14, l'aggiunta di AFLAB1 (0,05 ppb) ha causato una diminuzione della frequenza di 26 Hz e un aumento della resistenza di 6 Ω .

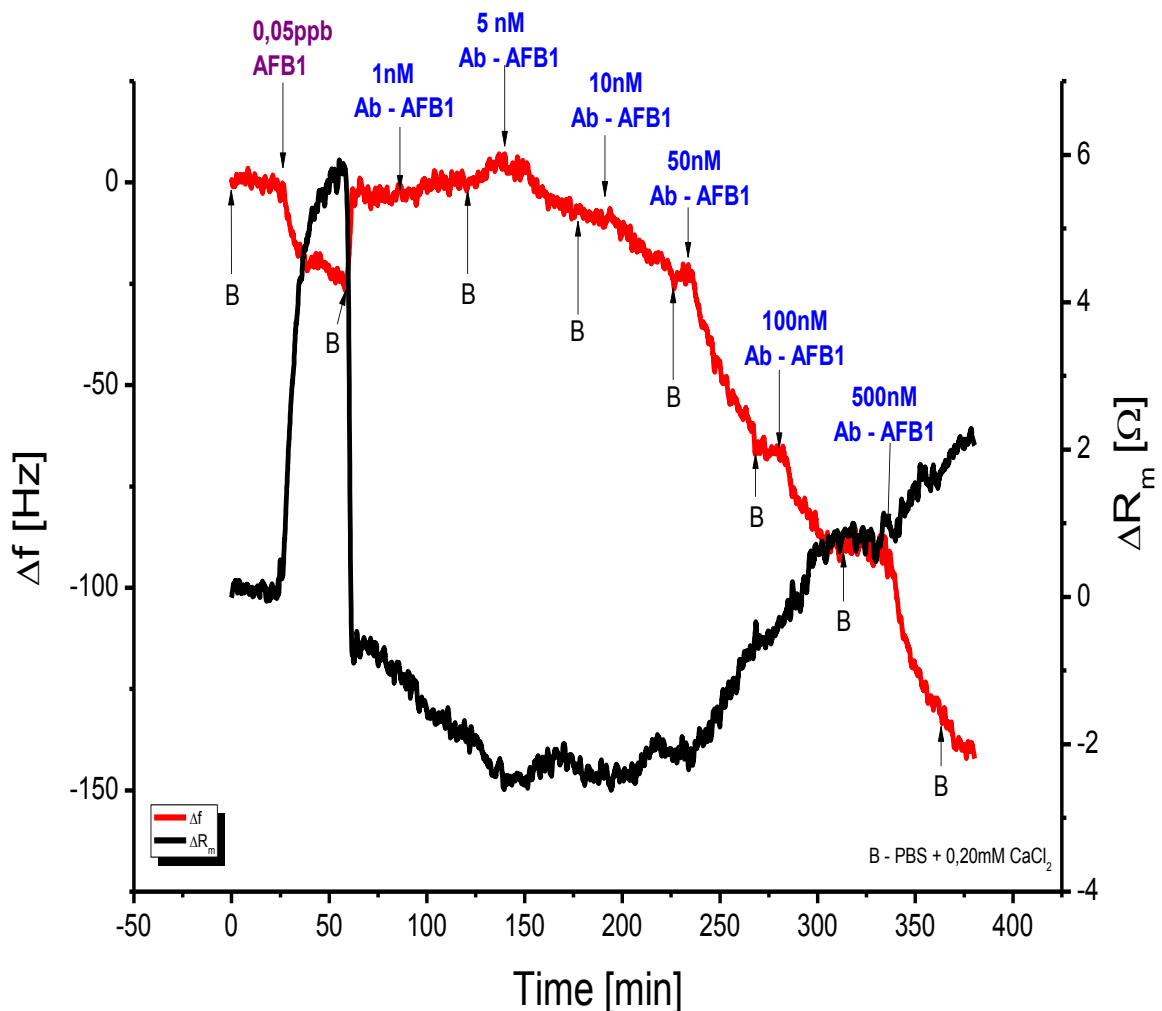


Fig.14 Grafico dei cambiamenti della frequenza di risonanza, Δf s (rosso), e della resistenza, ΔR_m (nero), a seguito dell'aggiunta di 0,05 ppb di AFLAB1 e diverse concentrazione di Ab policlonale anti AFLAB1

Tuttavia, dopo avere lavato in tampone (PBS*) per rimuovere le interazioni aspecifiche, abbiamo osservato un recupero sia della frequenza di risonanza sia della resistenza. Probabilmente ciò è dovuto alla piccola concentrazione dell' AFLAB1 e al basso peso molecolare (312,27 Da). Pertanto abbiamo utilizzato degli anticorpi policlonali anti AFLAB1 per amplificare il segnale. Il peso molecolare degli anticorpi è molto più grande (150 kDa), pertanto ci si può aspettare una maggiore variazione dei parametri acustici dopo il legame alla superficie. E' stato aggiunto l' anticorpo a diverse concentrazioni (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM) ed è stata osservata una sostanziale diminuzione della frequenza di risonanza e un aumento della resistenza soprattutto per le concentrazioni maggiori di Ab (> 50 nM), mentre per le concentrazioni di anticorpo (1-5 nM) non sono stati osservati cambiamenti significativi dei parametri misurati (fig.15).

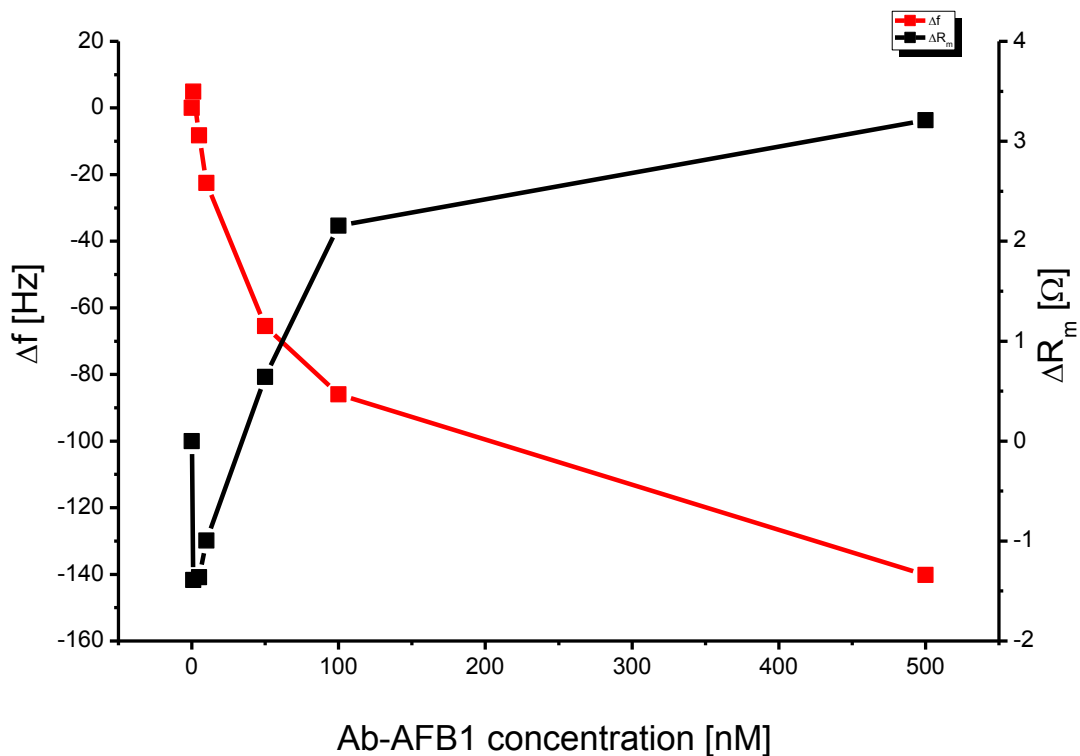


Fig.15 Relazione tra Δf (linea rossa) e la resistenza (linea nera) in funzione della concentrazione di Ab policlonale contro AFLAB1 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM e 500 nM aggiunto ad una superficie del sensore composto aptameri di DNA con AFLAB1 legato di concentrazione 0,01 ppb).

Si può notare che a concentrazioni superiori di Ab 10 nM ha avuto luogo la saturazione dei siti di legame delle biomolecole di affinità. In questi esperimenti,

condotti essenzialmente al fine di definire e caratterizzare il nostro sistema, abbiamo utilizzato un anticorpo policlonale contro AFLAB1 diluito in PBS*. Abbiamo anche testato diverse concentrazioni di aflatossina B1 (0,01 ppb, 0,1 ppb, 1 ppb) diluito in PBS*. L'AFLAB1 è stata introdotta nella cellula mediante una pompa a siringa con un flusso di 50 ul/min, e ogni soluzione è stata applicata fino al raggiungimento della stabilizzazione della frequenza di risonanza. In Fig.16 è mostrata la relazione tra la frequenza di risonanza, Δf , e la resistenza ΔR_m , in funzione del tempo. L'aggiunta della prima concentrazione di AFLAB1 ha comportato una riduzione della f_s di 16 Hz e un incremento della R_m di 0,5 Ω . Dopo l'ultima concentrazione di AFLAB1 (1ppb) abbiamo aggiunto l'Ab anti AFLAB1 (100nM) e ciò ha causato una diminuzione della f_s di 51Hz e un aumento della R_m di 0,75 Ω . Dopo l'ultimo step abbiamo cercato di rigenerare il sensore con HCl (100 mM). L'HCl è stato aggiunto in cella ad una velocità di flusso di 90 ul/min a diversi tempi di esposizione (50 sec, 2 min, 5 min), come mostrato in fig. 16 questo ha prodotto un forte aumento della f_s , ma dopo il lavaggio in buffer la f_s è diminuita ed è tornata al valore iniziale prima della rigenerazione. Probabilmente l'esposizione a tale sostanza non è efficiente per rimuovere gli anticorpi e le aflatossine e rigenerare il cristallo.

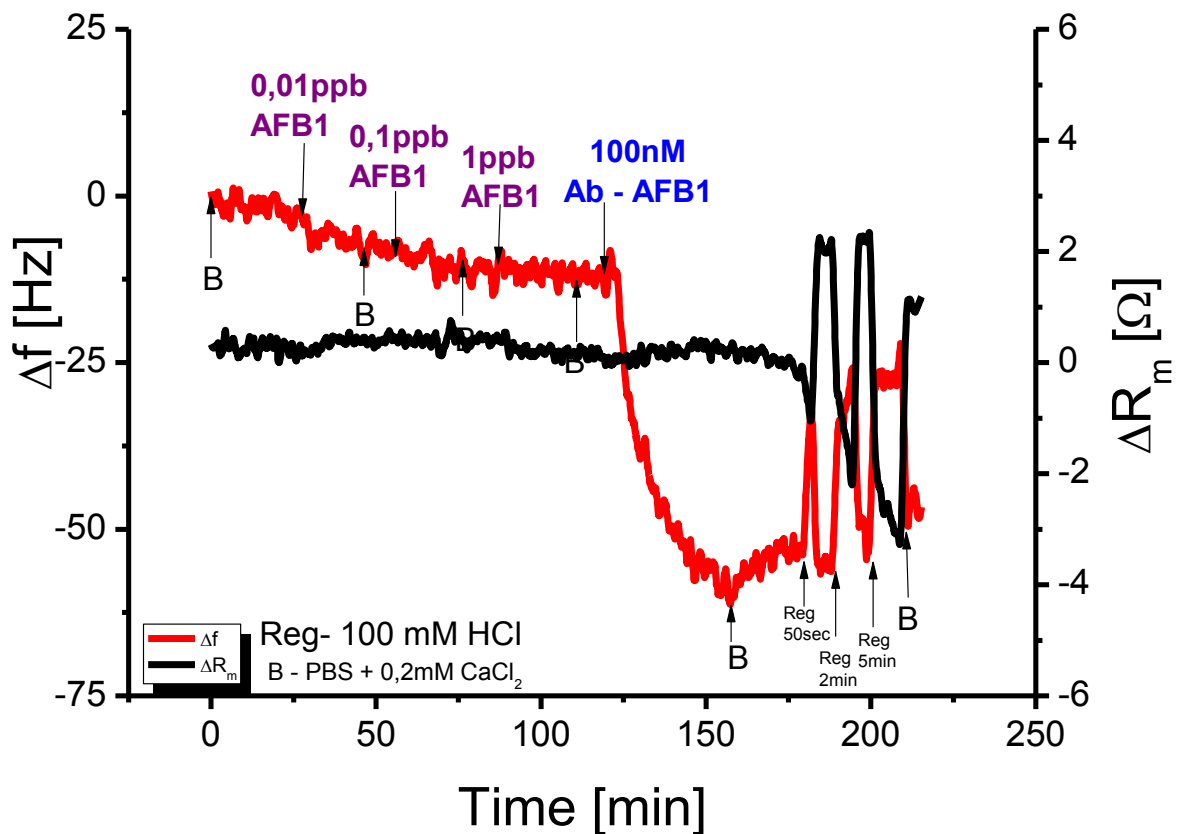


Fig.16 Grafico dei cambiamenti della frequenza di risonanza e della resistenza mediante aggiunta dell' AFLAB1 in un range di concentrazioni 0,01-1 ppb.

Per comprendere quale concentrazione di anticorpi usare, abbiamo utilizzato una ampio range di concentrazioni di Ab diluiti in PBS* (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM). Prima di aggiungere l'anticorpo, abbiamo introdotto l'AFLAB1 (0,01 ppb in PBS *) nella cella di flusso per 25 min e lavato in PBS*. L'aggiunta di AFLAB1 ha comportato una bassa diminuzione della fs, e probabilmente ciò è dovuto alla bassa concentrazione e al basso peso molecolare dell'analita (fig.17).

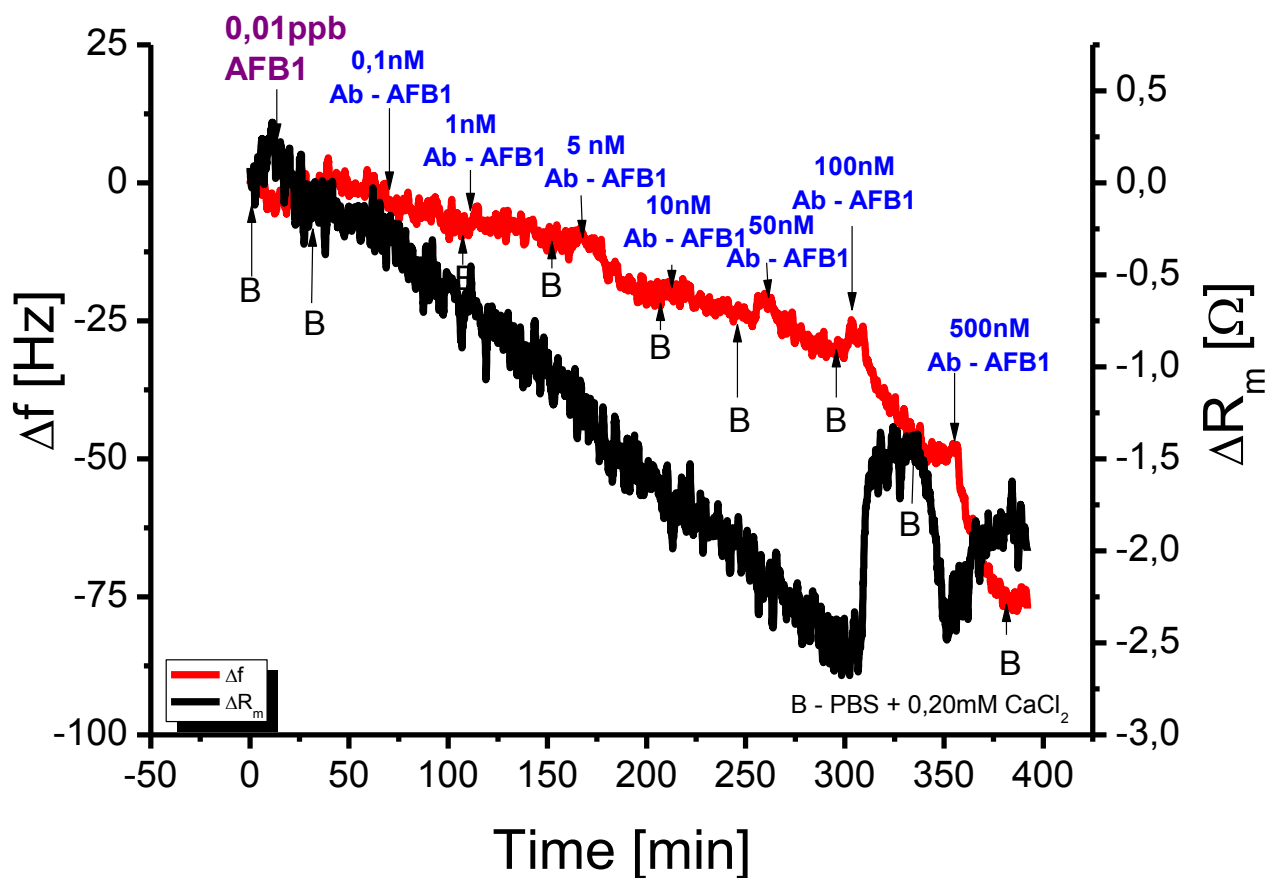
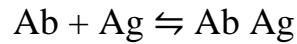


Fig.17 Grafico dei cambiamenti della frequenza di risonanza, Δf_s (rosso), e della resistenz, ΔR_m (nero), a seguito dell'aggiunta di AFLAB1 0,01 ppb e dell'Ab policlonale contro AFLAB1 (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM) sulla superficie del cristallo di quarzo.

Dopo il lavaggio in PBS* sono state introdotte diverse concentrazioni di anticorpi, in Fig.17 sono mostrati i cambiamenti della frequenza di risonanza, Δf_s e della resistenza, ΔR_m , in funzione della diversa concentrazione di Ab anti AFLAB1.

L'aggiunta delle prime concentrazioni di anticorpo (0,1 nM e 1nM) non riducono la fs in modo significativo, al contrario l'aggiunta di Ab 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM hanno causato una forte diminuzione della fs e un aumento della Rm. Questi risultati dimostrano che gli aptameri e gli anticorpi sono sensibili e legano diverse

porzioni della micotossina, aflatoxina B1. Da questo esperimento possiamo ricavare le costanti cinetiche dell'interazione Ab-Ag mostrate nella tabella 5. La formazione del complesso Ag-Ab è definita dall'equazione:



$$K_a = [Abag] / [AB] [Ag] = 1/k_d$$

dove K_a è la costante di affinità dell'anticorpo-antigene e K_d è la costante di dissociazione del complesso antigene-anticorpo ed è pari ad $1/K_a$.

	ka M⁻¹s⁻¹	kd s⁻¹	Kd M	Ka M⁻¹
AbAFLB1	813,83031	8,23654E-4	1,01207E-6	988073,30579

Tab.5 I valori delle costanti cinetiche e di affinità per il complesso Ab-AFLAB1

L'affinità è generalmente espressa con la costante di dissociazione (K_d), che indica quanto sia facile separare il complesso antigene-anticorpo. Una bassa K_d indica una maggiore affinità (solitamente anticorpi con alta affinità hanno una $K_d < 10$ M.).

Nella Fig.18 è mostrato un grafico riassuntivo, dove abbiamo confrontato 3 differenti esperimenti:

- **Katia 21;** prova AFLAB1 0,01 ppb e aggiunta di Ab-AFLAB1 (0,1 nM, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM)
- **Katia 16;** prova AFLAB1 0,05 ppb e aggiunta di Ab-AFLAB1 (1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM)
- **Katia 13;** prova AFLAB1 1 ppb e aggiunta di Ab-AFLAB1 (1 nM, 10 nM, 100 nM)

Il grafico mostra le variazioni della frequenza di risonanza serie, Δf_s , dovute alla aggiunta di AFLAB1 in relazione a diverse concentrazioni di anticorpo.

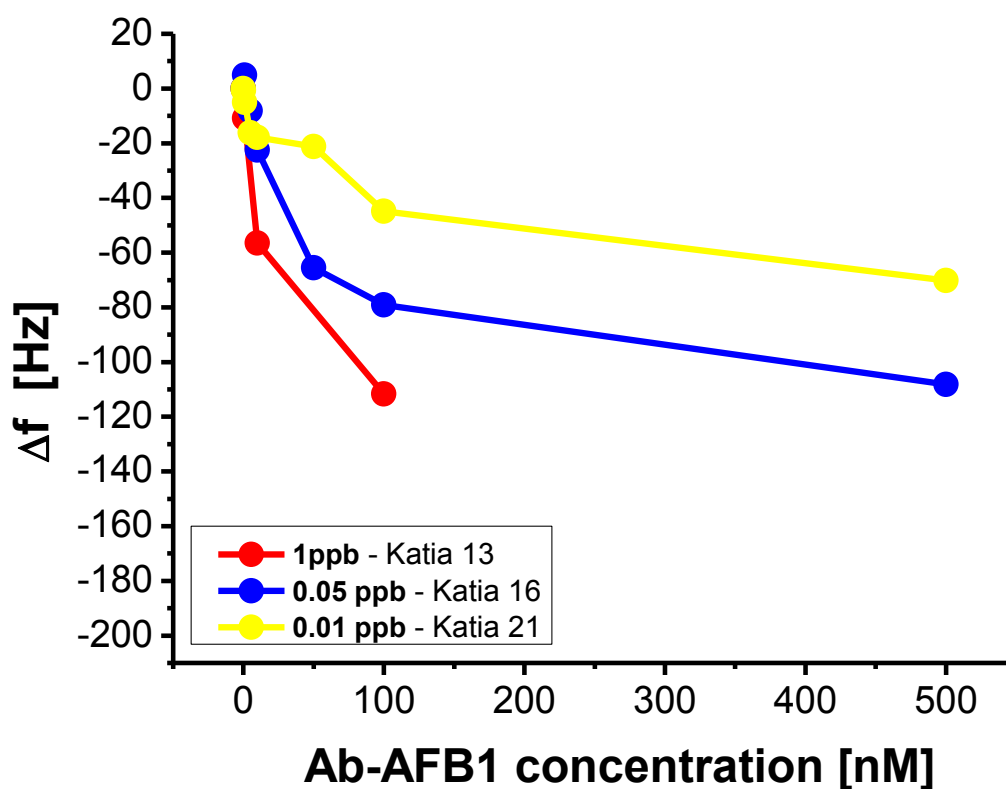


Fig.18 Grafico riassuntivo della dipendenza delle variazioni di frequenza di risonanza, Δf , in relazione alla concentrazione di Ab policlonale contro l'AFLAB1

Prima dell'aggiunta dell'anticorpo, abbiamo introdotto l'AFLAB1 nella cella di flusso. L'aggiunta di una bassa concentrazione di anticorpi (1 nM) ha ridotto il fs di ~ 10Hz (come indicato per l'esperimento 13, 16, 21). Abbiamo testato diverse concentrazioni di anticorpi per scegliere quella che mostrava migliori risultati in termini di amplificazione del segnale.

BIBLIOGRAFIA

1. Atroshi, F., Biese, I., Saloniemi, H., Ali-Vehmas, T., Saari, S., Rizzo, A. and Veijalainen, P.N. (2000). Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3:281-291.
2. Autrup, H., Bradley, K.A., Shamsuddin, A.K.M., Wakhisi, J. and Wasunna, A. (1983). Detection of a putative adduct with fluorescence characteristics identical to 2,3-dihydro-2-(7-guanyl)-3-hydroxy aflatoxin B₁ in human urine collected in Muranga district, Kenya. *Carcinogenesis* 4:1193-1195.
3. Badea, M., Micheli, L., Messia, M.C., Candigliota, T., Marconi E., Mottram, T., Velasco-Garcia, M., Moscone, D. and Palleschi, G. (2004). Aflatoxin M₁ determination in raw milk using a flow-injection immunoassay system. *Analytica Chimica Acta*. vol. 520, pp. 141-148.
4. Beate S., Nadia N., and Stoltenburg, R. (2008) Protein Detection with Aptamer Biosensors. *Sensors* 2008, 8, 4296-4307,
5. Bennett, J.W. and Keller, N.P. (1997). Mycotoxins and their prevention. In T. Anke, Editor, *Fungal Biotechnology*, International Thompson Publishing Company, Weinheim. 265-273
6. Castillo, G., Lamberti, I., Mosiello, L. and Hianik, T. (2012). High-sensitive impedimetric aptasensor for detection ochratoxin A in food. *Lecture Notes in Electrical Engineering*. 109 LNEE, 31 - 35.
7. Daly, S.J, Keating, G.J., Dillon, P.P., Manning, B.M., O'Knnedy, R., Lee, H.A. and Morgan, M.R.A. (2000). Development of surface plasmon resonance-based immunoassay for aflatoxin B-1. *Journal of agricultural and food chemistry* 48:5097-5014.
8. De Girolamo, A., McKeague, M., Miller, D.J., DeRosa, M.C. and Visconti, A. (2011). Determination of ochratoxin A in wheat after clean-up through a DNA aptamer-based solid phase extraction column. *Food Chemistry* 127: 1378-1384.
9. Draisci, R., Volpe, G., Lucentini, L., Cecilia, A., Federico, R. and Palleschi, G. (1998). Determination of biogenic amines with an electrochemical biosensor and its application to salted anchovies. *Food chemistry* 62, 225-232.
10. Eaton, D.L. and Gallagher, E.P. (1994). Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:135-172.

11. Famulok M. (1999) Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Current Opinion in Structural Biology* 1999, 9:324-329.
12. Gallagher, E.P., Kunze, K.L., Stapleton, P.L. and Eaton, D.L. (1996). The kinetics of aflatoxin B₁ oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P₄₅₀ 1A₂ and 3A₄. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 141:595-606.
13. Geiger A., Burgstaller P., Von der Eltz H., Roeder A., and Famulok M. (1996) RNA aptamers that bind l-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucl. Acids Res.* 24, 1029-1036,.
14. Groopman, J.D., Dematos, P., Egner, P.A., Love-Hunt, A. and Kensler, T.W. (1992). Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-N 7-guanine and serum aflatoxin-albumin adducts predicts chemoprotection by 1,2-dithiole-3-thione in rats. *Carcinogenesis* 13:101-106.
15. He, J., Liu, Y., Fan, M. and Liu, X. (2011). Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J. Agric Food Chem.* Mar 9;59(5):1582-6.
16. Horwitz, W., Albert, R and Nesheim, S. (1993). Reliability of mycotoxins assays. An update. *J. AOAC Int.*, 76:461-491.
17. Hsieh, D.P., Cullen, J.M. and Ruebner, B.H. (1984). Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B₁ and M₁ in the rat. *Food Chem. Toxicol.* 22:1027-1028.
18. Hussein, H.S. and Brasel J.M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 2, 101-134.
19. Jayasena S.D. (1999). Aptamers: An emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical Chemistry* 45:9 1628-1650.
20. Jellinek D. et al. (1995). Potent 2'-amino-2'-deoxypyrimidine RNA inhibitors of basic fibroblast growth factor. *Biochemistry* 34:11363-11372.
21. Karlsson, R. (2004). SPR for molecular interaction analysis, a review of emerging application areas. *J. Mol. Recognit.* 17:151-161.
22. Krska, R., Welzig, E., Berthiller, F., Molinelli, A. and Mizaikoff, B. (2005). Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. *Food Additives and Contaminants.* 22:345-353.
23. Lamberti, I., Mosiello, L. and Hianikc, T. (2011). Development of thickness shear mode biosensor based on DNA aptamers for detection of ochratoxin A. *Chemical Sensors* 1, 11
24. Luppa, P.B., Sokoll, L.J., Chan, D.W. (2001). Immunosensors principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta* 314, 1-26.

25. Marquette, C.A. and Blum, L.J. (2006). State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens. Bioelectron.* 21; 1424-1433
26. Meneghini, R and Schumacher, R.I. (1977). Aflatoxin B₁, a selective inhibitor of DNA synthesis in mammalian cells. *Chem Biol. Interact.* 18:267-276.
27. Micheli, L., Grecco, R., Badea, M., Moscone, D. and Palleschi, G. (2006). An electrochemical immunosensor for aflatoxin M₁ determination in milk using screen printed electrodes” *Biosensor and bioelectronics* 21:1424-1433.
28. Moscone, D., Bernardo, R., Marconi, E., Amine, A. and Palleschi, G. (1999). Rapid determination of lactulose in milk by microdialysis and biosensors. *Analyst* 124, 325- 9.
29. Mosiello, L., Nencini, L., Segre, L., Spanò, M. (1997). A fibre-optic immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid detection. *Sensors and actuators B* 39:353-359.
30. Mosiello, L., Cremisini, C., Segre, L., Chiavarini, S., Spanò, M., Kimmel, T., Baumner, A.J. and Schmid, R.D. (1998). Dipstick Immunoassay Format for Atrazine and Terbutylazine Analysis in Water Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46:3847-3851.
31. Mosiello, L., Laconi, C., Del Gallo, M., Ercole, C. and Lepidi, A. (2003). Development of a monoclonal antibody based potentiometric biosensor for terbutylazine detection. *Sensor and Actuators, B: Chemical.* 95:315-320.
32. Moss, M.O. (1996). Centenary review. Mycotoxins. *Mycol. Res.* 100:513-523
33. Mir, M., Katakis, I., and Vreeke, M. (2007) Aptamer biosensors: an alternative to immunosensors. *IVD Technology.*
34. Mullett, W., Lai, E.P.C. and Yeung, J.M. (1998). Immunoassay of fumonisin by a surface plasmon resonance biosensor. *Anal Biochem* 258: 161-167.
35. Niranjana, A. and Roy, S.K. (1982). The use of stomach cytochrome from the water snail *Pila globosa* in root tip squashes of ferns. *Stain Technol.* 57:188-190.
36. Omurtag, G.Z. and Yaziciolu, D. (2004). Determination of fumonisin B₁ and B₂ in herbal tea and medicinal plants in Turkey by high-performance liquid chromatography. *Journal of food protection.* 67:1782-1786.
37. Paepens, C., De Saeger, S., Sibanda, L., Barna-Vetrò, I., Leglise, I., Van Hove, F. and Van Peteghem, C. (2004). A flow-through enzyme immunoassay for the screening of fumonisin in maize. *Analytica Chimica Acta.* 523:229-235.
38. Piermarini, S., Volpe, G., Ricci, F., Micheli, L., Moscone, D., Palleschi, G., Fuhrer, M., Krska, R. and Baumgartner, S. (2007). Rapid Screening

- Electrochemical Methods for Aflatoxin B₁ and Type-A Trichothecenes: a preliminary study. *Anal. Lett.* 40:1333-1346.
39. Piermarini, S., Micheli, L., Ammida, N.H., Palleschi, G and Moscone, D. (2007). Electrochemical immunosensor array using a 69-well screen-printed microplate for aflatoxin B₁ detection. *Biosensors & Bioelectronics.* vol. 22, pp.1434-1440.
 40. Piva, G. and Pietri, A. (1996). Micotossine negli alimenti. Quaderni di igiene pubblica veterinaria, infezioni, micosi e micotossicosi di interesse medico e veterinario, pp 109-115. Regione Toscana Giunta Regionale, Dipartimento del diritto alla salute e delle politiche di solidarietà.
 41. Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, Itoh, P.M., Yamamoto, K., Tala-lay, M.P. and Kensler, T.W. (2001). Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3410-3415.
 42. Rich, R.L and Myszka, D-G. (2004). Why you should be using more SPR biosensor technology. *Drug Discov. Today Technol.* 1: 301-308.
 43. Rishpon, J. and Invitski, D. (1997). An amperometric-enzyme channeling immunosensors. *Biosens. Bioelectron.* 12 195-204.
 44. Smith, C.A., Woloshuk, C.P., Robertson, D. and Payne, G.A. (2007). Silencing of the ocratoxin gene cluster in a diploid strain of *Aspergillus flavus* is suppressed by ectopic aflR expression. *Genetics.* 176: 2077-2086.
 45. Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W. (1998). Review: mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.* 43:141-158.
 46. Tahiri-Alaoui A., Frigotto L., Manville N., Ibrahim J., Romby P., and James W. (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, No.10 e 45.
 47. Tang, D., Li, Q., Tang, J., Su, B. and Chen, G. (2011). An enzyme-free quartz crystal microbalance biosensor for sensitive glucose detection in biological fluids based on glucose/dextran displacement approach," *Analytica Chimica Acta*, vol. 686, pp. 144-149
 48. Thompson, V.S and Maragos, C.M. (1996). Fibre-optic immunosensors for the detection of fumonisin B₁. *J Agric Food Chem.* 44: 1041-1046.
 49. Tocco., G. Biosensori innovativi basati su lieviti per il monitoraggio di contaminanti ambientali e di prodotti agro-industriali. Technical report,

Progetto finanziato dalla Regione Lazio nell'ambito del Programma di Ricerca PRAL.

50. Tombelli, S., Mascini, M., and Turner, A.P.F. (2002). Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosens Bioelectron.* 17 (11-12), 929-936.
51. Trucksess, M.W. and Scott, P.M (2008). Micotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food additives and contaminants.* 25:181-192.
52. Van der Gaag, B., Spath, S., Dietrich, H., Stigter, E., Boonzaaijer, G., Van Osenbruggen, T and Koopal, K. (2003). Biosensors and multiple mycotoxin analysis. *Food Control*; 14: 251-254.
53. Xu, B.J., Wang, Q.J., Lee, J.H., Jia, X.Q. and Sung, C.K. (2003). Hplc analysis of citrinin in red yeast rice. *Food Science and. Biotechnology* 12:376-380.
54. Yamamoto R, Baba T, and Kumar PK. (2000) Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes Cells* 5:389-396,
55. Yang, M.H., Chen, J.M and Zhang, X.H (2005). Immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography with post-column derivatization for analysis of aflatoxins in traditional Chinese medicine. *Chromatographia* 62:499-504.
56. Ye, J., Letcher, S.V. and Rand, A.G. (1997). Piezoelectric biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *J. Food Sci.* 62 1067-1071.
57. You K.M., Lee S.H., Im A., and Lee S.B. (2003) Aptamers as functional Nucleic Acids: In Vitro Selection and Biotechnological Applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8:64-75.

DOCUMENTI E TESTI CONSULTATI

TECNOALIMENTI S.C.P.A. "Le Micotossine: Modalità di contaminazione rischi per la salute, gli strumenti per la prevenzione e per la regolamentazione nel mondo a tutela del Report Annuale" (2006).