

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie
Ciclo XXVI**

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: VET 07

**RICERCA DI CONTAMINANTI
IN TESSUTI ANIMALI E IN ALIMENTI
DESTINATI ALL'UOMO**

Presentata da: FRANCESCA SORI

Relatore

Prof.ssa PAOLA RONCADA

Coordinatore Dottorato

Prof. CARLO TAMANINI

Correlatori

Prof. KHALED M. AL-QUDAH

Dott. GIORGIO FEDRIZZI

Esame finale anno 2014

INDICE

<u>ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA</u>	I
DOTTORATO DI RICERCA IN	I
<u>INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI</u>	1
<u>MICOTOSSINE</u>	2
INTRODUZIONE	3
LE MICOTOSSINE NELLA STORIA	5
MICETI PRODUTTORI DI MICOTOSSINE	9
PRINCIPALI MICOTOSSINE	10
AFLATOSSINE	13
AFLATOSSINA B ₁	17
AFLATOSSINA M ₁	17
HACCP: UN APPROCCIO SISTEMATICO AL PROBLEMA	19
Misure di controllo durante le fasi di coltivazione	20
Misure di controllo durante le fasi di raccolta	21
Misure di controllo durante le fasi di stoccaggio	21
NORMATIVA DI RIFERIMENTO	22
AFLATOSSINE IN AMBITO LEGISLATIVO	23
ALIMENTAZIONE DEGLI ANIMALI IN AMBITO LEGISLATIVO	28
TECNICHE ANALITICHE	31
L'AMBITO "BIOLOGICO"	31
APPROCCIO AL BIOLOGICO	33
CONVENZIONALE E BIOLOGICO A CONFRONTO	37
PARTE SPERIMENTALE	39
SCOPO DELLA RICERCA	39
MATERIALI E METODI	41
FARINE E LATTE	41
ANALISI CAMPIONI DI FARINA	42
Fase preparativa	42
Fase analitica	43
Validazione del metodo	45
ANALISI CAMPIONI DI LATTE	47
Fase preparativa	47
Fase analitica	49
RISULTATI E DISCUSSIONE	51
RISULTATI DELLE ANALISI DEI CAMPIONI DI FARINA	51
DISCUSSIONE DEI DATI SPERIMENTALI DEI CAMPIONI DI FARINA	61
RISULTATI DEI CAMPIONI DI LATTE	65
DISCUSSIONE DEI DATI SPERIMENTALI DEI CAMPIONI DI LATTE	72
CONCLUSIONI	75
OCRATOSSINA A	76

GENERALITÀ	76
PRODOTTI CONTAMINATI	77
TOSSICITÀ DELL'OTA	78
TOSSICITÀ ACUTA (DL ₅₀)	78
TOSSICITÀ CRONICA	80
OCRATOSSICOSI NELL'UOMO E NEFROPATIA ENDEMICA BALCANICA	86
NORMATIVA RELATIVA AD <i>OCRATOSSINA A</i>	89
MATERIALI E METODI	91
CAMPIONAMENTO	91
ANALISI CAMPIONI DI BILE E PLASMA	91
ANALISI CAMPIONI DI RENE	92
RISULTATI E DISCUSSIONE	93
CONCLUSIONI	94
METALLI	95
INTRODUZIONE	96
I METALLI	98
METALLI PESANTI E LORO TOSSICITÀ	99
CADMIO (Cd)	100
GENERALITÀ	100
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	101
TOSSICOCINETICA	102
Assorbimento	102
Trasporto e distribuzione	103
Escrezione	105
TOSSICODINAMICA	105
TOSSICITÀ	106
Tossicità acuta	106
Tossicità cronica	106
PIOMBO (Pb)	108
GENERALITÀ	108
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	109
TOSSICOCINETICA	110
Assorbimento	110
Trasporto e distribuzione	111
Escrezione	112
TOSSICODINAMICA	112
TOSSICITÀ	113
MERCURIO (Hg)	116
GENERALITÀ	116
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	116
TOSSICOCINETICA	117
Assorbimento	117
Trasporto e distribuzione	118
Metabolismo	118
Escrezione	119
TOSSICODINAMICA	119

TOSSICITÀ	120
Tossicità acuta	120
Tossicità cronica	121
ARSENICO (As)	123
GENERALITÀ	123
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	124
TOSSICOCINETICA	125
Assorbimento	125
Trasporto e distribuzione	125
Metabolismo	126
Escrezione	126
TOSSICODINAMICA	127
TOSSICITÀ	128
Tossicità acuta	128
Tossicità cronica	128
ALLUMINIO (Al)	130
GENERALITÀ	130
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	130
TOSSICOCINETICA	132
Assorbimento	132
Trasporto e distribuzione	132
Escrezione	133
TOSSICODINAMICA	133
TOSSICITÀ	133
Tossicità acuta	133
Tossicità cronica	134
RAME (Cu)	137
GENERALITÀ	137
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	137
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	138
CINETICA	139
Assorbimento	139
Trasporto e distribuzione	139
Escrezione	140
TOSSICODINAMICA	140
TOSSICITÀ	141
Tossicità acuta	141
Tossicità cronica	141
FERRO (Fe)	143
GENERALITÀ	143
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	144
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	144
CINETICA	145
Assorbimento	145
Trasporto e distribuzione	146
Escrezione	146
TOSSICODINAMICA	146
TOSSICITÀ	147

Tossicità acuta	147
Tossicità cronica	147
ZINCO (Zn)	149
GENERALITÀ	149
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	149
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	150
TOSSICOCINETICA	151
Assorbimento	151
Trasporto e distribuzione	152
Escrezione	152
TOSSICODINAMICA	152
TOSSICITÀ	153
Tossicità acuta	153
Tossicità cronica	153
CROMO (Cr)	155
GENERALITÀ	155
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	156
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	156
CINETICA	157
Assorbimento	157
Trasporto e distribuzione	158
Escrezione	158
TOSSICODINAMICA	158
TOSSICITÀ	160
Tossicità acuta	160
Tossicità cronica	160
MANGANESE (Mn)	162
GENERALITÀ	162
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	162
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	163
CINETICA	163
Assorbimento	163
Trasporto e distribuzione	164
Escrezione	164
TOSSICODINAMICA	164
TOSSICITÀ	165
Tossicità acuta	165
Tossicità cronica	165
SELENIO (Se)	167
GENERALITÀ	167
FONTI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	167
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	168
CINETICA	170
Assorbimento	170
Trasporto e distribuzione	170
Escrezione	170
TOSSICODINAMICA	171
TOSSICITÀ	171

Tossicità acuta	171
Tossicità cronica	171
COBALTO (Co)	172
GENERALITÀ	172
FONDI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	172
RUOLO BIOLOGICO E CARENZA	173
CINETICA	174
Assorbimento	174
Trasporto e distribuzione	174
Escrezione	174
TOSSICOCINETICA	175
Assorbimento	175
Trasporto e distribuzione	175
Escrezione	175
TOSSICODINAMICA	175
TOSSICITÀ	176
Tossicità acuta	176
Tossicità cronica	177
ARGENTO (Ag)	178
GENERALITÀ	178
FONDI DI ESPOSIZIONE PER L'UOMO	178
TOSSICOCINETICA	179
Assorbimento	179
Trasporto e distribuzione	179
Escrezione	179
Tossicodinamica	180
TOSSICITÀ	180
Tossicità acuta	180
Tossicità cronica	180
Tossicità delle nanoparticelle d'argento	181
NORMATIVA EUROPEA	182
GENERALITÀ	182
VALORI MASSIMI AMMISSIBILI E SPECIFICHE LEGISLAZIONI DEI PRINCIPALI METALLI PESANTI SECONDO NORMATIVE VIGENTI IN ITALIA ED EUROPA.	184
PARTE SPERIMENTALE	189
SCOPO DELLA RICERCA	189
MATERIALI E METODI	190
CAMPIONAMENTO	190
CARATTERISTICHE DEI CAMPIONI	190
FASE ANALITICA	193
Soluzioni di riferimento	194
Controlli di qualità interni ed estrazione dei campioni	194
Preparazione dei campioni	195
Espressione dei risultati	196
Analisi statistica	197
RISULTATI	198
DISCUSSIONE DEI RISULTATI	216
CADMIO	216

PIOMBO	221
MERCURIO	226
ARSENICO	229
ALLUMINIO	232
RAME	233
FERRO	237
ZINCO	239
CROMO	243
MANGANESE	244
SELENIO	246
COBALTO	248
ARGENTO	249
CONSIDERAZIONI FINALI	250

NEONICOTINOIDI **253**

INTRODUZIONE	254
INSETTICIDI NEONICOTINOIDI	256
STORIA E CLASSIFICAZIONE	256
MECCANISMO D'AZIONE	258
PRINCIPI DELLA SELETTIVITÀ PER GLI INVERTEBRATI	261
SPECIE BERSAGLIO	262
FORMULAZIONI E MODALITÀ DI IMPIEGO IN AGRICOLTURA	263
FORMULAZIONI E MODALITÀ DI IMPIEGO SUGLI ANIMALI	263
IL PROBLEMA “NEONICOTINOIDI E API”	264
Il declino degli insetti impollinatori e la Colony Collapse Disorder	264
Messa al bando dei neonicotinoidi imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin	267
IMIDACLOPRID	269
Generalità	269
Impiego	269
Destino ambientale	269
Comportamento nelle piante	270
Comportamento nei mammiferi	270
Tossicità acuta	271
Tossicità cronica	272
Effetti cancerogeni	272
Effetti mutageni	272
Effetti teratogeni e riproduttivi	272
Neurotossicità	273
Effetti ambientali	273
ACETAMIPRID	274
Generalità	274
Impiego	274
Destino ambientale	274
Comportamento nelle piante	275
Comportamento nei mammiferi	275
Tossicità acuta	276
Tossicità cronica	276

Effetti cancerogeni	276
Effetti mutageni	277
Neurotossicità	277
Effetti ambientali	277
THIAMETHOXAM	278
Generalità	278
Impiego	278
Destino ambientale	278
Comportamento nelle piante	279
Comportamento nei mammiferi	279
Tossicità acuta	280
Tossicità cronica	280
Effetti cancerogeni	280
Effetti mutageni	281
Effetti teratogeni	281
Neurotossicità	281
Effetti ambientali	282
THIACLOPRID	283
Generalità	283
Impiego	283
Destino ambientale	283
Comportamento nelle piante	284
Comportamento nei mammiferi	284
Tossicità acuta	284
Tossicità cronica	285
Effetti cancerogeni	285
Effetti mutageni	285
Effetti teratogeni	285
Neurotossicità	286
Effetti ecologici	286
LA GIORDANIA	287
Informazioni generali	287
Sistemi di allevamento ovino e bovino	288
Normativa giordana sui prodotti fitosanitari	288
LIMITI MASSIMI DI RESIDUI DEI NEONICOTINOIDI OGGETTO DELLA RICERCA	289
PARTE SPERIMENTALE	291
MATERIALI E METODI	291
CAMPIONAMENTO	291
PREPARAZIONE, CONSERVAZIONE E SCELTA DEI CAMPIONI	293
MESSA A PUNTO DEL METODO ANALITICO	294
CONDIZIONI CROMATOGRAFICHE	298
RISULTATI E DISCUSSIONE	298
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	304
BIBLIOGRAFIA	306
NORMATIVA	375
SITOGRAFIA	383

APPENDICE 1: TABELLE DEI RISULTATI **384**

RELATIVI AI METALLI **384**

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La sicurezza e la salubrità dei prodotti di origine animale e degli alimenti destinati all'uomo rappresentano, insieme all'elevata qualità, le caratteristiche che il consumatore ricerca e richiede ai produttori. Uno dei rischi principali per la sicurezza alimentare è rappresentato dalla contaminazione chimica dei prodotti alimentari, che può arrecare anche gravi danni alla salute umana. I contaminanti chimici oggetto di questa tesi rientrano in tre famiglie distinte: Micotossine, Insetticidi e Metalli.

In particolare, sono state ricercate Aflatossina B1 (AFB1) in farine di grano e di mais destinate al consumo umano e Aflatossina M1 (AFM1) in latte biologico e convenzionale acquistato in punti vendita italiani. Questa ricerca è stata suggerita dalla "Emergenza Micotossine" verificatasi nell'estate 2012.

Inoltre, mentre l'Unione Europea stabilisce la necessità di controlli costanti di diversi contaminanti negli alimenti al fine di garantire la sicurezza e di tutelare la salute dei consumatori, in alcuni Paesi extraeuropei, meno attenzione è rivolta a queste problematiche. Abbiamo quindi ritenuto interessante determinare la concentrazione di alcuni contaminanti in alimenti e matrici di origine animale prelevati in Giordania, in collaborazione con il professore Khaled M. Al-Qudah della facoltà di Medicina Veterinaria della Jordan University of Science and Technology (Irbid, Giordania) e con il dottor Giorgio Fedrizzi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini". A tal fine, è stata effettuata la ricerca di Ocratossina A (OTA) in plasma, bile e reni di polli, di 13 metalli essenziali e non essenziali in tessuti di bovini e di 4 insetticidi neonicotinoidi di sintesi.

MICOTOSSINE

INTRODUZIONE

Le micotossine rappresentano un problema reale per la salute umana, diffuso a livello mondiale, che viene però spesso ignorato o sottovalutato dalla popolazione. La pericolosità delle micotossine e il rischio legato alla loro assunzione sono percepiti dai consumatori in misura minore rispetto a quelli legati ad altri contaminanti come pesticidi, additivi e metalli pesanti la cui pericolosità subisce spesso una forte amplificazione da parte dei *mass media* (Galvano et al., 2005). Anche alle sostanze geneticamente modificate (OGM) viene attribuito un elevato rischio per la salute, anche se la loro pericolosità deve essere ad oggi ancora chiarita. In realtà le micotossine rappresentano un rischio maggiore rispetto ai contaminanti di sintesi, ai pesticidi e agli additivi alimentari, in termini di esposizione e severità delle lesioni croniche (Kuiper-Goodman, 1999); dal momento che esse provocano raramente intossicazioni acute o emergenze sanitarie, vengono definite “hidden killers” (Galvano et al., 2005) ovvero “killer nascosti” o “silenziosi”. La notevole attenzione del mondo scientifico prestata negli ultimi anni conferma questa importanza: dal 1972 fino ai primi sei mesi del 2004 sono stati pubblicati su riviste scientifiche oltre 20.000 lavori (Piva et al., 2004). La FAO (*Food and Agriculture Organization*) ha stimato che circa il 25% del raccolto mondiale è contaminato, a vario livello, da micotossine; da ciò derivano perdite per svariati miliardi di dollari per tutti gli operatori della filiera produttiva, comprese le perdite derivanti dal peggioramento dello stato sanitario degli animali, dal conseguente maggior impiego di farmaci e dalla riduzione delle *performances* produttive. Anche il mondo politico sta prestando sempre più attenzione in merito, infatti attualmente il 90% della popolazione mondiale è soggetta a normative specifiche che impongono limiti massimi ammissibili delle micotossine in varie derrate alimentari. Bisogna però sottolineare che a volte queste misure adottate dai vari Paesi, in particolar modo dalla Unione Europea, risultano essere molto restrittive per il commercio e hanno quindi un forte impatto negativo sull’economia di alcuni Paesi in via di sviluppo, esportatori di molti

prodotti alimentari. Ad esempio, il costo della regolamentazione europea delle aflatossine è stato riportato nel 2001 dall'allora segretario generale delle Nazioni Unite, Kofi Annan, durante il suo discorso alla "Terza conferenza sui Paesi in via di sviluppo" tenutosi a Bruxelles il 14 maggio: "*A World Bank study has calculated that this regulation costs Africa \$750 million each year in exports of cereals, dried fruit and nuts*" (Annan, 2001).

Gli elevati costi sono quasi sicuramente da attribuire a una difficoltà nel rispettare i limiti di legge previsti per le micotossine. Non rispettando questi limiti, i Paesi in via di sviluppo non possono esportare i loro prodotti nell'Unione Europea, perdendo milioni di dollari ogni anno. È quindi possibile affermare che esiste un notevole divario tra quella che è la percezione della popolazione e degli operatori del settore in merito alle micotossine ma è chiaro come la pericolosità e il rischio legato alla loro assunzione sia sempre più concreto.

LE MICOTOSSINE NELLA STORIA

Il problema delle micotossine si può dire che sia vecchio quanto l'agricoltura ma solo di recente se ne è presa veramente coscienza; la scoperta degli effetti negativi sulla salute dell'uomo causati dalle micotossine si ebbe all'inizio degli anni sessanta ma si possono attribuire ad esse molte vicende del passato.

Effetti negativi dei funghi sulla salute come pestilenze, epidemie, allucinazioni, etc. dell'ultimo millennio possono essere spiegati dalla contaminazione dei cibi ad opera di muffe in particolari condizioni ambientali (Matossian, 1980).

È stata attribuita alle micotossine la responsabilità della decima piaga d'Egitto descritta nell'Antico Testamento (1400 a.C.); infatti, la morte dei primogeniti della popolazione egiziana sarebbe stata causata dalla contaminazione da parte di micotossine presenti nei cereali. L'intossicazione sarebbe stata provocata da esse direttamente con l'assunzione del cibo contaminato o in seguito ad inalazione delle stesse. In particolar modo si suppone che la morte dei primogeniti degli egiziani dipendesse da una micotossicosi da inalazione di *Stachybotris atra*.

Le prime testimonianze di micotossicosi si riconducono al I secolo a.C.; Lucrezio descrisse per la prima volta i sintomi di una malattia che chiamò "*Ignis sacer*", oggi conosciuto come ergotismo o anche come "Fuoco di Sant'Antonio" o "Fuoco Sacro". Si tratta di un'intossicazione dovuta all'ingestione di "segale cornuta" che, infestata dal fungo *Claviceps purpurea*, contiene il principio attivo ergotamina negli sclerozi (corpi fruttiferi simili a clavette o cornetti), che conferiscono alla segale infestata la forma caratteristica dalla quale deriva il nome. La malattia, spesso a decorso fatale, è caratterizzata da bruciore insopportabile, convulsioni, dolori molto forti alle estremità e vaste lesioni cutanee e si manifesta in due forme entrambe derivanti dall'azione vasocostrittrice dell'ergotamina.

La prima tipologia di manifestazione è l'ergotismo convulsivo, caratterizzato da sintomi depressivi, nausea, vomito, diarrea, difficoltà di respiro, disturbi visivi, debolezza, parestesie, formicolio alle estremità, spasmi dolorosi della muscolatura volontaria culminanti in convulsioni e coma; la seconda è l'ergotismo gangrenoso, caratterizzato da estremi disturbi della circolazione nei tessuti periferici che portano alla necrosi degli stessi con conseguente gangrena delle estremità e dei visceri interni.

In epoca Medievale sono state descritte diverse epidemie dovute al consumo di cereali contaminati dal fungo, tanto che la malattia divenne endemica in tutta l'Europa centrale e nei secoli successivi venne compresa fra le pestilenze. Inoltre, le persistenti condizioni di malnutrizione legate ad alimenti di cattiva qualità erano estremamente diffuse e le manifestazioni di tipo carenziale si sovrapponevano e si confondevano con gli effetti dell'ingestione di alimenti contaminati da micotossine. L'analisi del succedersi delle epidemie a partire dall'Alto Medioevo in relazione all'alternarsi delle condizioni climatiche, mostrò che la peste aveva provocato innumerevoli morti grazie anche alla presenza di ulteriori fattori che indebolivano il sistema immunitario. Ad esempio frequenti piogge, climi freddi e inadeguati processi di essiccazione dei raccolti facevano sì che gli alimenti a disposizione della popolazione fossero pochi e spesso contaminati da muffe che quindi potevano veicolare micotossine (Matossian, 1980).

La situazione migliorò drasticamente all'aumentare della percentuale di frumento nella dieta rispetto ad altri cereali e soprattutto alla segale, al miglioramento dei sistemi di molitura e alle nuove tecniche di setacciamento della granella che ridussero drasticamente il rischio di ergotismo in Europa.

A metà del XVII secolo alcuni medici inglesi trovarono una relazione tra la dieta a base di segale e una serie di disturbi nervosi caratterizzati da convulsioni e allucinazioni, che portavano a considerare le persone colpite indemoniate e, in alcuni casi, a processarle con l'accusa di stregoneria.

Attualmente il rischio di ergotismo sembra essere limitato agli animali, e la letteratura riporta l'ultimo caso agli anni settanta (Galvano et al., 2005).

Nel XIX secolo in Italia si registrarono ingenti perdite umane dovute a una concomitanza di pellagra e micotossicosi (causate da fumosine, acido ciclopiazonico ed ergotamina presenti nei cereali mal conservati) e, nel 1883, il Ministero dell'Agricoltura proibì il consumo di mais ammuffito.

Gli effetti tossici delle aflatossine, sono stati descritti per la prima volta nel 1913, anche se non si riuscì a isolarle.

Tra il 1942 e il 1947 in alcuni villaggi rurali della Russia, in particolar modo a Orenburg, si verificarono nell'uomo numerosi casi di leucopenia tossica alimentare, "Alimentary Toxic Aleukia" (ATA), conseguenti all'ingestione di frumento e miglio o dei loro prodotti derivati contaminati da *Fusarium sporotrichoides* e da *Fusarium poae*, in grado di produrre tricoteceni, in particolare T-2, anche durante i primi geli.

L'ATA è una micotossicosi spesso fatale caratterizzata da una sintomatologia progressiva; inizialmente si presenta con nausea e vomito, seguiti da leucopenia, agranulocitosi, angina necrotica, rash emorragico, sepsi, insufficienza del midollo osseo, sanguinamento da naso, gola e gengive e febbre (Chilikin, 1947; Joffe, 1971). Nel 1943 il Ministero della Salute dell'Unione Sovietica descrisse l'ATA indotta da una fusariotossina T-2 e tutti i cereali risultarono substrati più o meno contaminati o contaminabili (Piva et al., 2004).

Nel 1960 in Inghilterra si diffuse una malattia che provocò la morte di centomila tacchini. La necropsopia evidenziò necrosi acuta al fegato e iperplasia del dotto biliare. Poiché l'eziologia era sconosciuta, la malattia fu denominata "Turkey X disease" e solo successivamente fu associata alle aflatossine B₁ prodotte da *Aspergillus flavus* e *parasiticus* che infestavano la farina di arachidi (Goldblatt, 1969; Tiecco, 2001). Questo caso rappresentava il primo approccio scientifico allo studio delle micotossine.

Negli ultimi cinquanta anni la conoscenza e lo studio delle micotossine sono aumentati ma rimangono ancora molti problemi irrisolti.

I primi casi in Italia di micotossicosi animale risalgono agli inizi degli anni settanta quando, in Romagna, in alcuni allevamenti di tacchini si verificarono ingenti perdite di animali che presentavano lesioni epatiche riconducibili all'ingestione di micotossine (Aflatossina B₁); in allevamenti di vitelloni nel Nord

Italia vennero riscontrati casi di necrosi della coda associati poi alla tossina T-2 (Piva, 2003).

Negli ultimi anni si è verificata una recrudescenza delle malattie provocate da micotossine a causa dei cambiamenti delle condizioni ambientali. In particolare, rapide escursioni termiche accompagnate da umidità elevate hanno comportato un microclima particolarmente adatto allo sviluppo delle micotossine (Haouet and Altissimi, 2003a).

GENERALITA'

Il termine “micotossine” deriva dai termini greci “*mykes*” che significa fungo e “*toxicon*”, veleno.

Pitt (1996) definisce le micotossine come “metaboliti dei funghi che, quando ingeriti, inalati, o assorbiti tramite la pelle causano un abbassamento delle performance, malattia o morte negli animali, inclusi gli uccelli”.

Le micotossine sono metaboliti secondari, tossici per gli animali superiori, prodotti da, funghi microscopici, che si sviluppano in particolari condizioni sulle derrate alimentari come foraggi, insilati, cereali e mangimi aziendali o industriali.

Il metabolismo primario di un fungo serve a mantenere vitale l'organismo e accrescere la colonia; il metabolismo secondario, attuato dall'organismo solo a condizione di un perfetto svolgimento del primo non dipende dalla specie o dal ceppo fungino, non è essenziale per la crescita del fungo ma consente la produzione di molecole che interagiscono con l'esterno, probabilmente come difesa dallo sviluppo di altri funghi concorrenti.

Le micotossine non costituiscono una classe chimica specifica e hanno tra loro strutture molto diverse anche se prodotte dagli stessi generi fungini.

Possono, tuttavia, essere accomunate da alcune caratteristiche:

- basso peso molecolare (inferiore ai 1000 Dalton);
- lipofilia;
- notevole resistenza agli agenti chimico-fisici che le rende stabili e consente loro di perdurare nel tempo anche dopo la scomparsa delle specie fungine

produttrici e di resistere a trattamenti termici come la cottura e la tostatura e a trattamenti industriali di trasformazione.

Le differenti attività biologiche manifestate dalle micotossine nei vari organismi sono causate da interazioni delle stesse e/o dei loro derivati con le diverse molecole cellulari quali DNA, RNA, proteine funzionali, cofattori enzimatici e costituenti di membrana.

La loro pericolosità risulta elevata poiché provocano danni molto gravi (alcune di esse nell'uomo possono generare il cancro); riescono ad agire a concentrazioni bassissime (in alcuni casi poche parti per miliardo); inoltre si possono ritrovare, variamente modificate, nei prodotti zootecnici compreso il latte.

Non esistono metodi efficaci ed economici per eliminare le micotossine dai prodotti contaminati e possono essere presenti anche su matrici nelle quali apparentemente non è visibile lo sviluppo di organismi fungini (Causin, 2004).

La differente sensibilità di specie può dipendere dalla diversa efficienza di bioattivazione: nei ruminanti si è osservata una minore suscettibilità alle tossine rispetto ai monogastrici, dovuta ad una maggiore efficacia dei sistemi di detossificazione e all'azione della flora ruminale (Hussein and Brasel, 2001) che opera una detossificazione (Kiessling et al., 1984), contribuendo ad abbassare i livelli plasmatici delle tossine e dei loro derivati.

MICETI PRODUTTORI DI MICOTOSSINE

I funghi tossigeni appartengono per lo più alla classe dei Deuteromiceti (con riproduzione agamica).

Sono ottimi saprofiti e possono, perciò, vivere e riprodursi a spese di quasi tutti i tipi di sostanza organica non vivente e, in alcuni casi, possono essere anche parassiti facoltativi (patogeni capaci di causare malattie). Le specie fungine tossigene più pericolose e di maggiore interesse scientifico sono comprese nei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, vi sono inoltre i generi *Alternaria* e *Claviceps* ampiamente diffusi nei nostri ambienti e nei quali si trovano ceppi dotati di elevata tossicità. Sono ritenuti generi meno pericolosi *Acremonium*,

Byssoclamys, Chaetomium, Dendrodochium, Diplodia, Myrothecium, Phomopsis, Pithomyces, Rhizoctonia, Sclerotinia, Stachybotrys, Trichoderma e Trichotecium che, pur comprendendo organismi in grado di produrre sostanze dannose per la salute degli animali e dell'uomo, sono meno diffusi o si sviluppano su matrici che non entrano nella catena alimentare oppure crescono in ambiti ristretti o, più banalmente, producono sostanze meno tossiche (Causin, 2004).

I funghi tossigeni sono diffusi in modo quasi ubiquitario e, data l'enorme quantità e la leggerezza dei conidi, sono ampiamente presenti nel terreno e nell'aria.

PRINCIPALI MICOTOSSINE

Ad oggi sono state identificate circa 400 micotossine ma il loro numero è in continuo aumento. Nella Tabella 1 si riportano le principali caratteristiche di alcune di queste. Certune sono molto pericolose; ad esempio le aflatossine sono state catalogate dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) tra le sostanze sicuramente cancerogene.

Le principali micotossine all'attenzione dell'Autorità Sanitaria preposta alla tutela della salute pubblica sono le aflatossine, l'ocratossina A, lo zearalenone, le fumonisine, i tricoteceni (DON, DAS, NIV, T-2) e la patulina (Tecnoalimenti, 2006).

Tabella 1: Micotossine, muffe, prodotti oggetto di contaminazione e principali effetti tossici di alcune micotossine (Piva et al., 1996; Devegowda and Murthy, 2005; Delledonne, 2006; adattata)

Micotossina	Muffa	Prodotti contaminati	Effetti tossici
Aflatossine			
B1 B2 G1 G2	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Arachidi, legume, mais, altri cereali, cotone, noci, mandorle, semi oleosi, frutta secca, latte, latticini e derivati, latte di bufala	Epatiti, nefriti, carcinogeno, alterazione risposta infiammatoria, inibizione immunità cellulo-mediata, minor sintesi RNA e proteine
M1 M2	Derivano dalle B1 B2 G1 G2 attraverso il metabolismo animale	Latte e derivati	Epatiti, nefriti, carcinogenesi
Zearalenoni			
Zearalenone (ZEA)	<i>F. graminearum</i> , <i>F. roseum</i> ,	Mais, granella di soia ed altri cereali; insilati, sesamo,	Attività estrogeno simile soprattutto sui suini
Zearalenolo	<i>F. culmorum</i> , altri <i>Fusarium</i>	fieni	Ipopofertilità
Ocratossine			
A B	<i>A. ochraceus</i> (A), <i>P. verrucosum</i> , <i>P. viridicatum</i> (A), altri <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	Orzo, mais, frumento ed altri cereali, pasta, prodotti da forno, carni suine stagionate, vino, birra, cacao, caffè, uva	Nefriti, epatiti, teratogeno, immunosoppressivo, cancerogeno
Tricoteceni			
Tossina T-2	<i>F. sporotrichioides</i>	Mais, orzo ed altri cereali	
Diacetossiscirpenolo (DAS) Deossinivalenolo (DON) Vomitotossina Fusarenone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i>	Frumento ed altri cereali	Dermatiti, emorragie, leucopenia, vomito, problemi nervosi, cardiopatie, inappetenza

Nivalenolo (NIV)	<i>Trichothecium roseum</i>	Frutta e derivati	
Tricotecine	<i>Stachibotrys atra</i>	Frutta e derivati	
Satratossine	<i>Myrothecium</i> spp.	Prodotti cerealicoli	
Verrucarine	<i>Myrothecium</i> spp.	Prodotti cerealicoli	
Roridine	<i>F. moniliforme</i>	Mais	
Fumonisine B1 e B2	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , altri <i>Fusarium</i>	Mais ed altri cereali	
Moniliformina	<i>F. equiseti</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i>	Cereali, mais	Citotossici

Tossine del riso ingiallito			
Citrinina	<i>P. citrinum</i> , altri <i>Penicillium</i> , <i>A. ochraceus</i>	Cereali e legumi	
Citreoviridina	<i>P. citreonigrum</i>	Riso e grano	Epatiti e Nefriti
Luteoschirina	<i>P. islandicum</i>	Riso	
Cicloclorotina			
Islanditossina			
Tossine tremorgeniche			
Acido ciclopiazonico	<i>A. Flovus</i> , <i>P. simplicissimum</i>	Arachidi, cereali, formaggi Cereali, formaggi, arachidi	Astenia e paralisi
Verruculogeno	<i>P. crustosum</i>		
Viomelleina	<i>Penicillium</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp	Orzo e altri cereali	Nefriti
Tossine di Alternaria			
Acido tenuazonico Alternarioli Alertossine	<i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	Ortofrutta, cereali	Citotossicità

Altre micotossine			
Patulina	<i>P. expansum</i> ed altri <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i>	Frutta e derivati	Epatiti, carcinogenesi
Acido Penicillico	<i>Penicillium</i> spp., <i>A. ochraceus</i>	Mais ed altri cereali, legumi	Epatiti, carcinogenesi
Fomopsine	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>	Lupino	-
Ergotamina o alcaloidi dell'ergotamina o di claviceps	<i>Claviceps purpurea</i>	Segale, cereali	Neurotossico, ergotismo, vasocostrizione, convulsioni allucinazioni
Roquefortina C	<i>P. roqueforti</i>	Formaggi erborinati	Problemi/disturbi nervosi
Rubratossine	<i>P. purpurogenum</i>	Cereali, legumi	Epatiti, emorragie
Chetomine o Piperazine	<i>Chaetomium globosum</i>	Mais e altri cereali	Citotossici

AFLATOSSINE

Le aflatossine sono particolari micotossine, un gruppo di metaboliti secondari, prodotte da funghi del genere *Aspergillus*, in particolare *A. flavus* (da cui il termine aflatossine; Martini, 2008), *A. parasiticus* e *A. nomius* (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2010) e, con meno frequenza, da *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. nomius* e *A. pseudotamari* (Turner et al., 2009).

Lo stato cristallino conferisce alle aflatossine una estrema stabilità in assenza di luce, in assenza di radiazioni UV e a temperature superiori a 100°C (Delledonne, 2006).

Da qui si definisce la loro pericolosità nel latte e nei prodotti caseari dove, i trattamenti termici di pastorizzazione o di sterilizzazione cui viene sottoposto il latte, non sono sufficienti a inattivare le micotossine che eventualmente lo contaminano (Nachtmann et al., 2007). Al pari inefficaci sono i trattamenti di congelamento; è stata infatti ritrovata la presenza di aflatossina M₁ nel latte anche dopo 8 mesi di conservazione a temperature di congelamento.

Sono fluorescenti se sottoposte a radiazioni UV: le AFT B₁ e B₂ emettono luce blu, quelle G₁ e G₂ emettono luce verde (Cerutti, 1999; Turner et al., 2009).

Contaminazione

La sintesi di aflatossine durante lo stoccaggio può avvenire anche a basse temperature, al contrario di quanto avviene durante le fasi di coltivazione dove, per esempio, le temperature più elevate delle regioni tropicali e sub-tropicali, con i loro climi miti caldi e umidi, offrono le condizioni ottimali per la crescita dei funghi (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2010).

Le aflatossine contaminano i prodotti più disparati, da quelli destinati alla produzione di derrate alimentari, agli alimenti per animali (Chiavaro et al., 2001; Nasir and Jolley, 2002; Park, 2002; Ali et al., 2005), interessando anche alimenti ad alto tenore in carboidrati e lipidi (Nilufer and Boyacioglu, 2002) come frutta secca (arachidi, pistacchi e noci), frutta fresca (fichi e mele), cereali (mais e granturco), spezie (pepe) e cacao. La fava del cacao è stata riconosciuta essere la più suscettibile agli attacchi fungini durante la raccolta, l'essiccazione, lo stoccaggio e la trasformazione (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2010).

Non mancano ritrovamenti nella birra, per contaminazione di cereali usati nella sua produzione; nel vino, per contaminazione dell'uva; nelle carni suine stagionate, per contaminazione del sale di stagionatura; o ancora nel latte e nei prodotti caseari, come risultato della somministrazione al bestiame di alimenti contaminati (Stroka et al., 2000; Nilufer and Boyacioglu, 2002; Bourais et al., 2006; Brera et al., 2006; Cavaliere et al., 2007; Nachtmann et al., 2007).

Sono conosciute e studiate 20 aflatossine prodotte da funghi, anche se quelle normalmente ritrovate in alimenti sono le aflatossine B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂ (Tam et al., 2006; Nachtmann et al., 2007).

Nello specifico le aflatossine B₂, G₂, M₁ e M₂ sono diidro-derivati rispettivamente di B₁, G₁, B₁ e B₂.

Tossicità

La tossicità delle aflatossine si può manifestare come intossicazione cronica, dovuta da ingestione di piccoli ma frequenti quantitativi; raramente sono causa di intossicazione acute o emergenze sanitarie, e perciò sono state definite “hidden killers” (Galvano et al., 2005) “killer nascosti” “silenziosi”.

In funzione di effetti tossici sia sull'uomo sia sugli animali, le aflatossine ricevono tutt'oggi una maggiore attenzione rispetto a qualsiasi altra micotossina (Maroto et al., 2005).

Per la maggior parte delle specie la dose letale 50 (DL₅₀) è compresa tra 0,5-10 mg/kg di peso corporeo. Il principale organo bersaglio identificato è il fegato (Aycicek et al., 2005; Giray et al., 2007), ma dosi elevate possono creare problemi all'apparato cardiocircolatorio, a quello urinario, alla capacità produttività e a quella riproduttiva (Coulombre, 1993; Bhat et al., 2010).

Nell'uomo l'intossicazione acuta è generalmente conseguente all'assunzione di cereali contaminati (mais, riso, arachidi) o loro prodotti derivati.

Gli effetti acuti si rilevano principalmente a livello epatico.

“Le aflatossine sono anche oncogene ed immuno-soppressive, riducono sensibilmente le difese immunitarie dell'organismo alterando il metabolismo degli interferoni coinvolti nelle risposte immunitarie e nelle reazioni antinfiammatorie” (Haouet and Altissimi, 2003). In consumatori di stupefacenti, marijuana ed eroina, ottenuti da piante veicolo di aflatossine, è stato osservato infatti un'infezione più aggressiva da virus di epatite B e HIV. “Il 20% dei casi di eroinomani esaminati in Olanda e in Inghilterra dimostra la positività sierica per l'aflatossina B₁, aflatossina B₂ e aflatossicololo” (Haouet and Altissimi, 2003).

La storia riporta clamorosi esempi di aflatossicosi umana. Negli anni '90, si ricorda un episodio, in Malesia, con la morte di 13 bambini e, recentemente, nel giugno del 2004 in Kenya sono state coinvolte nel contagio 112 persone.

Nonostante questi episodi, le aflatossine nell'uomo sono perlopiù causa di effetti sub-acuti e cronici, quindi cancro primario del fegato, epatite cronica, ittero e cirrosi.

Nelle aflatossine B₁, G₁ e M₁, l'azione cancerogena e mutagenica è da attribuire alla formazione di un intermedio metabolico particolarmente instabile (il 2.3-epossido) capace di formare legami covalenti con il DNA, l'RNA e le proteine (Eaton and Groopman, 1994; Turner et al., 2009).

Le aflatossine, tra l'altro, riuscendo ad oltrepassare la barriera placentare, provocano riduzioni del peso fetale e malformazioni.

Oltre all'assunzione per via orale, le aflatossine possono essere introdotte per via inalatoria, in seguito all'inalazione di aspergilli tal quali (Ramos-Catharino et al., 2005; Delmulle et al., 2006).

L'*Aspergillus flavus* ha infatti la capacità di sopravvivere nel suolo come micelio o grazie a strutture riproduttive asessuali, i conidi.

La contaminazione del mais è definita dal trasporto, per opera del vento, di insetti o altri artropodi, dei conidi sulle setole della pianta durante la fioritura. Successivamente, solo in condizioni in cui la granella scende al di sotto del 30% di umidità, il fungo riesce a produrre infezioni significative, sintetizzando la tossina (Reyneri, 2006).

L'esame delle autopsie ha rivelato un aumento dell'incidenza di aspergillosi dallo 0,4% negli anni '70 al 4% negli anni '80 (Delledonne, 2006).

AFLATOSSINA B₁

Tra le aflatossine, la B₁ è quella più biologicamente attiva e più comunemente riscontrabile (Busby and Wogan, 1981).

Ritrovamenti di AFB₁, in alcuni casi anche oltre i limite di legge, sono stati studiati nel riso, nella soia, nell'orzo (Ibáñez-Vea et al., 2012), nel mais (Brera et al., 2006), nel frumento (Vidal et al., 2013), nei cereali per la colazione (Tam et al., 2006) o in alimenti per l'infanzia (Hernández-Martínez and Navarro-Blasco, 2010).

Alti tenori di contaminazione in questi prodotti portano quindi a definire i bambini, i vegani e i celiaci come le categorie di persone particolarmente più esposte al pericolo micotossine (D'Arco et al., 2009).

Tra le specie animali, la più sensibile agli effetti dell'aflatossina B₁ si è dimostrata essere la trota, per la quale lesioni cancerose a livello epatico compaiono, nel giro di 5 giorni, con l'assunzione di una dieta contenente 0,004 ppm di tossina (Pompa, 1994).

Suino, bovino ed ovino, si presentano in ordine decrescente come le specie di maggior interesse zootecnico ad essere sensibili agli effetti di questa micotossina.

AFLATOSSINA M₁

In Europa, il latte rappresenta la prima matrice alimentare per la quale sono state adottate misure preventive al fine di limitarne la contaminazione da AFM₁ (Regolamento (CE) n. 466/2001).

“L'aflatossina M₁ è un sottoprodotto del metabolismo epatico di detossificazione dell'aflatossina B₁ ottenuto mediante una reazione di idrossilazione che conduce ad una molecola più polare e meglio trasportabile attraverso il circolo sanguigno” (Haouet and Altissimi, 2003).

Viene definito *carry-over* il passaggio delle micotossine attraverso il “filtro” animale.

Questo processo porta a trovare nel latte la presenza di aflatossine M₁ e M₂ come conseguenza di un alimento zootecnico contaminato da AFB₁ e AFB₂ ingerito e metabolizzato dall'animale.

Da molteplici ricerche condotte per stabilire il rapporto tra la concentrazione di AFB₁ nella dieta di specie di interesse zootecnico e il livello di AFB₁, o suoi metaboliti, nei tessuti degli animali, è stato possibile dimostrare come, nei tessuti, la quantità di AFB₁ e dei suoi metaboliti è sempre trascurabile, mentre risultano sempre quantità significative nel latte.

In particolare è stato dimostrato nelle bovine che la percentuale di escrezione varia dallo 0,17 al 3% (Rodricks et al., 1977) ma può raggiungere anche il 6% dell'AFB₁ ingerita (Veldam et al., 1992) in funzione della razza, dei fattori individuali (le infezioni mammarie, per esempio, aumentano il quantitativo di AFM₁ nel latte), e del livello produttivo (il *carry-over* è 3,3-3,5 volte maggiore all'inizio della lattazione rispetto alla fase di lattazione avanzata) (Succi et al., 2001).

La quantità di AFM₁ nel latte è valutabile utilizzando la seguente formula:

AFB₁ ingerita/capo/giorno (nano grammi) x 1,19 + 1,9 = AFM₁ (nano grammi/kg latte)

Mentre la comparsa della contaminazione si rileva già nella mungitura successiva all'assunzione del pasto contaminato (Diaz et al., 2005; Masoero et al., 2007), per apprezzarne una sua scomparsa sono necessari 3-5 giorni dopo la sospensione dell'alimento contaminato.

Per un buon monitoraggio della contaminazione da AFM₁ nel latte sarebbe opportuno che l'allevatore, ogni 15 giorni ed a ogni modifica della razione alimentare delle bovine, spedisce un'aliquota del prodotto al laboratorio di riferimento.

È importante infatti sottolineare che la presenza di AFM₁ nel latte definisce una

valutazione più attendibile del livello di contaminazione di AFB₁ nella razione alimentare (Pietri et al., 2004).

Da uno studio condotto su campioni di latte pastorizzato e UHT (Nachtmann et al., 2007) è stato possibile dimostrare come risulti indispensabile adoperare corrette misure di produzione e stoccaggio dei mangimi delle bovine al fine di scongiurare la successiva contaminazione nel prodotto di mungitura.

In genere, per le vacche da latte vengono considerati tossici livelli di AFB₁ nell'ordine dei 300-700 ppb (Cast, 1989), ma già concentrazioni di 20 ppb nella dieta definiscono un'apprezzabile sensibilità nei vitelli (Whitlow and Hagler, 1992).

L'esposizione all'aflatossina M₁ non è solo un pericolo nel latte di animali da allevamento, ma coinvolge anche il genere umano. Alcuni studi dimostrano la presenza di livelli apprezzabili di AFM₁ nel cordone ombelicale e nel sangue materno di giovani donne in Africa, Australia, Cina, Thailandia, Turchia (Bhat et al., 2010).

HACCP: UN APPROCCIO SISTEMATICO AL PROBLEMA

Un efficace controllo della contaminazione degli alimenti da micotossine può essere condotto con una buona osservanza dei principi HACCP, quindi con l'adozione di un metodo che permette di prevenire i pericoli mettendo a punto sistemi adatti al loro controllo (FAO/UNEP, 1979; Lopez-Garcia and Park, 1998; Lopez-Garcia et al., 1999; Delledonne, 2006).

Misure di controllo durante le fasi di coltivazione

Il frumento e il mais sono le colture più soggette all'attacco da funghi che persistono nel suolo sotto forma di ascospore e macroconidi, e che infestano la pianta, in ambiente con temperatura superiore a 15°C e superficie umida per 48-60 ore.

Sembra infatti che il più alto contenuto di micotossine nei cereali sia associato ad abbondanti piogge nelle fasi ultime di accrescimento e nel periodo immediatamente precedente la raccolta (Haouet and Altissimi, 2003).

Appare così evidente come sia importante controllare l'umidità e la temperatura.

Altro punto di controllo fondamentale, in questa fase di produzione, è l'infestazione da insetti (Park et al., 1999) la cui attività metabolica alza la temperatura e l'umidità della pianta ed espone l'endosperma all'attacco fungino; inoltre i materiali fecali degli insetti, arricchiscono i substrati aumentando la produzione di muffe (Dragoni et al., 1997; Santin, 2005).

Altri aspetti da considerare sono rappresentati dalle carenze minerali, dall'aumento della salinità del suolo e dallo stress idrico (Prandini et al., 2009). Una concimazione azotata nell'ordine dei 200kg/ha si è dimostrata essere la giusta soluzione contro lo stress nutrizionale della pianta; così come l'avvicendamento colturale è un'ottima pratica per controllare la diffusione di funghi silenti nel terreno. È stato osservato che l'alternanza tra colture di mais e soia riduce le infestazioni da *Fusarium*, rispetto al succedersi di due stesse colture di mais (Lopez-Garcia et al., 1999).

Attualmente, grazie all'aiuto dell'ingegneria genetica, si può migliorare la resistenza delle piante alla contaminazione da micotossine, cercando di aumentare l'espressione di geni con attività antifungina. Questa pratica permette di evitare l'utilizzo di composti chimici, largamente usati in passato perché considerati il miglior mezzo di prevenzione, ma che si sono dimostrati essere la causa di formazione di popolazioni di patogeni resistenti, nonché di squilibri omeostatici ambientali e di residui chimici in ambienti e alimenti trattati.

Misure di controllo durante le fasi di raccolta

In questa fase un efficace controllo può essere condotto nella giusta scelta del tempo e delle tecniche di raccolta.

La raccolta dovrebbe coincidere con il completamento della crescita della pianta in quanto un suo ritardo offre al fungo un maggior periodo per lo sviluppo e l'accumulo di tossine (Lopez-Garcia et al., 1999).

La stessa raccolta, dovrebbe esser condotta con un'azione poco energica di trebbiatura, per non creare danni meccanici e lesioni sulle cariossidi, e seguita da un'accurata pulitura e ventilazione della granella per ridurre significativamente in numero di cariossidi ammuffite, spezzate o fessurate.

Misure di controllo durante le fasi di stoccaggio

Nelle fasi post-raccolta, la maggior parte dei cereali viene immagazzinata in ambienti in cui, l'interazione degli stessi cereali con insetti, acari, roditori e uccelli, nonché l'umidità, la temperatura, le concentrazioni di ossigeno e anidride carbonica, o ancora il tempo di permanenza, può definirne il danneggiamento e quindi la successiva produzione di micotossine.

All'interno di un silos le muffe utilizzano il vapore acqueo inter-granulare come fonte di umidità (Santin, 2005). L'aumento della temperatura interna del container con l'esposizione al sole, irradia, per convezione, il calore nella massa di cereali. Successivamente lo spostamento del vapore acqueo dalle regioni più calde a quelle più fredde provoca la formazione di condensa con il conseguente aumento dell'umidità nella zona interna del silos. Vengono così a formarsi i cosiddetti “hot spot” dove le muffe trovano il substrato ideale per crescere.

A differenza di quanto accade durante la coltivazione, la sintesi di aflatossine durante lo stoccaggio può avvenire anche nelle zone temperate e fredde (Haouet and Altissimi, 2003).

NORMATIVA DI RIFERIMENTO

L'Italia, in ambito legislativo, si è sempre contraddistinta, con un atteggiamento particolarmente cauto, in materia di sicurezza alimentare, ricercando e disciplinando il “residuo zero”, ovvero la totale assenza di residui xenobiotici, in prodotti di origine animale e non. Nel tempo questo concetto è stato sostituito da un approccio che, riconoscendo ed accettando la possibilità di contaminazione degli alimenti, nonché la sofisticata strumentazione a disposizione nella ricerca, propone il limite massimo di residuo (*LMR*) e la minore quantità ragionevolmente conseguibile (*ALARA*); permettendo così da ridurre l'esposizione dell'uomo e degli animali a particolari sostanze riscontrabili in prodotti alimentari o in mangimi.

Le primissime disposizioni sui contaminanti in prodotti alimentari sono state fornite dal Regolamento (CE) n. 315/93 (modificato poi negli anni dal Regolamento (CE) n. 1882/2003 e dal Regolamento (CE) n. 596/2009) con la definizione dei “limiti di commercializzazione di alimenti contaminati in quantitativi inaccettabili sotto l'aspetto della salute pubblica e in particolare sul piano tossicologico.” Sulla scia della crescente sensibilizzazione a queste tematiche, il 12 gennaio 2000 a Bruxelles viene pubblicato il “Libro bianco sulla sicurezza alimentare”. Viene proposto quindi, a livello comunitario, un insieme di misure che consentono di organizzare la sicurezza alimentare in modo più *coordinato e integrato*:

- con la creazione di un' *Autorità alimentare europea (EFSA, European Food Safety Authority*, istituita più tardi dal Parlamento di Strasburgo sulla base del Regolamento (CE) n. 178/2002) incaricata di elaborare pareri scientifici su tutti gli aspetti inerenti alla sicurezza alimentare, alla gestione dei sistemi di allarme rapido e alla comunicazione dei rischi;
 - con il miglioramento di un *quadro giuridico* che copre tutti gli aspetti connessi ai prodotti alimentari “*dal campo alla tavola*”;
 - con l'armonizzazione di *sistemi di controllo* a livello nazionale;
- tutto questo, combinato al *dialogo* con i consumatori e le altre parti coinvolte.

Aflatossine in ambito legislativo

I tenori massimi di micotossine in genere e, in particolare di aflatossine, consentiti nelle diverse derrate alimentari, sono stabiliti dalla Comunità Europea.

Considerando anche i prodotti per lattanti e di prima infanzia, i limiti sono definiti dai Regolamento (CE) n. 472/2002, Regolamento (CE) n. 2174/2003, Regolamento (CE) n. 683/2004, tutti modificanti il Regolamento (CE) n. 466/2001.

Quest'ultimo regolamento è stato abrogato nel 2007 dal Regolamento (CE) n. 1881/2006; lo stesso a sua volta modificato dal Regolamento (UE) n. 165/2010 per quanto riguarda le aflatossine.

Per i prodotti destinati al consumo diretto o alla diretta utilizzazione per la produzione di derrate alimentari, i limiti fissati sono più bassi se rapportati a quelli definiti per alimenti che, prima del consumo umano, vengono sottoposti a cernita o ad altri trattamenti fisici.

I regolamenti definiscono inoltre che l'applicazione di tenori massimi più elevati è ammessa solo in situazioni ben definite, in cui:

- gli alimenti, e in particolare le arachidi, la frutta a guscio e la frutta secca, non sono destinati al consumo diretto o alla produzione di derrate alimentari;
- la cernita o altri trattamenti fisici permettono di abbassare i residui entro i limiti consentiti per il consumo umano o per l'impiego in derrate alimentari;
- la destinazione di tali prodotti è evidenziata chiaramente da un'etichettatura riportante l'indicazione *“prodotto destinato ad essere obbligatoriamente sottoposto a cernita o ad altri trattamenti fisici, per abbassare il livello di contaminazione da aflatossine prima del consumo umano o dell'impiego come ingredienti di prodotti alimentari”*.

Il controllo del rispetto di queste condizioni è responsabilità dell'Autorità competente, con metodi di campionamento e analisi di controlli ufficiali definiti dal Regolamento (CE) n. 401/2006.

Tabella 2: Tenori massimi di aflatossine definiti nei prodotti alimentari dal Reg (CE) n. 1881/2006 e le successive modifiche apportate dal Reg (UE) n. 165/2010.

Prodotti alimentari ⁽¹⁾: AFLATOSSINE	Tenori massimi (µg/kg o ppb)		
	B₁	Somma di B₁, B₂, G₁ e G₂	M₁
Arachidi e altri semi oleosi ⁽⁴⁰⁾ da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari (ad eccezione delle arachidi e degli altri semi oleosi da sottoporre a pressatura per la produzione di oli vegetali raffinati)	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	-
Arachidi e altri semi oleosi ⁽⁴⁰⁾ e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari, ad eccezione degli oli vegetali crudi destinati alla raffinazione e degli oli vegetali raffinati	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Arachidi, frutta a guscio e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta secca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Frutta secca e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	2,0	4,0	-
Mandorle, pistacchi e semi di albicocca da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	12,0	15,0 ⁽⁵⁾	-
Nocciole e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	8,0 ⁽⁵⁾	15,0 ⁽⁵⁾	-

Mandorle, pistacchi e semi di albicocca destinati al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari ⁽⁴¹⁾	8,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-
Nocciole e noci del Brasile destinate al consumo umano diretto o all'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari ⁽⁴¹⁾	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta a guscio (diversa da mandorle, pistacchi, semi di albicocca, nocciole e noci del Brasile, destinati al consumo umano diretto o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari) e relativi prodotti di trasformazione, destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari	2,0 ⁽⁵⁾	4,0 ⁽⁵⁾	-
Frutta a guscio (diversa da mandorle, pistacchi, semi di albicocca e noci del Brasile da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari) da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0 ⁽⁵⁾	10,0 ⁽⁵⁾	-
Tutti i cereali e loro prodotti derivati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali (eccetto: granturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari; alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini; alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti)	2,0	4,0	-
Granturco da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima del consumo umano o dell'impiego quale ingrediente di prodotti alimentari	5,0	10,0	-
Latte crudo ⁽⁶⁾ , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	-	-	0,05

Le seguenti specie di spezie: <i>Capsicum spp.</i> (frutti secchi dello stesso, interi o macinati, compresi peperoncini rossi, peperoncino rosso in polvere, pepe di Caienna e paprica); <i>Piper spp.</i> (frutti dello stesso, compreso il pepe bianco e nero); <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata); <i>Zingiber officinale</i> (zenzero); <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette spezie	5,0	10,0	-
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini ⁽³⁾⁽⁷⁾	0,1	-	-
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento ⁽⁴⁾⁽⁸⁾	-	-	0,025
Alimenti dietetici a fini medici speciali ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ , destinati specificatamente ai lattanti	0,1	-	0,025

(1) Per gli ortaggi, la frutta e i cereali, si rimanda ai prodotti alimentari elencati nelle categorie di appartenenza secondo le definizioni di cui al regolamento (CE) n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 23 febbraio 2005, concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio (GU L 70 del 16.3.2005, p.1), modificato da ultimo dal regolamento (CE) n. 178/2006 (GU L 29 del 2.2.2006, p.3). Ciò significa tra l'altro che il grano saraceno (*Fogopyrum spp.*) è compreso tra i <<cereali>> e i prodotti a base di grano saraceno sono compresi tra i <<prodotti a base di cereali>>.

(3) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria, si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 96/5/CE della Commissione, del 16 febbraio 1996, sugli alimenti a base di cereali e gli altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini (GU L 49 del 28.2.1996, p.17), modificata da ultimo dalla direttiva 2003/13/CE (GU L 41 del 14.2.2003, p.33).

(4) I tenori massimi di riferimento ai prodotti pronti all'uso (commercializzati come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del fabbricante).

(5) I tenori massimi si riferiscono alla parte commestibile delle arachidi e della frutta a guscio. Se le arachidi e i frutti a guscio vengono analizzati interi, nel calcolo del tenore di aflatossine si suppone che tutta la contaminazione sia nella parte commestibile, tranne nel caso delle noci del Brasile.

(6) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (GU L 226 del 25.6.2004, p.22).

(7) I tenori massimi si riferiscono alla materia secca, che è definita conformemente al regolamento (CE) n. 401/2006.

(8) Per i prodotti alimentari indicati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 91/321/CEE della Commissione, del 14 maggio 1991, sugli alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento (GU L 175 del 4.7.1991, p.35) modificata da ultimo dalla direttiva 2003/14/CE (GU L 41 del 14.2.2003, p.37).

(9) Per i prodotti alimentari elencati in questa categoria si rimanda alla definizione di cui alla direttiva 1999/21/CE della Commissione, del 25 marzo 1999, sugli alimenti dietetici destinati a fini medici speciali (GU L 91 del 7.4.1999, p.29).

(10) I tenori massimi si riferiscono, nel caso del latte e dei prodotti lattiero-caseari, ai prodotti pronti per il consumo (commercializzati come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del produttore), mentre nel caso dei prodotti diversi dal latte e dai prodotti lattiero-caseari si riferiscono alla materia secca. La materia secca è definita conformemente al regolamento (CE) n. 401/2006.

(40) Semi oleosi di cui ai codici NC 1201, 1202, 1203, 1204, 1205, 1206, 1207 e prodotti derivati di cui al codice NC 1208; i semi di melone rientrano nel codice ex 1207 99.

(41) Nel caso in cui i relativi prodotti derivati/di trasformazione siano derivati/trasformati esclusivamente o quasi esclusivamente a partire dalla frutta a guscio in questione, i tenori massimi definiti per la corrispondente frutta a guscio si applicano anche ai prodotti derivati/di trasformazione. Negli altri casi si applica ai prodotti derivati/di trasformazione l'articolo 2, paragrafo 1 e 2 del regolamento (CE) n.1881/2006.

Alimentazione degli animali in ambito legislativo

L'alimentazione degli animali, destinati alla produzione zootecnica, è disciplinata dalla Direttiva 2002/32/CE, nel tempo modificata dalla Direttiva 2003/100/CE.

La direttiva stessa esclude totalmente la possibilità di assenza di sostanze indesiderabili in mangimi o materie prime per mangimi, definisce perciò che la loro quantità (in prodotti importati e non) sia ridotta, con dovuto riguardo alla tossicità acuta, bioaccumulo e degradabilità della sostanza, riducendo al minimo il rischio per la salute umana, degli animali e dell'ambiente.

La direttiva, oltre a fissare i livelli massimi di talune sostanze che definiscono “non conformi” i prodotti destinati all'alimentazione animale, vieta il loro mescolamento, a scopo di diluizione, con altri prodotti non contaminati.

Nell'elenco delle varie sostanze identificate come “indesiderate” nell'alimentazione animale, appaiono diverse micotossine.

Tabella 3: Contenuto massimo (espresso in ppm) di alcune micotossine in mangimi per animali, definito dalla Direttiva 2002/32/CE.

Sostanze indesiderabili	Prodotti destinati all'alimentazione degli animali	Contenuto massimo in mg/kg (ppm) di mangime al tasso di umidità del 12%
AFB₁ ^(A)	Tutte le materie prime ⁽²⁾ per mangimi ⁽¹⁾	0,02
	Mangimi completi ⁽³⁾ per bovini, ovini e caprini (ad eccezione di animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,02
	Mangimi completi per animali da latte	0,005
	Mangimi completi per vitelli, agnelli e capretti	0,01
	Mangimi completi per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02
	Altri mangimi completi	0,01
	Mangimi complementari ⁽⁴⁾ per bovini, ovini e caprini (ad eccezione dei mangimi complementari per gli animali da latte, vitelli, agnelli e capretti)	0,02
	Mangimi complementari per suini e pollame (salvo animali giovani)	0,02
	Altri mangimi complementari	0,005
DON ^(B)	Materie prime per mangimi: cereali e prodotti a base di cereali (ad eccezione di sottoprodotti del granturco)	8
	Materie prime per mangimi: sottoprodotti del granturco	12
	Mangimi complementari e completi (ad eccezione di mangimi complementari e completi per suini e vitelli <4 mesi, agnelli e capretti)	5
	Mangimi complementari e completi per suini	0,9
	Mangimi complementari e completi per vitelli <4 mesi, agnelli e capretti	2
ZEA ^(B)	Materie prime per mangimi: cereali e prodotti a base di cereali (ad eccezione di sottoprodotti del granturco)	2
	Materie prime per mangimi: sottoprodotti del granturco	3
	Mangimi complementari e completi per suinetti e scrofette (giovani scrofe)	0,1
	Mangimi complementari e completi per scrofe e suini da ingrasso	0,25

	Mangimi complementari e completi per vitelli, bovini da latte, ovini (inclusi agnelli) e caprini (inclusi capretti)	0,5
OTA ^(B)	Materie prime per mangimi: cereali e prodotti a base di cereali	0,25
	Mangimi complementari e completi per suini	0,05
	Mangimi complementari e completi per pollame	0,1
Fumonisine B₁ + B₂ ^(B)	Materie prime per mangimi: granturco e prodotti derivati	60
	Mangimi complementari e completi per suini, equidi, conigli e animali da compagnia	5
	Mangimi complementari e completi per pollame, vitelli <4 mesi, agnelli e capretti	20
	Mangimi complementari e completi per pesci	10
	Mangimi complementari e completi per ruminanti adulti >4 mesi e visoni	50
Segale cornuta (Claviceps purpurea) ^(C)	Tutti i mangimi contenenti cereali non macinati	1000
(A) Per quanto definito dalla Direttiva 2003/100/CE		
(B) Per quanto definito dalla Raccomandazione 2006/576/CE		
(C) Per quanto definito dalla Direttiva 2002/32/CE		
(1) Per i mangimi si riporta la definizione della Direttiva 2002/32/CE: prodotti di origine vegetale o animale, allo stato naturale, freschi o conservati, nonché i derivati della loro trasformazione industriale, come pure le sostanze organiche o inorganiche, semplici o in miscela, comprendenti o no additivi, destinati all'alimentazione degli animali per via orale		
(2) Per le materie prima per mangimi si riporta la definizione della Direttiva 2002/32/CE: diversi prodotti di origine vegetale o animale, allo stato naturale, freschi o conservati, nonché i derivati della loro trasformazione industriale, come pure le sostanze organiche o inorganiche, comprendenti o no additivi, destinati all'alimentazione degli animali per via orale, direttamente come tali o previa trasformazione, alla preparazione di mangimi composti oppure ad essere usati come supporto delle premiscele		
(3) Per i mangimi completi si riporta la definizione della Direttiva 2002/32/CE: miscele di mangimi che, per la loro composizione, bastano per assicurare una razione giornaliera		
(4) Per i mangimi complementari si riporta la definizione della Direttiva 2002/32/CE: miscele di mangimi che contengono tassi elevati di alcune sostanze e che, per la loro composizione, assicurano la razione giornaliera soltanto se sono associate ad altri alimenti per gli animali.		

TECNICHE ANALITICHE

Per la determinazione di micotossine negli alimenti, si rendono necessari metodi in grado di quantificare contaminanti a bassissime concentrazioni (nell'ordine di ppb, o nel caso dell'AFM₁ di ppt) e presenti in un numero svariato di matrici (Dall'Asta et al., 2006).

Un metodo di analisi deve essere caratterizzato da requisiti di accuratezza, robustezza, buona specificità ed elevata sensibilità, inoltre deve essere in grado di dare risultati con l'impiego del più piccolo quantitativo di campioni e nel minor tempo possibile.

Fondamentale punto di partenza è la corretta conduzione del campionamento a partire dalla matrice di analisi; questa si rende ancor più indispensabile nelle analisi delle micotossine a causa della loro notevole distribuzione eterogenea all'intero delle derrate alimentari (Whitaker et al., 1991; Rahmani et al., 2009).

L'estrazione in fase liquida dell'analita dall'alimento, rappresenta invece la base di partenza nella maggior parte dei metodi analitici al fine di ottenere una sua corretta distribuzione nel solvente (Cast, 2003).

L'AMBITO "BIOLOGICO"

La *Federazione Internazionale dei Movimenti per l'Agricoltura Biologica* (IFOAM, 1972) e la Commissione del *Codex Alimentarius* (1999) propongono una definizione dell'agricoltura biologica.

L'IFOAM la identifica come un sistema di produzione che sostiene la salute dei suoli, degli ecosistemi e delle persone; un sistema che si basa su processi ecologici e di biodiversità adatti alle condizioni locali, piuttosto che sull'uso di input con effetti avversi. L'agricoltura biologica viene vista come capace di

combinare la tradizione, l'innovazione e la scienza a beneficio dell'ambiente, e di promuovere rapporti equi e buona qualità di vita a tutti i soggetti che vengono coinvolti.

Per il *Codex Alimentarius* l'agricoltura biologica è *“un sistema integrato di produzione agricola, vegetale e animale, che evita il ricorso a fattori di produzione esterni all'attività agricola, privilegiando le pratiche di gestione. Essa impiega metodi colturali biologici e meccanici al posto di prodotti chimici di sintesi, tenendo conto dell'adattamento dei sistemi di produzione alle condizioni locali. L'agricoltura biologica promuove e migliora la salute dell'ecosistema e, in particolare, la biodiversità, i cicli biologici e l'attività biologica del suolo”*.

A livello comunitario la produzione biologica viene definita dal Regolamento (CE) n. 834/2007 come *“un sistema globale di gestione dell'azienda agricola e di produzione agroalimentare basato sull'interazione tra le migliori pratiche ambientali, un alto livello di biodiversità, la salvaguardia delle risorse naturali, l'applicazione di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali e una produzione confacente alle preferenze di taluni consumatori per prodotti ottenuti con sostanze e procedimenti naturali”*.

In questi termini il metodo biologico fornisce beni pubblici che tutelano l'ambiente, il benessere degli animali e lo sviluppo rurale, soddisfacendo la domanda di prodotti biologici da parte dei consumatori.

Le pratiche agricole biologiche, secondo quanto definito dalle prime considerazioni del regolamento, includono:

- Rotazione delle colture al fine di evitare l'inquinamento dell'ambiente, in particolare delle risorse naturali come suolo e acqua.
- Limiti molto ristretti nell'uso di pesticidi e fertilizzanti sintetici nella produzione biologica vegetale (produzione che dovrebbe contribuire a mantenere e a potenziare la fertilità del suolo nonché a prevenirne l'erosione), di antibiotici nell'allevamento degli animali, di additivi e coadiuvanti negli alimenti.

- Divieto dell'uso di organismi geneticamente modificati (OGM) o di prodotti derivati e ottenuti da OGM. I prodotti che contengono OGM possono comunque essere etichettati come biologici a patto che ne siano costituiti per un quantitativo inferiore allo 0,9%.
- Uso efficace delle risorse del luogo, al fine di limitare al minimo l'uso di risorse non rinnovabili.
- Scelta di piante ed animali in virtù delle loro capacità di adattamento alle condizioni locali.
- Allevamento di animali a stabulazione libera, all'aperto, nel rispetto del principio per cui il biologico è un'attività legata alla terra; nonché nutrizione degli stessi animali con foraggio biologico.
- Utilizzo di pratiche di allevamento e prevenzione delle malattie nel rispetto di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali, tenendo conto delle specifiche esigenze comportamentali secondo la specie di appartenenza.

Le modalità di applicazione di questo regolamento sono specificate dal Regolamento (CE) n. 889/2008 della Commissione in materia di produzione biologica, etichettatura e controlli, dal DM 18354/2009 definito dal MiPPAF (*Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali*) che completa a livello nazionale il quadro normativo di riferimento sul biologico e dal Regolamento (CE) n. 271/2010.

APPROCCIO AL BIOLOGICO

Nel 1824 in Inghilterra nacque la fondazione RSPCA (*Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*) istituita in supporto a leggi sulla protezione dei ruminanti da reddito. Nel 1964 l'intellettuale inglese Ruth Harrison pubblicò il libro “*Animal Machines*” sollevando la questione del benessere degli animali

allevati intensivamente sia in riferimento al loro indiscriminato sfruttamento a fini economici, sia rispetto alle possibili conseguenze negative sulla salubrità del prodotto zootecnico.

In seguito allo scalpore causato da questo libro, il governo inglese commissionò un rapporto ad un gruppo di ricercatori, definendo la nascita del *Brambell Report*. Questo rapporto, oltre ad essere uno dei primi documenti ufficiali relativi al benessere animale, enunciò il principio (ripreso poi dal *Farm Animal Welfare Council* nel 1979) delle cinque libertà per la tutela del benessere animale:

1. *Libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione*, la dieta deve essere sufficiente per quantità e qualità, atte a garantire lo stato di salute e il vigore fisico degli animali, nonché facile deve essere l'accesso all'acqua fresca.

2. *Libertà dai disagi ambientali*, l'ambiente (reparti di stabulazione) non deve essere troppo caldo o troppo freddo, né deve interferire sul riposo e sulla normale attività degli animali.

3. *Libertà dalle malattie e dalle ferite*, il sistema di allevamento deve ridurre al minimo i rischi di danni o infezioni e qualora qualsiasi caso dovesse verificarsi, questo deve essere tempestivamente riconosciuto e sottoposto a trattamento.

4. *Libertà di poter manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche*, lo spazio a disposizione degli animali deve essere sufficiente, i locali appropriati e deve essere fornita la compagnia di altri soggetti della stessa specie.

5. *Libertà dalla paura e dallo stress*, le condizioni di allevamento devono evitare la sofferenza mentale.

È proprio sulla quarta libertà che prende piede il biologico.

Hughes nel 1976 ha definito il benessere come “*lo stato di salute completo, sia fisico che mentale, nel quale l'animale si trova in armonia con l'ambiente che lo circonda*” più tardi, nel 1986 *Broom* lo ha invece definito come “*lo stato di un animale in relazione ai suoi tentativi di adattarsi all'ambiente*”.

Nel 2002 è stato condotto uno studio (Maeder et al., 2002) a dimostrazione che l'agricoltura biologica migliora la salute delle colture e degli animali ed aumenta il

numero di organismi benefici che vivono nel terreno.

Uno studio del *Research Institute of Organic Agriculture (FiBL)* ha dimostrato che in media l'agricoltura biologica, grazie all'incremento di fertilità e contenuto di humus che fornisce al terreno, restituisce il 12-15% in più di anidride carbonica nel terreno rispetto ai fertilizzanti minerali. Viene riportato infatti che, a parità di ettari, le emissioni di gas serra con le coltivazioni biologiche sono inferiori del 32% rispetto a coltivazioni che utilizzano fertilizzanti minerali e del 35-37% rispetto a coltivazioni a concimi convenzionali animali.

In Italia il biologico decolla agli inizi degli anni '80 con la produzione regolamentata da norme di certificazione straniere e destinata all'esportazione al nord Europa.

Nel giro di pochi anni, nascono le prime associazioni regionali per l'agricoltura biologica e la necessità di norme su scala nazionale definisce l'istituzione della Commissione Nazionale "*Cos'è biologico*".

Alla fine degli anni ottanta l'AIAB (*Associazione Italiana per l'Agricoltura Biologica*) stabilisce il primo sistema nazionale di supervisione delle associazioni di certificazione regionali e nel 1993 entra in vigore il primo regolamento europeo, il 2092/91, definendo norme di produzione e trasformazione, identificando un sistema di etichettatura univoco riconosciuto in un logo comunitario.

Dal gennaio del 2009 tale regolamento è stato sostituito dal Regolamento (CE) n. 834/2007, ancora oggi in vigore insieme al Regolamento (CE) n. 889/2008 e al Regolamento (CE) n. 1235/2008.

Il massimo sviluppo dell'agricoltura biologica lo si riesce a collocare nel corso dell'anno 2001, grazie a studi di mercato condotti dall'Ismea (Castiglione et al., 2005).

Negli ultimi anni il consumo di prodotti biologici nell'UE è costantemente aumentato, raggiungendo circa il 2% del mercato europeo. Recenti studi stimano tra l'altro che il mercato dei prodotti biologici cresca del 10-15% l'anno. Contestualmente cresce anche la produzione: circa il 5% della superficie agricola

della comunità e oltre il 2% delle aziende agricole (si fa riferimento a più di 200.000 aziende) risultano oggi certificate per la produzione biologica (Fersino et al., 2008).

In particolare l'Italia, con il valore attribuito al biologico di 3 miliardi di euro, si colloca in una graduatoria di fatturati europei, al quarto posto, dopo la Germania, la Francia ed il Regno Unito e al sesto nel giro d'affari del mercato biologico del mondo (Bioreport, 2012).

Stando agli ettari di superficie coltivata con metodo biologico, l'Italia si trova anche tra i primi dieci paesi al mondo, e al primo posto per la percentuale più alta rispetto al totale della SAU (FiBL-IFOAM, 2012; Bioreport, 2012). In termini di superficie agricola utilizzata (SAU), dopo le colture foraggere, i cereali rappresentano il raggruppamento più importante dell'agricoltura biologica italiana. I principali orientamenti produttivi sono i cereali, il foraggio, i pascoli e l'olio.

Per quanto riguarda le produzioni animali, i dati evidenziano rispetto all'anno 2011, un importante aumento del numero di capi di suini, ovini, caprini e avicoli. Dall'analisi dei dati forniti dagli organismi di controllo al Ministero delle Politiche Agricole Alimentari ed elaborati dal SINAB (*Sistema d'Informazione Nazionale sull'Agricoltura Biologica*), risulta che gli operatori del settore biologico in Italia sono 48.269. Si rileva a tal punto un aumento complessivo del numero di operatori del 1,3% rispetto ai dati riferiti all'anno 2010.

La Sicilia e la Calabria si presentano come le regioni con la maggior presenza di aziende agricole biologiche, mentre l'Emilia Romagna, la Lombardia e il Veneto si dimostrano essere quelle con il maggior numero di aziende di trasformazione impegnate nel settore.

Da un report condotto da *Ismea, Panel Famiglie/GFK-Eurisko*, è possibile notare come, nel corso dell'anno 2012, la spesa di prodotti biologici sia aumentata del 7,3% rispetto al 2011 (Carbonari, 2012).

La scelta maggiore ricade sull'acquisto delle uova, che raggiunge il 13% della spesa complessiva dei prodotti biologici; dello yogurt e del latte alimentare (9-

8%) e delle confetture e marmellate (con l'8%).

A livello di prodotti, non vi sono sostanziali differenze di consumo tra le diverse regioni del Paese, eccetto per le bevande alla soia e per l'olio di extravergine di oliva, più apprezzati al Nord-Ovest; le bevande istantanee, più consumate al Centro; i cereali per la prima colazione, la lattuga e i preparati per il brodo più acquistati al Nord-Est.

CONVENZIONALE E BIOLOGICO A CONFRONTO

In virtù del divieto di utilizzo di sostanze chimiche nell'agricoltura biologica, Lairon (2009) ha sollevato la questione che prodotti coltivati con questo metodo possono presentare livelli di contaminazione da micotossine superiori ai corrispettivi prodotti ottenuti con metodi convenzionali.

Studi finora condotti riportano risultati contrastanti. Le prime produzioni biologiche non consideravano la reale preoccupazione delle micotossine, in che ha condizionato in passato, alte contaminazioni nel prodotto finito (Birzele et al., 2000; Brera et al., 2006; D'Arco et al., 2009; Silva et al., 2009). La crescente sensibilizzazione nei confronti di questi metaboliti tossici, ha invece definito un significativo calo di contaminazione nel biologico, facendolo risultare così meno contaminato rispetto allo stesso alimento derivato dalla produzione convenzionale. Valori più bassi di micotossine sono stati infatti ritrovati in diversi prodotti biologici: nel grano (Hoogenboom et al., 2008; Klinglmayr et al., 2010); nella segale (Döll et al., 2002); in prodotti a base di cereali (Biffi et al., 2004); in pane, biscotti, muesli, succo di mela (Parent-Massin et al., 2002); in alimenti per l'infanzia (Beretta et al., 2002).

Altri studi non hanno invece riscontrato alcuna significativa differenza (Ariño et al., 2007; González-Osnaya et al., 2007; Ibáñez-Vea et al., 2012).

Secondo gli studi condotti da Malmauret (et al., 2002) il biologico, pur risultando meno contaminato rispetto al convenzionale, presenta nei suoi livelli di contaminazione, una concentrazione di micotossine più alta. D'altra parte,

González (et al., 2006) ha identificato una frequenza di infestazione più alta nel riso coltivato biologicamente rispetto al convenzionale, ma con quantità di contaminanti più basse.

Ghidini insieme ad altri autori, nel 2005, confrontando ancora i prodotti convenzionali con quelli biologici, ha riscontrato una maggiore contaminazione di AFM₁ nel latte biologico, con un significativo superamento del limite fissato dal regolamento comunitario, Regolamento (CE) n. 466/2001.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA

Il presente lavoro nasce con lo scopo di monitorare la contaminazione da micotossine, aflatossine B₁ e M₁, rispettivamente in farine e latte; prodotti scelti da produzioni biologiche e convenzionali.

L'attenzione nei riguardi di queste tossine, rispecchia sia il continuo rischio cui si rapportano agricoltori e allevatori, sia il programma straordinario di monitoraggio e sorveglianza, emanato dal Ministero della Salute al termine dell'estate 2012 (dal titolo: *Procedure operative straordinarie per la prevenzione e la gestione del rischio contaminazione da aflatossine nella filiera lattiero-casearia e nella produzione del mais destinato all'alimentazione umana e animale, a seguito di condizioni climatiche estreme*).

Il clima particolarmente torrido e la forte umidità di quei mesi, ha infatti portato ad un'impennata delle contaminazioni da micotossine, rendendo impossibile l'impiego in zootecnia del raccolto del mais della campagna del 2012, in virtù del superamento dei livelli definiti dal regolamento, soprattutto nelle regioni del Veneto, Lombardia ed Emilia Romagna.

Data l'elevata difficoltà nelle produzioni convenzionali a prevenire, o comunque mantenere costanti i livelli di contaminazione da questi funghi tossigeni, risulta logico pensare come l'ostacolo possa presentarsi di difficile superamento anche nell'ambito dell'agricoltura biologica, dove vige il divieto d'utilizzo di agenti antifungini e chimici in generale.

Contestualmente a questo tipo di ricerca, per quanto riguarda il capitolo farine, ci si è proposto anche di valutare un quantitativo minimo, relazionato ad una loro confezione commerciale, che sia attendibile per la valutazione della contaminazione da aflatossina B₁. Tutto ciò partendo dal quantitativo minimo proposto da diversi produttori di kit immunoenzimatici.

La preoccupazione dell'ottenimento di un campione significativo, nell'ambito

delle analisi delle micotossine, è ad oggi ancora alta. La particolare distribuzione di queste tossine, in un ambiente come un silos di magazzinaggio di cereali, definisce una loro contaminazione poco omogenea, nominata appunto a “*macchia di leopardo*”, che si ripercuote sulla rappresentatività di un campione scelto, sul totale, per la conduzione delle analisi.

Ecco come un'ottima gestione di campionamento detta le basi per un giusto monitoraggio di questi contaminanti in derrate alimentari tanto sensibili.

MATERIALI E METODI

Farine e latte

L'indagine è stata condotta su **90** campioni di farina e su **58** confezioni di latte acquistati in diversi punti vendita nei dintorni di Bologna (negozi della GDO, supermercati, piccoli alimentari, fornitori specializzati) per avere, nella panoramica a disposizione del consumatore, un monitoraggio soddisfacente dei prodotti sullo “scaffale”.

Son state quindi acquistate:

- **19** farine di grano
- **42** farine di mais
- **19** farine biologiche di grano
- **8** farine biologiche di mais
- **1** preparato per pane nero ai 7 cereali
- **1** farina biologica di orzo

Son state acquistate anche:

- **5** confezioni di latte intero UHT
- **8** confezioni di latte parzialmente scremato UHT
- **9** confezioni di latte scremato UHT
- **2** confezioni di latte biologico intero UHT
- **2** confezioni di latte biologico parzialmente scremato UHT
- **3** confezione di latte fresco intero
- **5** confezioni di latte fresco parzialmente scremato
- **8** confezioni di latte biologico fresco intero
- **5** confezioni di latte biologico fresco parzialmente scremato
- **1** confezione di latte di capra intero UHT
- **2** confezioni di latte di capra parzialmente scremato UHT

- 1 confezione di latte di capra biologico intero UHT
- 1 confezione di latte di capra biologico parzialmente scremato UHT
- 1 confezioni di latte di capra biologico fresco intero
- 1 confezioni di latte di capra biologico fresco parzialmente scremato
- 3 confezioni di latte fresco prelevate dai distributori
- 1 confezione di latte biologico prelevato dai distributori

Tutti i prodotti sono stati opportunamente catalogati, sotto un proprio codice identificativo e registrati nel quaderno di laboratorio dedicato (FT 0001/13).

Analisi campioni di farina

Fase preparativa

Nella conduzione delle analisi delle farine è stata seguita la Procedura Operativa Standard messa a punto nel corso delle prove eseguite in occasione di questo lavoro.

Nel definire la quantità di campione da analizzare, si è partiti da quella proposta da molti produttori di kit immunoenzimatici, normalmente utilizzati per test di screening: un'aliquota da 5 g per campione.

Nella fase di pianificazione del lavoro ci si è proposti di migliorare la metodica di estrazione e mettere a punto le più ottimali condizioni cromatografiche, per lavorare con il minor utilizzo di materiali e ridurre i tempi delle corse cromatografiche pur mantenendo picchi ben risolti.

A tal fine sono state effettuate molteplici prove.

La metodica utilizzata come punto di partenza, messa a punto nei laboratori del Servizio di Farmacologia e Tossicologia (SOP FT 7.5-02-002 Determinazione di aflatossina B1 in granelle e foraggio mediante HPLC) prevedeva l'estrazione con diclorometano previa acidificazione con acido citrico al 20%, un passaggio in bagno ad ultrasuoni, la filtrazione dell'estratto diclorometanico mediante imbuti di Büchner, la concentrazione fino alla portata a secco di un'aliquota dell'estratto in

UNIVAPO e la derivatizzazione con acido trifluoroacetico.

Nel presente lavoro si è cercato di ottimizzare la metodica senza stravolgerne i principi di base, ma riducendo i volumi di solvente utilizzati e sostituendo la fase di filtrazione con due passaggi in centrifuga, utilizzando per questi ultimi materiale monouso (provettoni tipo Falcon da 50 ml e da 15 ml).

Una modifica è stata anche apportata ai grammi di campionamento da prelevare per le analisi, passando dai 5, dimostratisi nel corso delle analisi poco rappresentativi, ai 20 grammi, suddivisi in quattro aliquote, soddisfacendo in proporzione quanto definito, per le grandi quantità da campionare, dal Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione.

Per la valutazione quantitativa di aflatoxina B₁ nelle farine sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota con le quali è stata allestita una curva di taratura non estratta (curva di riferimento). Quindi opportune aliquote di farina indenne sono state rinforzate con quantitativi noti di AFB₁ e sottoposte alla stessa procedura di estrazione che è stata poi applicata ai campioni incogniti. Le soluzioni ottenute da questo processo (standard di calibrazione o standard estratti) sono state utilizzate per allestire una curva di taratura estratta (curva di calibrazione).

Dal confronto tra gli standard di riferimento e gli standard di calibrazione si può evincere la percentuale di recupero dell'analita dalla matrice che, secondo i criteri di accettazione del laboratorio in cui si è lavorato, deve essere compresa tra il 60 e il 100%.

Fase analitica

Per la parte analitica è stato utilizzato un sistema HPLC *Beckman System Gold* costituito da una pompa *System Gold Programmable Solvent Module 126*, un campionatore automatico *HTA HT 800 L* e un detector fluorimetrico *Jasco 821 FP*. Il sistema è stato controllato mediante il *Software 32 Karat (Beckman Coulter)* che ha permesso l'elaborazione e la gestione dei dati analitici.

Per le prove preliminari, è stata impiegata una colonna "classica" C18 150 x 4,6

mm 5 μ m; successivamente si è passati a colonne di tipo “monolitico”, utilizzate sia singolarmente che in serie.

Sono state eseguite quindi numerose prove di eluizione, sia isocratiche che in gradiente.

In ultimo si è optato per l'utilizzo della colonna “monolitica” *phenomenex Onyx 100 x 4,6 mm*, particolarmente innovativa.

La peculiarità è dovuta essenzialmente alla sua costituzione in una barra di silice ad elevata porosità, caratterizzata dalla combinazione di una struttura macroporosa ed una mesoporosa.

I macropori hanno un diametro medio di 2 μ m e il loro insieme forma una fitta rete attraverso cui la fase mobile può scorrere ad alto flusso ed a bassa pressione, riducendo sensibilmente il tempo di separazione.

I mesopori formano la struttura porosa fine (130 Å) del materiale e assicurano un'alta area superficiale, requisito fondamentale per aumentare le interazioni con gli analiti e la probabilità di separazione.

Questa particolare struttura permette rapide variazioni di flusso senza elevate contropressioni, intasamento minimo da eventuali contaminanti dei campioni e, nelle eluizioni in gradiente, tempi di riequilibrio molto ridotti.

Tutto ciò si traduce in analisi di minor durata e minore sollecitazione dei sistemi HPLC.

Per la conduzione delle analisi con questa colonna si è messa a punto una eluizione in gradiente, utilizzando le seguenti fasi mobili:

fase mobile A: H₂O : CH₃CN : CH₃CHOHCH₃ : CH₃COOH 1% (91 : 1 : 1 : 7)

fase mobile B: H₂O : CH₃CN : CH₃CHOHCH₃ : CH₃COOH 1% (43 : 25 : 25 : 7)

<i>Time (min)</i>	<i>B (%)</i>	<i>Flow (ml/min)</i>	<i>Duration (min)</i>
0	16	1,3	
4,5	47,5		4,5
6		1	1
9	16		1
10		1,3	1

Il volume di iniezione è stato stabilito a $20 \mu\text{l}$, mentre il detector fluorimetrico è stato impostato alle seguenti condizioni: $\lambda \text{ Ex: } 365 \mu\text{m}$, $\lambda \text{ Em: } 418 \mu\text{m}$.

A queste condizioni il tempo di ritenzione dell'aflatossina B₁ è di circa 8 minuti con una durata della corsa cromatografica di 11 minuti .

Validazione del metodo

Per la validazione del metodo analitico messo a punto per l'analisi di aflatossina B₁ sono stati considerati i seguenti parametri:

- Precisione definita come la concordanza tra i risultati di prove mutuamente indipendenti effettuate in condizioni stabilite. La precisione esprime il grado di ripetibilità di un valore su un gruppo di misure individuali di un analita, quando la procedura viene applicata in modo ripetitivo ad aliquote multiple provenienti da un singolo volume di campione. Viene calcolata con il coefficiente di variazione (CV%).
- Accuratezza definita come il grado di concordanza tra il risultato di una misurazione (o tra la media di una serie di misure) ed il valore convenzionalmente vero del misurando. L'accuratezza esprime il grado di corrispondenza dei risultati ottenuti dal metodo rispetto al valore vero dell'analita. Viene quantificata in termini di errore relativo (ER%).
- Limite di rilevabilità (Lod) rappresenta la minima concentrazione di analita che può essere rilevata, ma non necessariamente quantificata, con ragionevole affidabilità da una certa procedura analitica. In altre parole, il Lod, esprime la concentrazione di analita corrispondente al minimo segnale significativo, un segnale vicino a quello del bianco (soluzione in cui l'analita è virtualmente assente) ma da esso significativamente diverso. Generalmente viene accettato un rapporto segnale-rumore di 3:1.
- Limite di quantificazione (Loq) rappresenta la minima concentrazione di

analita che può essere quantificata con accettabile accuratezza e precisione da una certa procedura analitica. Il Loq esprime, nell'analisi quantitativa, lo standard più basso nella curva di calibrazione.

- Specificità definita come la capacità di un metodo analitico di misurare accuratamente e specificatamente un analita in presenza di altre specie nel campione allo studio. Nella cromatografia un metodo è specifico se, applicando la stessa procedura estrattivo-analitica ad un campione “bianco”, questo non mostra interferenze significative al tempo di ritenzione dell'analita di interesse.
- Linearità definita come la capacità di un metodo di produrre risultati, direttamente o attraverso trasformazioni matematiche ben definite, proporzionali alla concentrazione degli analiti nei campioni nell'ambito di un determinato intervallo. La correlazione è una misura della forza di una relazione lineare tra due variabili quantitative. Il coefficiente di correlazione (R) o di determinazione (R^2) esprimono il grado di interdipendenza tra due variabili quantitative.
- Range definisce l'intervallo tra la concentrazione più alta e quella più bassa dell'analita, determinate dimostrando precisione, accuratezza e linearità.
- Recupero definito come il confronto tra la risposta che si ottiene dal rilevatore nell'analisi di un campione, costituito dalla matrice biologica addizionata con una quantità nota dell'analita (dopo estrazione), con quella di una soluzione della stessa concentrazione dell'analita sciolto in un solvente.

Analisi campioni di latte

Fase preparativa

Nella conduzione delle analisi del latte è stato scelto di utilizzare la tecnica di estrazione-purificazione dei campioni mediante colonnine di immunoaffinità.

Le colonnine di immunoaffinità utilizzate sono prodotte dalla *VICAM (U.S.A.)*; la scelta è ricaduta su questo tipo di prodotto in quanto già testato nei laboratori del Servizio di Farmacologia e Tossicologia in occasione di un proficiency-test dimostrandosi robusto ed affidabile.

È stata dunque seguita la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore.

La metodica prevede i seguenti passaggi:

- Portare le colonnine, i solventi ed i campioni di latte a temperatura ambiente (18-22 °C), circa un'ora prima dell'uso.
- Previa accurata miscelazione dell'intera confezione, misurare 50 ml di latte in cilindri graduati e trasferirli in provettoni tipo Falcon da 50 ml.
- Centrifugare in centrifuga refrigerata a 5 °C a 1540 xg per 15 minuti.
- Rimuovere la fase di grasso affiorata in superficie.
- Allestire l'apposito sistema da vuoto posizionandovi le colonnine.
- Eluire il tampone fosfato salino di conservazione contenuto nelle colonnine.
- Montare i “column reservoir” e caricare il latte sgrassato.
- Lasciarlo fluire a velocità di 1-2 gocce/secondo e trascinare le ultime gocce con il vuoto.
- Cambiare “column reservoir” e lavare con 10 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1-2 gocce/secondo.
- Lavare nuovamente con 10 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1-2 gocce/secondo, asciugando le cartucce con il vuoto.
- Lavare con 1,25 ml di soluzione CH₃CN : MeOH (3 : 2) a velocità di 1 goccia/2-3 secondi e raccogliere l'eluato in una provetta di vetro.
- Lavare con 1,25 ml di H₂O per HPLC a velocità di 1 goccia/2-3 secondi e

raccogliere l'eluato nella stessa provetta di vetro. Il volume totale corrisponde a 2,5 ml e la concentrazione finale del campione è 20:1. La soluzione risultante dalle due eluizioni è la seguente: H₂O : CH₃CN : MeOH (5 : 3 : 2).

- Agitare su Vortex e filtrare su filtri di nylon di porosità 0,45 μ m.

Analogamente a quanto già riportato nelle analisi delle farine, per la valutazione quantitativa di aflatossina M₁ nel latte sono state preparate soluzioni standard a concentrazione nota con le quali è stata allestita una curva di taratura (curva di riferimento). Quindi opportune aliquote di latte indenne sono state rinforzate con quantitativi noti di AFM₁ e sottoposte alla stessa procedura di estrazione/purificazione che è stata poi applicata ai campioni incogniti. Le soluzioni ottenute da questo processo (standard di calibrazione o standard estratti) sono state utilizzate per allestire una curva di taratura estratta (curva di calibrazione).

Allestimento delle soluzioni di riferimento e di calibrazione

A partire da una soluzione standard certificata di AFM₁ 10 ppm in CH₃CN sono state allestite per diluizione le seguenti soluzioni standard di lavoro:

100 μ l soluzione 10 ppm + 900 μ l CH₃CN = 1 ppm

200 μ l soluzione 1 ppm + 800 μ l H₂O = 200 ppb

200 μ l soluzione 200 ppb + 1800 μ l H₂O = 20 ppb

Di seguito, a partire dalla soluzione di AFM₁, 20 ppb sono state allestite, per diluizione con una soluzione H₂O : CH₃CN : MeOH (5 : 3 : 2) le seguenti soluzioni standard di riferimento:

125 μ l soluzione 20 ppb + 875 μ l soluzione fase mobile = 2,5 ppb

100 μ l soluzione 20 ppb + 900 μ l soluzione fase mobile = 2 ppb

75 μ l soluzione 20 ppb + 925 μ l soluzione fase mobile = 1,5 ppb

50 μ l soluzione 20 ppb + 950 μ l soluzione fase mobile = 1 ppb

25 μ l soluzione 20 ppb + 975 μ l soluzione fase mobile = 0,5 ppb

Per l'allestimento delle soluzioni standard di calibrazione, aliquote di 50 ml di

latte indenne sono state rinforzate con i quantitativi della soluzione AFM₁ 20 ppb di seguito riportati.

50 ml di latte + 312,5 µl soluzione 20 ppb = 2,5 ppb (0,125 ppb in matrice)

50 ml di latte + 250 µl soluzione 20 ppb = 2 ppb (0,100 ppb in matrice)

50 ml di latte + 187,5 µl soluzione 20 ppb = 1,5 ppb (0,075 ppb in matrice)

50 ml di latte + 125 µl soluzione 20 ppb = 1 ppb (0,05 ppb in matrice)

50 ml di latte + 62,5 µl soluzione 20 ppb = 0,5 ppb (0,0025 ppb in matrice)

Le concentrazioni indicate fanno riferimento alle soluzioni risultanti al termine della procedura di estrazione/purificazione cui sono sottoposti i campioni di latte. Tenendo presente il fattore di concentrazione insito alla metodica (20:1), la concentrazione effettiva di AFM₁ in matrice è 20 volte inferiore a quella delle soluzioni di cui sopra.

Fase analitica

Per quanto riguarda la strumentazione utilizzata nella fase analitica delle analisi del latte, si rimanda alla stessa già descritta per le analisi delle farine.

Dopo molteplici prove condotte al fine di individuare le migliori condizioni cromatografiche di lavoro, sono state scelte le seguenti condizioni:

colonna Agilent Zorbax C18 250 x 4,6 mm 5 µm

eluizione isocratica

fase mobile A: H₂O : CH₃OH (89,5 : 10,5) al 67%

fase mobile B: CH₃CN al 33%

flusso 0,9 ml/min

Il volume di iniezione è stato stabilito a 100 µl, mentre il detector fluorimetrico è stato impostato alle seguenti condizioni: λ Ex: 360 µm, λ Em: 440 µm.

A queste condizioni il tempo di ritenzione dell'aflatossina M₁ è di circa 5,6 minuti con una durata della corsa cromatografica di 8 minuti.

Validazione del metodo

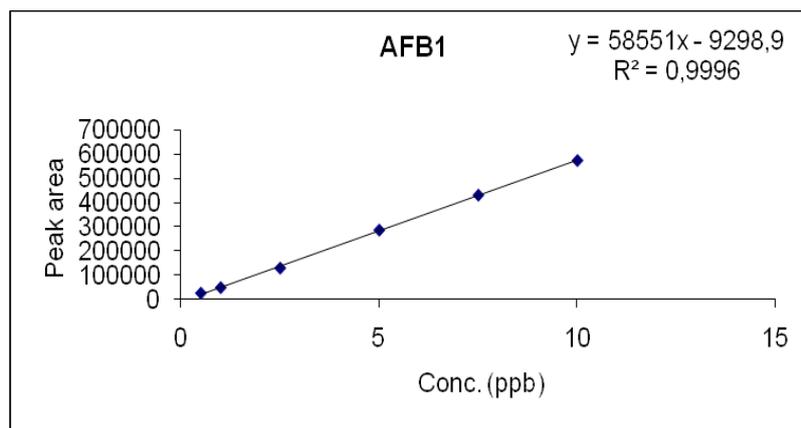
Per la validazione del metodo analitico messo a punto per l'analisi di aflatossina M₁ sono stati considerati gli stessi parametri illustrati per le analisi di aflatossina B₁, si rimanda perciò a quanto detto nella validazione del metodo nei campioni di farina.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Risultati delle analisi dei campioni di farina

AFB1 – Curva di riferimento

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	25201
1	48231
2,5	129098
5	286363
7,5	431773
10	575132



AFB1/mais – Curva di calibrazione

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	23165
1	45093
2,5	113847
5	225729
7,5	342337
10	462337

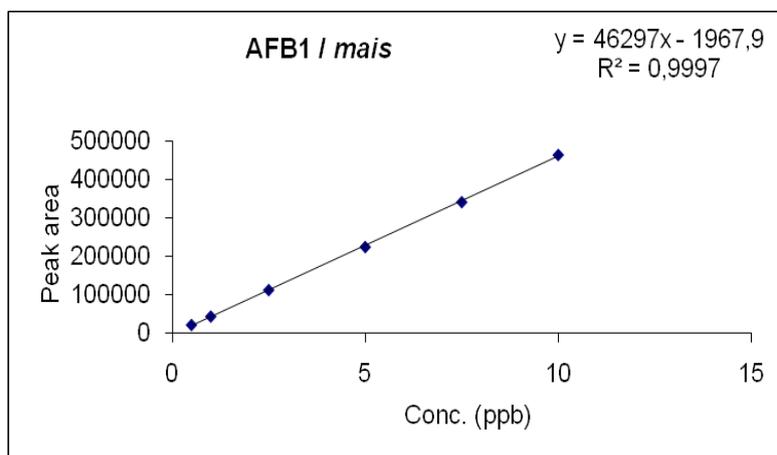


Tabella 4: Concentrazioni degli standard di riferimento e di calibrazione ricalcolate con l'equazione (*) della curva di regressione e le % di recupero.

Standard di riferimento	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	25201
1	48231
2,5	129098
5	286363
7,5	431773
10	575132

Standard di calibrazione	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	23165
1	45093
2,5	113847
5	225729
7,5	342337
10	464900

Equazione della retta di regressione (curva di riferimento):

$$y = 58551x - 9298,9$$

$$x = (y + 9298,9) / 58551 \text{ (*)}$$

Dove y = area picco

x = conc. AFB1

Standard di riferimento	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,59
1	0,98
2,5	2,36
5	5,05
7,5	7,53
10	9,98

Standard di calibrazione	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,55
1	0,93
2,5	2,10
5	4,01
7,5	6,01
10	8,10

Conc. nom. (ppb)	% Recupero
0,5	94,1%
1	94,5%
2,5	89,0%
5	79,5%
7,5	79,7%
10	81,1%
media rec.	84,78%

Recupero %= (Valore med. St. di calibrazione / Valore med. St. di riferimento) x 100

LOD (=0,15 ppb) e LOQ (=0,5 ppb)

Il LOD è stato calcolato come il valore corrispondente al triplo del rumore di fondo determinato al tempo di ritenzione di AFB₁ in farine indenni. Il valore medio di 6 determinazioni per le matrici considerate (farina di mais e grano) è stato moltiplicato per 3 e rapportato al segnale di uno standard di riferimento.

Tabella 5: Elenco dei campioni di farina e concentrazioni di AFB₁ rilevate nel corso della prima tornata di analisi.

Campioni analizzati		Concentrazione di AFB ₁ in ppb
N. di Riferimento	Specifiche del prodotto	
10	grano bio	n.d.
11	grano bio	n.d.
12	grano bio	n.d.
13	grano bio	n.d.
14	grano bio	n.d.
15	grano bio	n.d.
16	grano bio	n.d.
17	mais	n.d.
18	mais	n.d.
19	mais	0,40
20	mais	n.d.
21	mais	0,28
22	mais	n.d.
23	mais	n.d.
24	mais	n.d.
25	mais	n.d.
26	mais	n.d.
27	mais	n.d.
31	mais bio	n.d.
32	mais bio	0,64
33	mais bio	n.d.
34	mais bio	n.d.
35	mais bio	n.d.
36	grano bio	n.d.
37	grano bio	n.d.
39	grano bio	n.d.
40	grano bio	n.d.
45	grano	n.d.
46	grano	n.d.
47	grano	n.d.
48	mais	n.d.

49	mais	3,75
50	mais	n.d.
51	mais	n.d.
52	mais	n.d.
53	mais	n.d.
54	mais	n.d.
55	mais	n.d.
56	mais	n.d.
57	mais	n.d.
58	mais	n.d.
59	grano bio	n.d.
60	grano	n.d.
61	mais bio	0,64
62	mais	n.d.
63	mais	n.d.
64	mais	n.d.
65	mais	n.d.
66	mais	0,21
67	grano	n.d.
68	mais	n.d.
69	mais	0,08
70	mais	0,08
71	mais	n.d.
72	mais	0,18
73	grano	n.d.
74	grano	n.d.
75	grano	n.d.
76	grano	n.d.
77	grano	n.d.
78	grano	n.d.
79	grano	n.d.
80	grano	n.d.
81	prep pane nero	n.d.
82	grano bio	n.d.
83	mais	n.d.
84	mais	0,29
85	mais	n.d.

86	mais	0,63
87	mais	n.d.
98	mais	n.d.
99	mais	n.d.
100	grano	n.d.
101	grano	n.d.
102	mais	n.d.
103	mais	1,69
104	mais	n.d.
105	grano	n.d.
106	grano	n.d.
107	grano	n.d.
108	mais bio	0,98
109	grano bio	n.d.
110	grano bio	n.d.
111	mais bio	0,17
112	farina di orzo	n.d.
113	grano bio	n.d.
114	grano bio	n.d.
115	grano bio	n.d.
116	grano bio	n.d.
117	grano	n.d.

In accordo con gli scopi del presente lavoro, dopo questa prima tornata di analisi di tutte le farine campionate, si è deciso, per i campioni risultati positivi, di prelevare, previo accurato mescolamento, un'aliquota di 20 grammi e di suddividerla in 4 sub-aliquote da 5 grammi da sottoporre alla procedura estrattivo-analitica.

Di seguito si riportano i risultati così ottenuti.

Tabella 6A: Concentrazioni di AFB₁ rilevate nelle 4 aliquote dei campioni risultati positivi alla prima analisi.

Campione	Aliquota A (in ppb)	Aliquota B (in ppb)	Aliquota C (in ppb)	Aliquota D (in ppb)	Media (A-D) (in ppb)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %
19	0,53	0,32	0,31	0,45	0,40	0,11	27%
21	0,75	0,23	0,08	0,08	0,28	0,32	114%
32	0,83	0,38	1,19	0,16	0,64	0,46	72%
49	2,39	0,85	11,25	0,51	3,75	5,07	135%
61	0,08	2,34	0,08	0,08	0,64	1,13	177%
66	0,39	0,17	0,08	0,22	0,21	0,13	62%
69	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
70	0,08	0,15	0,19	0,32	0,18	0,10	56%
72	0,08	0,15	0,19	0,32	0,18	0,10	56%
84	0,57	0,08	0,15	0,38	0,29	0,22	77%
86	1,04	0,26	0,92	0,29	0,63	0,41	65%
103	1,66	1,39	2,19	1,51	1,69	0,35	21%
108	0,08	0,08	3,67	0,08	0,98	1,80	183%
111	0,17	0,18	0,18	0,17	0,17	0,01	3%

Per cinque di questi campioni si è deciso di prelevare un'altra aliquota di 20 grammi e, analogamente a quanto già fatto, di suddividerla in 4 sub-aliquote da 5 grammi da sottoporre alla procedura estrattivo-analitica.

Inoltre, nel corso della procedura di estrazione, per ciascuna delle 4 aliquote di ogni campione, sono stati prelevati 2,5 ml di estratto diclorometanico, riuniti (volume totale del mix: 10 ml), portati a secco e derivatizzati analogamente agli altri campioni.

Di seguito si riportano i risultati così ottenuti.

Tabella 6B: Concentrazioni di AFB₁ rilevate nelle seconde quattro aliquote di cinque campioni risultati positivi alla prima analisi.

Campione	Aliquota E (in ppb)	Aliquota F (in ppb)	Aliquota G (in ppb)	Aliquota H (in ppb)	Media (E-H) (in ppb)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)	Mix E-H (in ppb)
32	0,22	0,53	0,22	0,31	0,32	0,15	46%	0,31
49	13,16	0,40	0,46	0,87	3,72	6,30	169%	3,70
66	0,48	0,14	0,13	0,08	0,21	0,18	87%	0,22
103	2,45	1,66	1,40	1,44	1,74	0,49	28%	1,83
108	0,37	0,22	0,15	0,19	0,23	0,10	42%	0,23

Infine per valutare l'attendibilità di un risultato negativo derivante da uno screening con un'aliquota di 5 grammi di campione, si è deciso di procedere, analogamente a quanto già fatto per i primi campioni positivi, con altri, risultati negativi alla prima analisi.

Tabella 7: Concentrazioni di AFB₁ rilevate nelle quattro aliquote di quattro campioni risultati negativi alla prima analisi.

Campione	Aliquota A (in ppb)	Aliquota B (in ppb)	Aliquota C (in ppb)	Aliquota D (in ppb)	Media (A-D) (in ppb)	Deviazione standard	Coefficiente di variazione %
18	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
31	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,00	0%
33	0,08	0,08	0,09	0,21	0,11	0,06	51%
63	0,46	0,08	0,08	0,15	0,19	0,16	83%

Nel calcolo della concentrazione media di AFB₁, i valori rilevati nelle diverse aliquote inferiori al LOD sono stati convenzionalmente considerati pari a ½ LOD: 0,075 ppb (*Rapporti ISTISAN, 04/15*)

Figura 1: Cromatogramma standard AFB₁ 7,5 ppb non estratto.

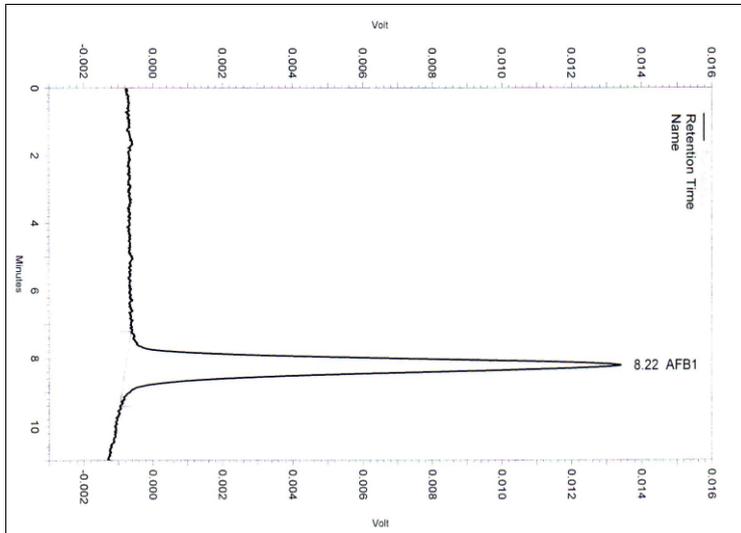


Figura 2: Cromatogramma standard AFB₁ 7,5 ppb estratto.

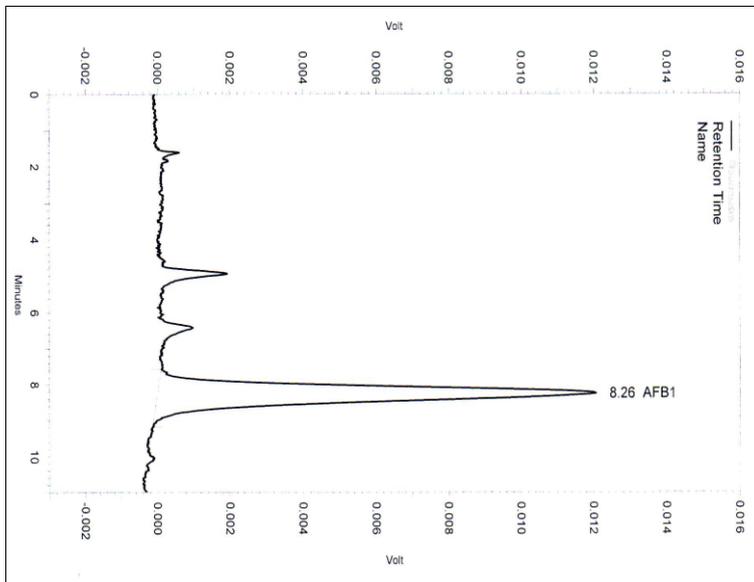


Figura 3: Cromatogramma campione "bianco".

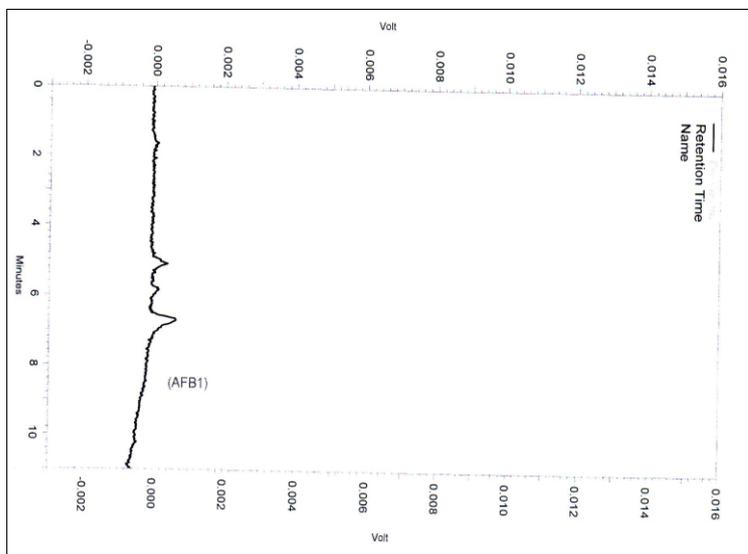
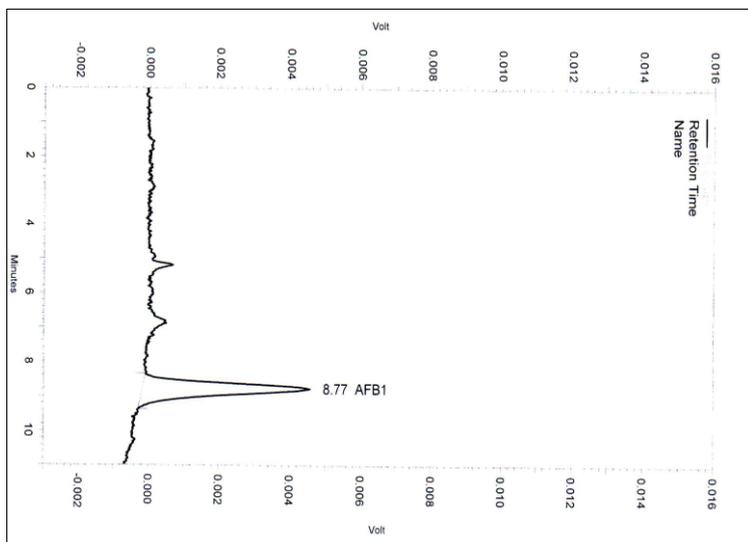


Figura 4: Cromatogramma campione incognito.



Discussione dei dati sperimentali dei campioni di farina

Come precedentemente riportato il metodo analitico utilizzato è stato messo a punto con alcune modifiche a partire dalla SOP FT 7.5-02-002 “Determinazione di aflatoossina B1 in granelle e foraggio mediante HPLC”. I risultati sono stati soddisfacenti, in quanto hanno permesso una riduzione dei volumi di solventi utilizzati e dei tempi di processazione dei campioni in analisi. La metodica ha infatti garantito un'elevata percentuale di recupero (circa 85%), un LOD e un LOQ rispettivamente di 0,15 ppb e di 0,5 ppb, valori molto inferiori al limite di legge, che in tutti i cereali e loro prodotti derivati, risulta essere pari a 2 ppb, per quanto stabilito nel Reg (CE) n. 1881/2006.

È importante sottolineare la validità della procedura di estrazione che, pur non prevedendo un passaggio di clean-up su colonnine SPE o di immunoaffinità, ha consentito di ottenere dei campioni analitici caratterizzati dall'assenza di interferenti nel tracciato cromatografico.

Ottima è risultata la linearità delle curve di taratura, sia nella curva di riferimento che in quella di calibrazione, con un coefficiente di determinazione sempre maggiore di 0,999.

In ultimo il gradiente messo a punto per la conduzione delle analisi in HPLC, insieme all'uso di una colonna di tipo monolitico, ha consentito un miglioramento dell'efficienza ed una riduzione della durata delle corse cromatografiche.

Sono stati analizzati 90 campioni di farina di cui 14 sono risultati positivi alla prima analisi di screening, rappresentando il 15,5% sul totale dei campioni. Si tratta di farine di mais, nello specifico 4 biologiche (rappresentando il 28,6% sul totale dei positivi) e 10 convenzionali (rappresentando il 71,4% sul totale dei positivi).

Si è deciso quindi di proseguire con ulteriori accertamenti su questi campioni positivi. Per ciascuno di essi, previa accurata miscelazione, è stata prelevata un'aliquota di 20 grammi a sua volta accuratamente miscelata, e suddivisa in quattro sub-aliquote da 5 grammi e successivamente analizzate.

Un ulteriore prelievo di 20 grammi poi suddiviso in 4 sub-aliquote è stato condotto su 5 di questi campioni positivi e quindi analizzato.

Per le considerazioni di seguito riportate è stato preso come riferimento, nella concentrazione da attribuire a ciascun campione di farina, la media delle concentrazioni rilevate nelle prime 4 aliquote da 5 grammi analizzate.

I dati ottenuti confermano quanto già riportato in letteratura: una maggiore incidenza di contaminazione nel mais rispetto al frumento. Considerando il dato dei campioni positivi in rapporto al totale dei soli campioni di farina di mais, la loro percentuale sale al 28%, un valore in questi termini non trascurabile.

D'altra parte invece, se si pone l'attenzione sulla concentrazione di AFB₁ in questi campioni, si nota come i valori non superino il limite di legge, salvo che per un unico isolato caso (campione 49, concentrazione media 3,75 ppb). Questi risultati sembrerebbero confermare che i controlli effettuati a monte della messa in commercio di questi prodotti, garantiscono quantomeno tenori di contaminazione al di sotto dei limiti di legge.

Prendendo in esame i soli campioni di farina di mais biologica, la percentuale di positivi è del 50%. Il dato è senz'altro elevato, ma considerando il numero esiguo di campioni di questa categoria analizzati (8), non è possibile affermare che in generale i campioni biologici siano più contaminati da AFB₁.

Confrontando i risultati della concentrazione di AFB₁ ottenuti nella prima analisi e la media dei risultati relativi alle analisi sulle quattro aliquote da 5 grammi è possibile notare una certa variabilità.

Tabella 8: Risultati della prima analisi e media dei risultati relativi alle successive quattro aliquote.

Campione	1 ^a analisi (screening)	Media Aliquote A-D	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
19	0,59	0,40	0,13	27%
21	0,22	0,28	0,04	17%
32	0,37	0,64	0,19	38%
49	0,84	3,75	2,06	90%
61	0,55	0,64	0,06	11%
66	0,29	0,21	0,06	23%
69	0,57	0,08	0,35	107%
70	0,75	0,08	0,47	114%
72	0,20	0,18	0,01	7%
84	3,89	0,29	2,55	122%
86	0,81	0,63	0,13	18%
103	1,31	1,69	0,27	18%
108	0,19	0,98	0,56	95%
111	0,18	0,17	0,01	4%

Considerando invece i dati relativi alla concentrazione di AFB₁ nelle singole quattro aliquote A, B, C, D di ogni campione, si può notare una più elevata variabilità. Nello specifico, facendo riferimento alla tabella 5.3, la concentrazione di alcune aliquote (campione 49 aliquote A e C, campione 61 aliquota B, campione 103 aliquota C, campione 108 aliquota C) è risultata essere superiore al limite di legge.

La stessa considerazione va fatta per le seconde quattro aliquote analizzate (in particolare nel campione 49 aliquota E, campione 103 aliquota E) come illustrato in tabella 5.4.

Sommando le concentrazioni di AFB₁ nelle diverse aliquote e facendo la media, si sono ottenuti valori largamente rientrati nel limite di legge, salvo che per un unico campione: il 49.

Questi dati sembrerebbero avallare la tesi che una aliquota di 5 grammi, pur

essendo una sub-aliquota di un totale di 20 grammi, a sua volta accuratamente miscelata, non garantisce una buona rappresentatività.

D'altra parte invece, confrontando i valori medi ottenuti dalle prime quattro aliquote, con quelli delle seconde quattro (tabella 5.7), si evince una variabilità decisamente più bassa, dimostrando una migliore rappresentatività dei 20 grammi nelle analisi.

Tabella 9: Confronto della media delle prime e delle seconde aliquote da 4.

Campione	Media A-D	Media E-H	Media A-H	Deviazione standard	Coefficiente di variazione (%)
32	0,64	0,32	0,48	0,23	47%
49	3,75	3,72	3,74	0,02	1%
66	0,21	0,21	0,21	0,00	0%
103	1,69	1,74	1,72	0,04	2%
108	0,98	0,23	0,61	0,53	88%

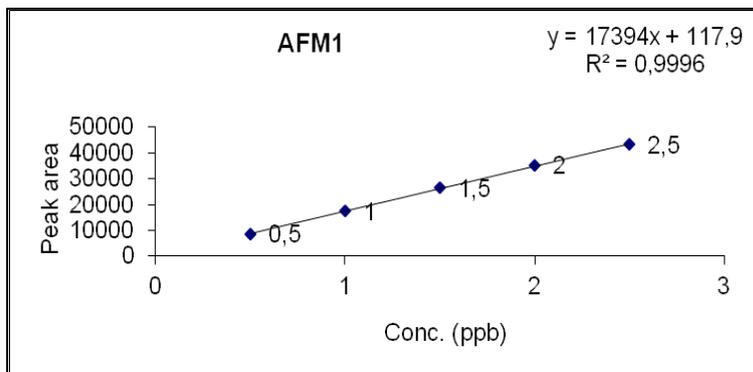
In ultimo, anche per i campioni negativi per la presenza di AFB₁, si è voluto constatare se lo screening con 5 grammi fosse sufficiente a comprovare la loro negatività. I risultati ottenuti mostrano come in due campioni (18, 31) tutte quattro le aliquote sono risultate negative, mentre nei rimanenti due (33, 63) l'aliquota D per il primo e le aliquote A e D per il secondo, riportano una minima positività (rispettivamente 0,21; 0,46 e 0,15 ppb).

Questi ultimi risultati però non permettono di promuovere i soli 5 grammi come un attendibile metodo di screening in quanto, anche nell'ambito delle prove sui campioni positivi condotte con quattro aliquote da 5 grammi, qualche valore è risultato inferiore al LOD.

Risultati dei campioni di latte

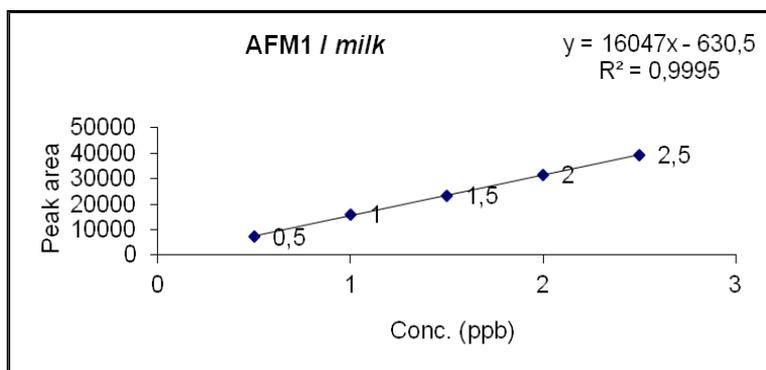
AFM1 – Curva di riferimento

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	8730
1	17361
1,5	26458
2	35198
2,5	43296



AFM1 – Curva di calibrazione

Conc. (ppb)	Peak area
0,5	7171
1	15850
1,5	23199
2	31537
2,5	39446



AFM1 – Curva di calibrazione con le concentrazioni di AFM1 effettive in matrice

Conc. (ppb)	Peak area
0,025	7171
0,050	15850
0,075	23199
0,100	31537
0,125	39446

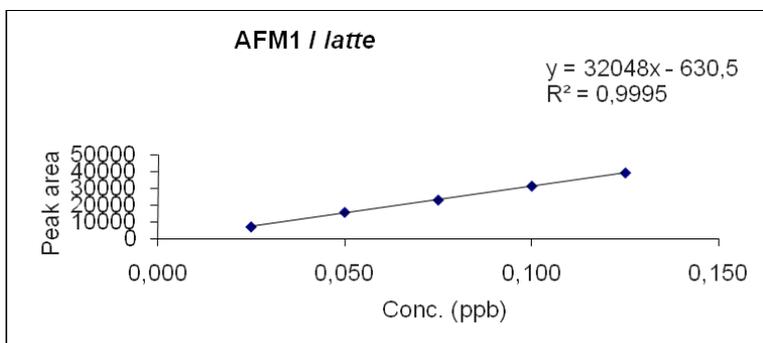


Tabella 10: Concentrazioni degli standard di riferimento e di calibrazione ricalcolate con l'equazione (*) della curva di regressione e le % di recupero.

Standard di riferimento	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	8730
1	17361
1,5	26458
2	35198
2,5	43296

Standard di calibrazione	
Conc. (ppb)	Peak area
0,5	7171
1	15850
1,5	23199
2	31537
2,5	39446

Equazione della retta di regressione (curva di riferimento):

$$y = 17394x - 117,9$$

$$x = (y + 117,9) / 17394^{(*)}$$

Dove y = area picco

$$x = \text{conc. AFM1}$$

Standard di riferimento	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,50
1	0,99
1,5	1,51
2	2,02
2,5	2,48

Standard di calibrazione	
Conc. nom. (ppb)	Conc. ricalcolata (*) (ppb)
0,5	0,41
1	0,90
1,5	1,33
2	1,81
2,5	2,26

Conc. nom. (ppb)	% Recupero
0,5	81,9%
1	91,2%
1,5	87,6%
2	89,5%
2,5	91,1%
media rec.	88,28%

Recupero %= (Valore med. St. di calibrazione / Valore med. St. di riferimento) x 100

LOD (=0,008 ppb) e LOQ (=0,025 ppb)

Analogamente a quanto fatto per le analisi delle farine, il LOD è stato calcolato come il valore corrispondente al triplo del rumore di fondo determinato al tempo di ritenzione di AFM₁ in campioni di latte indenne. Il valore medio di 6 determinazioni è stato moltiplicato per 3 e rapportato al segnale di uno standard di riferimento.

Tabella 11: Elenco dei campioni di latte e concentrazioni di AFM₁ rilevate.

Campioni analizzati		Concentrazione di AFM ₁ in ppb
N. Riferimento	di Specifiche del prodotto	
1	fresco intero bio	n.d.
2	fresco parz scr bio	0,026
3	fresco parz scr bio	0,017
4	fresco parz scr bio	0,017
5	capra intero bio	n.d.
6	UHT intero bio	0,023
7	capra parz scr bio	0,010
8	capra parz scr UHT bio	n.d.
9	UHT parz scr bio	0,021
28	fresco intero bio	n.d.
29	fresco intero bio	n.d.
30	fresco intero bio	0,019
88	UHT intero	0,018
89	UHT scremato	0,026
90	capra parz scr UHT	0,010
91	UHT scremato	n.d.
92	UHT parz scr	0,012
93	fresco intero bio	n.d.
94	fresco parz scr bio	0,016
95	capra fresco bio	n.d.
96	UHT parz scr bio	0,014
97	UHT intero bio	n.d.
118	fresco distributore	0,019
119	fresco distributore	0,013
120	fresco intero	0,018
121	UHT parz scr	0,020
122	fresco distributore	n.d.
123	fresco parz scr bio	0,016
124	fresco intero bio	n.d.
125	UHT intero	0,009
126	UHT scremato	0,023
127	UHT scremato	0,016
128	fresco parz scr	0,022

<i>Segue tabella 11</i>		
129	fresco parz scr	0,010
130	fresco parz scr	0,010
131	fresco intero	0,025
132	fresco intero bio	n.d.
133	fresco intero	0,015
134	fresco distributore bio	0,009
135	UHT parz scr	0,017
136	UHT scremato	0,009
137	UHT parz scr	0,021
138	UHT scremato	n.d.
139	UHT parz scr	n.d.
140	UHT parz scr	n.d.
141	capra UHT parz scr	n.d.
142	UHT scremato	0,010
143	UHT intero	0,009
144	UHT intero	n.d.
145	UHT parz scr	n.d.
146	UHT intero	0,010
147	capra UHT intero	n.d.
148	UHT parz scr	0,020
149	UHT parz scr	n.d.
150	UHT scremato	n.d.
151	UHT scremato	n.d.
152	fresco parz scr	0,025
153	fresco intero bio	n.d.

Figura 5: Cromatogramma standard AFM₁ 1 ppb non estratto.

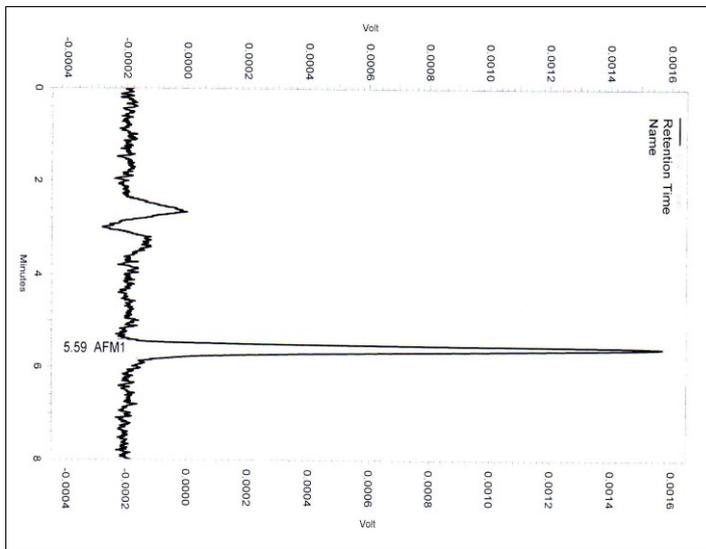


Figura 6: Cromatogramma Standard AFM₁ 1 ppb estratto.

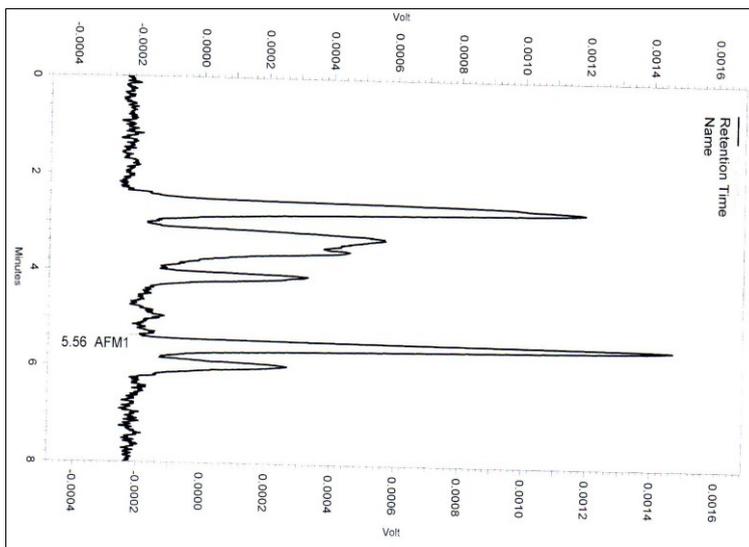


Figura 7: Cromatogramma campione “bianco”.

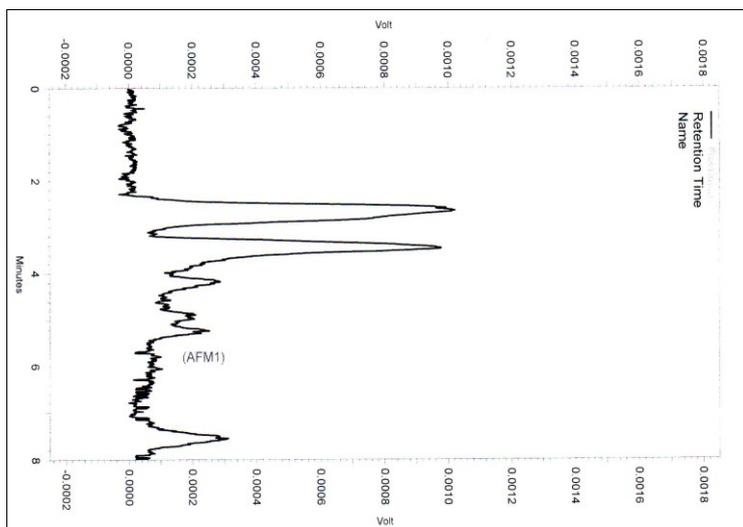
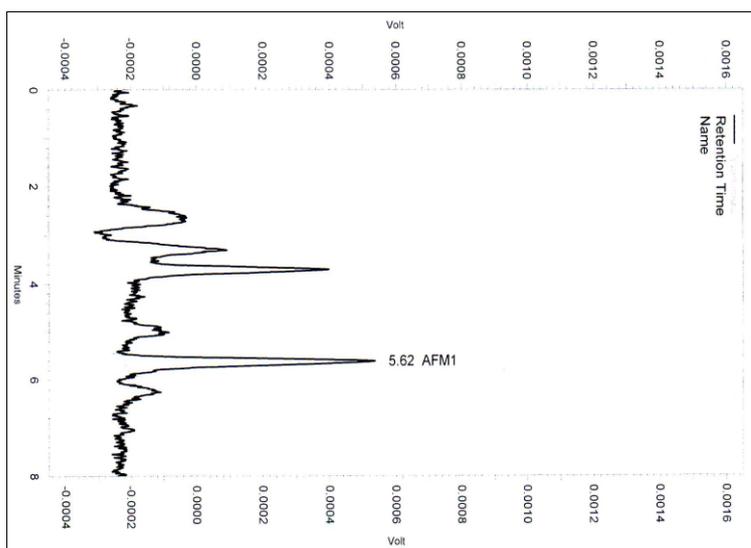


Figura 8: Cromatogramma campione incognito.



Discussione dei dati sperimentali dei campioni di latte

Come precedentemente riportato, per la ricerca di AFM₁ nel latte, è stato scelto di utilizzare la tecnica di estrazione-purificazione dei campioni mediante colonnine di immunoaffinità. È stata dunque seguita la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore (VICAM, U.S.A.).

Questa procedura rappresenta lo stato dell'arte nella analisi di micotossine nella matrice latte. La praticità della tecnica permette, a monte di un solo passaggio in centrifuga per la scrematura del latte, di caricare direttamente il campione in colonnina. Sono sufficienti quindi due soli lavaggi con acqua e l'eluizione dell'AFM₁ eventualmente presente nel campione, viene effettuata con due brevi passaggi, il primo di soluzione acetonitrile metanolo (3:2) e il secondo di acqua.

La metodica ha garantito un'elevata percentuale di recupero (circa 90%), un LOD di 0,008 ppb e un LOQ di 0,025 ppb, valori molto inferiori al limite di legge, che per quanto stabilito nel Reg (CE) n. 1881/2006 nel latte (crudo, trattato termicamente o destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte) risulta essere pari a 0,05 ppb.

È importante sottolineare la validità della procedura di clean-up che ha consentito di ottenere dei campioni analitici, pur concentrati 20 volte, caratterizzati dall'assenza di interferenti nel tracciato cromatografico. Ciò ha consentito di valutare concentrazioni di AFM₁ anche molto basse.

Ottima è risultata la linearità delle curve di taratura, sia nella curva di riferimento che in quella di calibrazione, con un coefficiente di determinazione sempre maggiore di 0,999.

Per quanto riguarda le condizioni cromatografiche, si è fatto riferimento ad analisi di AFM₁ già effettuate in passato presso i laboratori del Servizio di Farmacologia e Tossicologia, con aggiustamenti nella percentuale della fase mobile utilizzata, che hanno consentito un leggero accorciamento della corsa cromatografica.

Sono stati analizzati 58 campioni di latte di cui 35 sono risultati positivi per

l'AFM₁ rappresentando il 60,3% sul totale dei campioni esaminati. Nello specifico di questi 35 positivi, 11 provengono da produzione biologica (rappresentando il 31,4% sul totale dei positivi) e 24 da produzione convenzionale (rappresentando il 68,6% sul totale dei positivi).

Prendendo in esame i soli campioni di latte biologico (22), la percentuale di positivi è del 50%, mentre considerando i soli campioni di produzione convenzionale (36), la percentuale è del 67%. Le percentuali di positività sono senz'altro elevate, ma se si pone l'attenzione sulla concentrazione di AFM₁ in questi campioni, si nota come nessuno dei valori superi il limite di legge. Inoltre il livello medio è particolarmente basso (media 0,017 ppb) e la concentrazione massima rilevata è di 0,026 ppb, valore appena superiore al limite più rigoroso definito, da regolamento, per gli alimenti per lattanti (0,025 ppb).

Alla luce di questi risultati, valgono analoghe considerazioni già fatte per le farine: i controlli effettuati a monte della messa in commercio di questi prodotti sembrerebbero garantire livelli di contaminazione al di sotto dei limiti di legge.

Come ultima considerazione, dal confronto delle concentrazioni di AFM₁ nei campioni di latte (tabella 5.10) non emergono differenze significative nelle due categorie di prodotti.

Tabella 12: Confronto tra le concentrazioni di AFM₁ in campioni biologici e convenzionali.

Campione	Concentrazione di AFM ₁ in campioni bio (in ppb)	Campione	Concentrazione di AFM ₁ in campioni convenzionali (in ppb)
2	0,026	88	0,018
3	0,017	89	0,026
4	0,017	90	0,010
6	0,023	92	0,012
7	0,010	118	0,019
9	0,021	119	0,013
30	0,019	120	0,018
94	0,016	121	0,020
96	0,014	125	0,009
123	0,016	126	0,023
134	0,009	127	0,016
		128	0,022
		129	0,010
		130	0,010
		131	0,025
		133	0,015
		135	0,017
		136	0,009
		137	0,021
		142	0,010
		143	0,009
		146	0,010
		148	0,020
		152	0,025
Media	0,017	Media	0,016
Valore minimo	0,009	Valore minimo	0,009
Valore massimo	0,0026	Valore massimo	0,0026
Deviazione Standard	0,0051	Deviazione Standard	0,0058
	Test T: (bio vs convenzionale) p= 0,639		

CONCLUSIONI

Al termine di questo lavoro sperimentale sul monitoraggio della contaminazione da aflatossine in farine e latte di produzione biologica e convenzionale, è possibile delineare un quadro conclusivo particolarmente interessante, soprattutto nell'ambito della sicurezza alimentare.

Ottimo primo risultato è stato ottenuto dal metodo analitico messo a punto per la ricerca di aflatossina B₁ nelle farine prese in esame. Il metodo ha infatti permesso di condurre delle analisi adeguate, con risparmio di materiali, volumi di solventi e tempi di processazione dei campioni, mostrandosi perciò una valida guida da seguire nella conduzione di prossime ricerche simili. Tale metodo deve essere sempre affiancato da un buon campionamento, ancora oggi punto critico nella conduzione delle analisi sulle micotossine.

La quantità di campioni risultati positivi alla contaminazione da aflatossine, sia nel gruppo delle farine che in quello del latte, è sufficientemente alto tanto da richiedere il mantenimento elevato del controllo di questi contaminanti tossici in matrici tanto elementari quanto sensibili.

I livelli di contaminazione registrati, non hanno superato, salvo in un unico caso, il limite definito a livello comunitario, dimostrando un funzionale filtro di controlli prima della messa in commercio di prodotti alimentari come le farine e il latte.

I risultati ottenuti dalle analisi dei prodotti biologici non permettono di riscontrare una significativa differenza nella contaminazione da aflatossine. In virtù di questi dati si può ipotizzare come le stesse buone pratiche colturali promosse dal biologico, come ad esempio la rotazione delle colture o l'accurata scelta delle specie da coltivare, si presentino come alternative vincenti all'uso di pesticidi nella cura dello stress delle piante, e quindi anche nella lotta alle micotossine.

OCRATOSSINA A

GENERALITÀ

Le ocratossine sono micotossine, strutturalmente simili, prodotte da numerose specie del genere *Aspergillus* e *Penicillium*, in particolar modo da *A. ochraceus* e *P. Verrucosum* (Miraglia and Brera, 1999). Esse sono ampiamente diffuse nel mondo raggiungendo alti livelli di contaminazione in alcuni Paesi, in particolare dell'Europa settentrionale e America meridionale. Sono muffe saprofitie ubiquitarie, agenti di ammuffimento di granaglie, mangimi e alimenti; si formano durante la crescita delle colture ma anche nella fase di stoccaggio. Per la crescita dei funghi produttori di ocratossine nei cereali sono necessari un contenuto minimo di umidità del 15-16% e temperature di 4-37 °C (Haouet and Altissimi, 2003a). Temperature più elevate (12-37 °C) favoriscono l'attività di *A. ochraceus*, che è diffuso nelle regioni temperate, mentre temperature più basse (4-31 °C) favoriscono lo sviluppo di *P. verrucosum*, che è maggiormente diffuso nelle regioni fredde (Pitt and Hocking, 1985). Il genere *Aspergillus*. predilige le derrate ad alto tenore lipidico e proteico come i salumi, mentre il genere *Penicillium*. è il classico fungo da immagazzinaggio, cresce nei climi temperati e freschi del Canada e dell'Europa e nell'America del Sud, prediligendo i cereali ricchi di carboidrati come orzo e frumento. Ci sono tre tipi di ocratossine la A (OTA), la B (OTB) e la C (OTC); la più comune è la A , un contaminante comune di molti alimenti e mangimi in numerosi paesi. L'OTA e l'OTC sono le più tossiche, mentre l'OTB è circa dieci volte meno tossica della OTA (Marquardt and Frohlich, 1992).

L'OTA è l'ocratossina principalmente prodotta, molto diffusa in natura, ed è stata isolata originariamente in Sud Africa, da una specie di *A. ochraceus* nel 1965 (Van der Merwe et al., 1965). In seguito, numerosi altri ceppi sono stati identificati come produttori della micotossina. Nel 1969 Van Walbeek e collaboratori osservarono per la prima volta che l'OTA veniva sintetizzata anche da miceti di *P. viridicatum*. In seguito altri autori dimostrarono che del genere

Penicillium era la specie *P. verrucosum* a produrre la micotossina (Ciegler et al., 1973; Pitt, 1987). Studi successivi hanno mostrato che altre specie del genere *Penicillium* erano in grado di sintetizzare OTA (Mills and Abramson, 1982; Mills et al., 1989; Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Kozakiewicz et al., 1993); inoltre la sintesi avviene più di frequente ad opera delle specie *P. verrucosum* e *P. nordicum* (Larsen et al., 2001).

La contaminazione da ocratossina A nelle regioni a clima freddo è dovuta principalmente a *P. verrucosum* (Holmberg et al., 1991; Frisvad and Lund, 1993; Scudamore et al., 1993; Mills et al., 1995; Sweeney and Dobson, 1998); tale specie cresce anche a 0°C (Northolt et al., 1979; Northolt and Bullerman, 1982; Bullerman, 1985) ed ha la capacità di sintetizzare la micotossina già con temperature a partire da 4°C (Northolt et al., 1979; Häggblom, 1982; Northolt and Bullerman, 1982; Bullerman, 1985) anche se la temperatura ottimale per la produzione di OTA è di 25°C (Häggblom, 1982; Northolt et al., 1979). *P. verrucosum* è la specie che contamina maggiormente i prodotti nell'Europa settentrionale e in Canada (Frisvad and Samson, 2000). Nelle regioni a clima caldo o temperato, la presenza di OTA sembra essere dovuta principalmente ad *A. carbonarius*, *A. nigri* e ad *A. ochraceus* (Heenan et al., 1998; Accensi et al., 2001; Urbano et al., 2001). Nelle nostre aree, la stagione più a rischio di contaminazione da OTA è quella autunnale e particolare attenzione deve essere prestata ai mangimi commerciali, per le modalità di stoccaggio favorevoli la proliferazione fungina (Haouet and Altissimi, 2003b).

PRODOTTI CONTAMINATI

Le principali fonti di esposizione all'OTA sono i cereali e i prodotti derivati, il vino, la birra, i succhi d'uva, il caffè, il cacao e i suoi prodotti derivati e la carne suina (EC, 2002).

È importante inoltre ricordare che l'OTA è presente nei mangimi animali; la micotossina contenuta nella carne, nel latte e nelle uova degli animali alimentati con questi mangimi è stata comunque considerata una fonte trascurabile per l'esposizione umana. Maggiori concentrazioni di OTA possono tuttavia essere

presenti in talune specialità gastronomiche locali come le torte di sangue e le salsicce preparate con il siero del sangue dei maiali (EFSA, 2006).

Da un'indagine svolta a livello europeo, la SCOOP Task 3.2.7. (EC, 2002), nella quale sono stati raccolti campioni di vari prodotti provenienti da diversi Paesi europei, è risultato che i cereali rappresentano la fonte primaria di contaminazione (50%) da OTA. Altre matrici interessate dalla contaminazione sono state il vino (13%), il caffè (10%), le spezie (8%), la birra (5%), il cacao (4%), la frutta essiccata (3%) e la carne (1%).

TOSSICITÀ DELL'OTA

L'OTA esercita un effetto nefrotossico in tutti gli animali testati e tale effetto è stato ipotizzato anche nell'uomo. La micotossina si è, inoltre, rivelata immunotossica, neurotossica, teratogena, genotossica e cancerogena. Sono però tuttora necessari ulteriori studi per confermare questi effetti e il reale meccanismo d'azione che li provoca. In generale, però, le dosi necessarie al loro sviluppo sono inferiori alla dose che causa danni a livello renale.

TOSSICITÀ ACUTA (DL₅₀)

La dose letale 50 (DL₅₀) rappresenta la quantità di una sostanza, per unità di peso corporeo, capace di provocare la morte del 50% della popolazione sperimentale in oggetto. Essa varia soprattutto tra le diverse specie ma è condizionata anche dal sesso, dall'età e dalla taglia dell'animale. Come si evince dalla Tabella 13 il suino risulta essere la specie più sensibile e le femmine risultano più sensibili dei maschi.

Tabella 13: Valori di DL₅₀ dell'ocratossina A in alcune specie animali

Animale	DL₅₀ (mg/kg)	Somministrazione	Fonte
Topo	22.0-40.1	i.p	Kuiper-Goodman and Scott (1989)
Topo	46.0-58.3	os	Kuiper-Goodman and Scott (1989)
Ratto maschio	30.3	os	Galtier <i>et al.</i> , (1974)
Ratto femmina	21.4	os	Galtier <i>et al.</i> , (1974)
Ratto maschio	12.6	i.p.	Galtier <i>et al.</i> , (1974)
Ratto femmina	14.3	i.p.	Galtier <i>et al.</i> , (1974)
Pollo	3.3	os	Kuiper-Goodman and Scott (1989)
Maiale	1.0	os	Kuiper-Goodman and Scott (1989)

TOSSICITÀ CRONICA

Nefrotossicità

L'OTA ha mostrato una elevata tossicità a livello delle cellule renali in tutte le specie di mammiferi e per questo motivo il rene è considerato il principale organo bersaglio. Gli studi a breve termine condotti su topi, ratti, cani e maiali hanno riportato lo sviluppo di nefropatie progressive caratterizzate da cariomegalia e necrosi delle cellule tubulari, ed inspessimento delle membrane basali (Walker and Larsen, 2005). Inoltre la micotossina induce apoptosi e iperplasia cellulare, inibisce la sintesi proteica, produce stress ossidativo e provoca disfunzioni mitocondriali (Fink-Gremmels 2005). Il tubulo retto prossimale (segmento S3), nella porzione esterna della midollare superficiale rappresenta il sito specifico colpito dagli effetti dell'OTA (Walker and Larsen, 2005).

Nello studio condotto negli USA all'interno del programma di tossicologia nazionale (*National Toxicology Program* o NTP) degli Stati Uniti (US-NTP, 1989) 80 ratti, tra maschi e femmine, sono stati trattati con OTA (0, 21, 70, o 210 µg/kg p.c.) tramite sonda gastrica per tempi variabili (5 giorni-103 settimane). Le lesioni renali osservate consistevano in una contrazione e disorganizzazione del modello normale dei tubuli S3, dovute al cospicuo sviluppo di cariomegalia e citomegalia.

Nei ratti gli effetti nefrotossici corrispondono ad un aumento del peso relativo del rene, del volume di urina, dell'azoto ureico nel sangue, del glucosio nelle urine, della proteinuria e del difforme trasporto urinario di sostanze organiche (EFSA, 2006).

La tossicità dell'OTA a livello renale è risultata essere dose- e tempo-dipendente (Krogh and Elling, 1977; Elling, 1979; 1983; Elling et al., 1985; Meisner and Krogh, 1986; FAO/WHO, 2001) e sesso- e specie-specifica; i maiali sono più sensibili dei ratti e dei topi (Walker and Larsen, 2005) e i ratti maschi sono più sensibili delle femmine (Munro et al., 1974).

Nonostante l'intossicazione nei bovini sia rara in seguito a dosi di 0.05 mg/kg somministrate per 4 settimane, si può osservare: poliuria, abbattimento, diminuzione dell'incremento ponderale, disidratazione, riduzione del peso specifico delle urine e talvolta una lieve enterite, e da un punto di vista anatomo-patologico, reni di color grigio, consistenza fibrosa con aspetto ondulato in superficie, necrosi dei tubuli prossimali e fibrosi interstiziale (Haouet and Altissimi, 2003a).

Nei suini, la somministrazione di 0.2 mg/kg di OTA nella dieta per 90 giorni ha causato una riduzione dell'attività di molti enzimi renali e una diminuzione delle funzioni renali (Krogh and Elling, 1977; Elling, 1979; 1983; Elling et al., 1985; Meisner and Krogh, 1986). Nefropatie progressive senza un blocco renale, sono state osservate in scrofe alimentate con dieta contaminata da OTA con concentrazioni di 1 mg/kg (40 µg/kg p.c./giorno) per due anni; nessun effetto è stato osservato somministrando invece 0.2 mg/kg (8 µg/kg p.c./giorno) per il medesimo periodo (EFSA, 2006).

L'OTA è coinvolta nella genesi della nefropatia micotossica porcina (*mycotoxic porcine nephropathy* o MPN) e della nefropatia micotossica aviaria (*mycotoxic chicken nephropathy* o MCN). Inoltre essa rappresenta un possibile agente eziologico della nefropatia endemica Balcanica (*Balkan Endemic nephropathy* o BEN) nell'uomo.

La MPN è stata identificata per la prima volta da un veterinario danese nel 1928 (Krogh and Elling, 1977); è una malattia riconosciuta endemica in molti Paesi dell'Europa settentrionale e centrale ed è stata relazionata alle condizioni climatiche nei periodi precedenti alla raccolta (Krogh, 1992).

In seguito, l'intossicazione è stata descritta anche in altri Paesi come l'Irlanda (Buckley, 1971), la Polonia (Goliński et al., 1984; Krogh, 1991), gli Stati Uniti (Cook et al., 1986), la Germania (Krogh, 1991), il Belgio, l'Ungheria, la Svizzera (Krogh, 1991) e la Bulgaria (Stoev et al., 1998a,b).

La malattia è caratterizzata morfologicamente da modificazioni degenerative dell'epitelio dei tubuli renali, seguite dall'atrofia degli stessi, dalla fibrosi interstiziale della corteccia renale e atrofia e sclerosi glomerulare (Krogh et al., 1974; Krogh, 1991); a livello funzionale si ha una diminuzione dell'attività

tubulare e dell'abilità di produrre urina concentrata (Krogh, 1992). Le malattie batteriche enteriche secondarie, risultato dell'immunosoppressione indotta dall'OTA, possono influire significativamente nel complesso quadro clinico-morfologico della MPN (Stoev et al., 2000). La presenza dell'OTA nei mangimi è ritenuta la principale causa di questa malattia spontanea (Krogh, 1978) ma anche altre specie fungine, soprattutto del genere *Penicillium*, sono coinvolte (Milićević et al., 2008).

Vi è infine un'ultima malattia, la sindrome del deperimento progressivo multisistemico post-svezzamento (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* o PMWS) con eziologia non ancora chiarita. Questa malattia è stata attribuita ad agenti infettivi e non, tra i quali le micotossine e in particolare all'OTA. Spesso la PMWS si presenta associata alla sindrome di dermatite e nefrite del suino (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome* o PDNS); i suoi principali sintomi sono diarrea, deperimento, aumento dei linfonodi inguinali, pallore e ittero (Harding, 2000).

Neurotossicità

Di seguito vengono riportati alcuni risultati ottenuti da studi condotti sui ratti. Dopo la somministrazione di OTA (289 µg/kg/giorno), per 8 giorni, i maggiori bersagli della micotossina sono stati il mesencefalo ventrale, l'ippocampo, il corpo striato e il cervelletto (Belmadani *et al.*, 1998b). In esemplari alimentati con OTA (289 µg/kg/48 ore) per 1-6 settimane la micotossina ha mostrato un accumulo tempo-dipendente (Belmadani *et al.*, 1998a). Sono state inoltre osservate diminuzioni delle concentrazioni degli amminoacidi liberi nel cervello, in particolar modo della tirosina e della fenilalanina. All'esame istologico sono stati riscontrati nuclei picnotici. La contemporanea somministrazione di aspartame (25 mg/kg/48 ore) ha mostrato un effetto preventivo sulle alterazioni del nucleo. Dopo 48 ore di incubazione dell'OTA (10-150 µM) in colture primarie di astrociti e neuroni del mesencefalo ventrale e del cervelletto, la micotossina determina una riduzione della sintesi del DNA e delle proteine; essa provoca inoltre un aumento dei livelli di malondialdeide (MDA) e del rilascio di lattato deidrogenasi (LDH)

(Belmadani *et al.*, 1999). Effetti neurotossici sono stati osservati in seguito a iniezione intracerebrale (400 ng per animale) o all'utilizzo di un sondino gastrico (250 mg/kg p.c.) ogni 48 ore per 6 settimane (Walker & Larsen, 2005). In un ulteriore studio è stato dimostrato che una concentrazione di OTA pari a 10-20 nM di OTA è in grado di aumentare l'espressione del gene coinvolto nel sistema infiammatorio cerebrale e di ridurre l'espressione della proteina acida glio fibrillare (GFAP), una proteina costituente gli astrociti (Zurich *et al.*, 2005). Nel mesencefalo embrionale, l'OTA causa una riduzione del numero di cellule vitali, l'induzione della proteina attivatrice dei fattori di trascrizione (AP-1) e di un fattore di attivazione del nucleo (NF- κ B) e, ad alte concentrazioni, inibisce la crescita dei neuriti (Hong *et al.*, 2002).

In caso di ocratossicosi, nei topi, la dopamina striatale diminuisce in maniera dose-dipendente; lo stress ossidativo e il danno ossidativo del DNA sono stati evidenziati in differenti regioni cerebrali del topo (Sava *et al.*, 2006).

Come si evince da questi studi, la più bassa dose neurotossica dell'OTA è molto più alta della dose in grado di determinare minimi danni renali nel maiale.

Immunotossicità

L'esposizione all'OTA induce una soppressione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata (Stoev *et al.*, 2000). L'attività immunotossica dell'OTA mostra principalmente quadri di linfocitopenia caratterizzati da una diminuzione dell'attività delle cellule *natural killer* (NK) nei ratti (Álvarez *et al.*, 2004), della risposta proliferativa dei linfociti T nei suini (Harvey *et al.*, 1992) e della capacità batteriolitica dei macrofagi nei ratti (Álvarez *et al.*, 2004). Vi possono essere, inoltre, il decremento dei livelli plasmatici di immunoglobuline, la deplezione degli organi linfoidei centrali e ridotta chemiotassi.

L'immunosoppressione provocata dall'OTA può essere spiegata dall'inibizione della sintesi proteica con conseguente ritardo della divisione cellulare a livello del sistema immunitario (Harvey *et al.*, 1992).

Cancerogenicità

Studi nei topi sulla cancerogenicità dell'OTA hanno mostrato che i tumori renali e/o epatici si sviluppano in seguito ad una somministrazione tramite la dieta di 40 mg/kg di OTA per 44 settimane (Kanisawa and Suzuki, 1978), e di 40 mg/kg per 2 anni (Bendele et al., 1985). I maschi sono risultati essere più sensibili sia a livello renale che epatico rispetto alle femmine. Recentemente è stato osservato che l'OTA si accumula maggiormente nei reni di ratti maschi e che l'incidenza di tumori del tubulo renale è molto più alta nei ratti e nei topi maschi rispetto alle femmine anche dopo trattamento cronico con piccole dosi di OTA (Zepnik et al., 2003; Lock and Hard, 2004). Uno studio a medio termine condotto sui ratti ha mostrato che la somministrazione di diete contenenti 50-200 mg/kg per 6-9 settimane provoca noduli epatici iperplastici (Imaida et al., 1982).

Teratogenicità

L'OTA può passare la placenta e avere effetti embriotossici e teratogeni inducendo gravi malformazioni strutturali, a livello embrionale e fetale, nei topi e nei ratti (IARC, 1993; FAO/WHO, 2001). Nei ratti la somministrazione di OTA in età prenatale causa immunosoppressione inibendo la proliferazione dei linfociti B e T e colpendo l'ultimo stadio dell'attivazione dei linfociti T *in vitro* (FAO/WHO, 2001).

Studi condotti sui ratti, hanno dimostrato che una singola iniezione sottocutanea di OTA somministrata entro il decimo giorno di gestazione provoca diminuzione del peso fetale e malformazioni del feto, e dosi maggiori comportano un riassorbimento fetale (Stil et al., 1971; Brown et al., 1976; Mayura et al., 1982).

Frequentemente le anomalie fetali comprendevano: difetti allo scheletro, al cranio, alle coste e alle vertebre, esencefalia, incompleta chiusura del cranio, micrognatia, micromelia, scoliosi, porzione posteriore piccola e difetti dei tessuti molli come idrocefalo, microftalmia, pelvi renale dilatata, idronefrosi e criptorchidismo (Fukui et al., 1987).

Genotossicità

Gli studi condotti sulla genotossicità dell'OTA e sul meccanismo d'azione non mostrano risultati univoci e certi, in particolar modo per quanto riguarda l'effetto causato dalla formazione di addotti con il DNA.

Nella maggior parte degli studi sulla mutagenicità a livello genico e cromosomiale, l'OTA è risultata negativa ai test convenzionali (*Ames-test*) anche in presenza di sistemi d'attivazione metabolica (Wehner et al., 1978; Bendele et al., 1985; US-NTP, 1989; Würgler et al., 1991; Zepnik et al., 2001).

L'utilizzo di test differenti da quelli convenzionali ha dimostrato che l'OTA causa rotture nel DNA *in vitro* e *in vivo*, micronuclei, sintesi non programmata del DNA, scambi di cromatidi fratelli e mutazioni geniche in cellule batteriche e nelle linee cellulari NIH/3T3 (SCF, 1998).

L'OTA può indurre, in varie specie animali, lesioni al DNA a livello del fegato, rene, milza, linfociti, timociti e fibroblasti. È stata riscontrata una dipendenza dal tempo e dalla dose di OTA nell'induzione di queste lesioni *in vivo* con l'utilizzo di tossina marcata (^{32}P) (Fink-Gremmels, 2005).

OCRATOSSICOSI NELL'UOMO E NEFROPATIA ENDEMICA

BALCANICA

L'OTA è stata associata da molti autori alla nefropatia endemica balcanica (*Balkan Endemic Nephropathy* o BEN), una nefropatia cronica diffusa prevalentemente nelle popolazioni rurali della Bulgaria, Romania, Serbia, Bosnia-Erzegovina, Croazia e Montenegro (Fuchs and Peraica, 2005).

I primi casi della malattia furono osservati nelle aree endemiche negli anni '50 (Puchlev et al., 1960). Studi condotti sugli animali hanno successivamente messo in relazione i cambiamenti funzionali e strutturali osservati a livello renale nella nefropatia suina indotta dall'OTA e quelli osservati nella BEN poiché risultavano essere molto simili e venne suggerita una correlazione tra OTA e BEN (Krogh, 1974). Austwick (1975) osservò che esisteva una correlazione positiva tra le cospicue piogge di quegli ultimi anni e il numero di persone morte di nefropatie nella penisola balcanica e questa osservazione avvalorò l'ipotesi di un coinvolgimento fungino nell'eziologia della nefropatia endemica. Sono state inoltre notate analogie a livello epidemiologico tra le nefropatie suine indotte dall'OTA e la BEN, in particolare l'occorrenza endemica (Krogh, 1976a,b).

L'incidenza maggiore della BEN è stata riscontrata agli inizi degli anni '80 dopo i quali è cominciata a diminuire (Dimitrov et al., 2001, Marković et al., 2005). La malattia non mostra episodi acuti e i primi segni clinici consistono in anemia, lieve proteinuria e assenza di ipertensione o di edema (Pleština, 1992); in seguito si osservano progressive ipercreatininemia, iperuricemia, anemia aplastica o normocitica, (Radovanović, 1991). La malattia progredisce lentamente fino a portare alla morte. Nei casi cronici i reni risultano di dimensioni e peso estremamente ridotti e presentano diffuse fibrosi corticali, senza cellule infiammatorie, estese fino alla giunzione cortico-midollare; inoltre si rilevano glomeruli ialinizzati e tubuli gravemente danneggiati (Vukelić et al., 1991). La malattia si riscontra più frequentemente nelle donne rispetto agli uomini (Fuchs

and Peraica, 2005) e colpisce il 3-8% della popolazione femminile rurale dei Balcani compresa tra i 30 e i 50 anni (Krogh, 1974). Sebbene alcuni casi di BEN siano stati diagnosticati all'età di 50 anni, la maggioranza dei casi è stata riscontrata in persone di 50-60 anni. Tra il 1957 e il 1960 l'età media di decesso nei pazienti con la BEN era di 45 anni mentre oggi le prospettive di vita sono simili a quelle del resto della popolazione (Miletić-Medved et al., 2005).

Numerosi studi sono stati condotti per confermare l'ipotizzata correlazione tra l'OTA e la BEN: in quasi tutti gli studi l'OTA è stata ritrovata più frequentemente o in maggiore concentrazione negli alimenti o nel sangue di abitanti delle zone endemiche della malattia rispetto a quelli delle zone di controllo (Fuchs and Peraica, 2005).

A cominciare dagli anni '60 l'OTA è stata associata anche a neoplasie del tratto urinario. Alcuni autori notarono che l'incidenza di tumori uroteliali (UT) era maggiore nelle persone affette dalla BEN rispetto alle persone sane e in generale nelle aree endemiche della malattia, rispetto quelle non endemiche (Šoštarić and Vukelić, 1991).

Limitatamente alle regioni endemiche della BEN è stato osservato che la mortalità causata da questo tipo di neoplasie è maggiore nelle donne rispetto agli uomini, in contrasto con quanto accade nelle altre regioni (Fuchs and Peraica, 2005); questi tumori inoltre occorrono più di frequente nel tratto urinario superiore (pelvi renali e ureteri), colpiscono persone più giovani, si presentano in forma multipla e spesso maligna (Šoštarić and Vukelić, 1991) e si manifestano in età più avanzate rispetto alla nefropatia umana (Chernozemsky, 1991; Chernozemsky et al., 1977).

Nonostante alte concentrazioni di OTA siano state ritrovate frequentemente nei pazienti con stadi finali di malattie renali e basse concentrazioni siano state ritrovate nel sangue di persone apparentemente sane anche in zone indenni (Peraica et al., 1999) non è ancora possibile stabilire una connessione sicura tra l'esposizione all'OTA con la BEN e i tumori uroteliali in quanto la micotossina è stata ritrovata anche nel sangue di persone che non abitavano nelle aree endemiche. Nel 1993 l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) ha classificato l'OTA come possibile cancerogeno umano (gruppo 2B) in base alle sufficienti prove della cancerogenicità negli animali testati e inadeguata evidenza

nell'uomo (IARC, 1993). Nonostante numerose ipotesi siano state valutate, la verosimile capacità cancerogena e i meccanismi della cancerogenesi nell'uomo rimangono ad oggi non chiariti.

Normativa relativa ad *Ocratossina A*

La regolamentazione della ocratossina A è cominciata con il Regolamento (CE) n. 466/2001 successivamente modificato dai regolamenti (CE) n. 472/2002, 683/2004 e 123/2005. Il Regolamento (CE) n. 1881/2006 abroga il precedente e le relative modifiche ma non regola il caffè crudo, la frutta secca diversa dalle uve secche, la birra, il cacao e i prodotti a base di cacao, i vini liquorosi, i prodotti a base di carne, le spezie e la liquirizia. Esso viene poi integrato per quanto riguarda il contenuto di ocratossina A in liquirizia e spezie, dal Regolamento (UE) n. 105/2010 in vigore dal 26 febbraio 2010 e applicato dal 1 luglio 2010.

Tabella 14: Tenori massimi di ocratossina A (OTA) nei prodotti alimentari come previsti dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 e dalle modifiche apportate dal Regolamento (UE) n. 105/2010

Prodotto alimentare⁽¹⁾: OCRATOSSINA A (OTA)	Tenori massimi (µg/kg o ppb)
Cereali non trasformati	5
Tutti i prodotti derivati dai cereali non trasformati, compresi i prodotti trasformati a base di cereali ed i cereali destinati al consumo umano diretto (eccetto: alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini e alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificamente ai lattanti)	3
Uve secche (uva passa di Corinto, uva passa, uva sultanina)	10
Caffè torrefatto in grani e caffè torrefatto macinato, escluso il caffè solubile	5
Caffè solubile (istantaneo)	10
Vini (compreso il vino spumante ed esclusi i vini liquorosi e i vini con un titolo alcolometrico non inferiore al 15% vol) e vini di frutta ⁽¹¹⁾	2 a partire dal raccolto del 2005

Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli ⁽¹³⁾	2 a partire dal raccolto del 2005
Succo d'uva, succo d'uva concentrato ricostituito, nettare d'uva, mosto d'uva e mosto d'uva concentrato ricostituito, destinati al consumo umano diretto ⁽¹⁴⁾	2 a partire dal raccolto del 2005
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini ⁽³⁾⁽⁷⁾	0.5
Alimenti dietetici a fini medici speciali ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ , destinati specificamente ai lattanti	0,5

Spezie: <i>Capsicum</i> spp. (suoi frutti secchi, interi o macinati, tra cui peperoncini, peperoncini in polvere, pepe di Caienna e paprica); <i>Piper</i> spp. (suoi frutti, compreso il pepe bianco e nero); <i>Myristica fragrans</i> (noce moscata); <i>Zingiber officinale</i> (zenzero) e <i>Curcuma longa</i> (curcuma). Miscele di spezie contenenti una o più delle suddette spezie	30 dal 1° luglio 2010 al 30 giugno 2012 15 dal 1° luglio 2012
Liquirizia (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza gonfia</i> e altre specie). Radice di liquirizia, ingrediente per infusioni a base di erbe	20 dal 1° luglio 2010
Liquirizia (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza gonfia</i> e altre specie). Estratto di liquirizia ⁽⁴²⁾ , usato nei prodotti alimentari, soprattutto nelle bevande e nella confetteria	80 da 1° luglio 2010

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato nel macello di Irbid (Giordania) tra febbraio e marzo 2012 da parte di due campionatori locali, che hanno prelevato aliquote di rene, bile e sangue di polli. I campioni sono arrivati in Italia via aereo e sono stati conservati nei congelatori del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, ex Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Servizio di Farmacologia e Tossicologia fino al momento delle analisi.

Oggetto di questo elaborato sono: 114 campioni di bile, 35 campioni di plasma e 40 campioni di rene. Tutti i campioni sono stati raccolti in Giordania tra febbraio e marzo 2012 ad opera di due campionatori locali nel macello di Irbid.

Tutti i prodotti sono stati opportunamente catalogati, sotto un proprio codice identificativo e registrati nel quaderno di laboratorio dedicato (FT 0001/11).

Analisi campioni di bile e plasma

Tutti i campioni di bile sono stati processati in Giordania presso i laboratori della Jordan University of Science and Technology e analizzati presso il servizio di Farmacologia e Tossicologia Veterinarie del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'università di Bologna.

Il metodo utilizzato per la ricerca di Ocratossina A nella bile di pollo era il seguente:

- Trasferire 200 µl di bile o plasma in provette tipo Falcon da 15 ml
- Aggiungere 200 µl di acido citrico 30% e 2 ml di diclorometano
- Porre in agitatore rotante per 30 minuti
- Raffreddare in ghiaccio per 10 minuti

- Centrifugare per 10 minuti a 3000 rpm
- Allontanare la fase acquosa
- Trasferire la fase diclorometanica in provette in vetro e portare a secco in evaporatore UNIVAPO
- Risolubilizzare con 800 μ l di metanolo

Condizioni analitiche:

fase mobile A (67%): $H_2O : CH_3CN : CH_3CHOHCH_3 : CH_3COOH$ 1% 79:7:7:7

fase mobile B (33%): CH_3CN

flusso 1 ml/min

Il volume di iniezione è stato stabilito a 20 μ l, mentre il detector fluorimetrico è stato impostato alle seguenti condizioni: $\lambda Ex: 340 \mu m, \lambda Em: 460 \mu m$.

Analisi campioni di rene

Dal momento che i campioni di rene di pollo erano aliquote molto piccole si era deciso di provare e in seguito di utilizzare la metodica già utilizzata per la ricerca di OTA nel rene di suino (SOP FT 10.01.021) e di gallina, adattandola per una aliquota di rene di 1 g.

La metodica era la seguente:

- Pesare $1 \pm 0,01$ g di campione
- Trasferire in provettoni tipo Falcon da 50 ml
- Aggiungere 1 ml di soluzione acido citrico al 30 % e 6 ml di diclorometano
- Omogeneizzare con ultraturrax per 3 minuti
- Lavare lo statore con 2 ml di diclorometano e raccogliere nello stesso provettone
- Porre in ultrasuoni per 30 minuti
- Raffreddare il campione in ghiaccio per 10 minuti

- Centrifugare a 300 rpm per 10 minuti
- Allontanare la fase acquosa
- Congelare il campione per alcune ore o per tutta la notte
- Centrifugare a 300 rpm per 10 minuti
- Allontanare la fase acquosa
- Caricare l'estratto su colonnina SPE silica 500mg da 10 ml precedentemente condizionata con 5 ml di diclorometano
- Lavare con 5ml di esano e scartare l'eluato
- Scartare
- Lavare con 5 ml della soluzione 3
- Scartare
- Lavare con 5 ml della soluzione 4
- Raccogliere l'eluato in provette da 10 ml
- Lavare con 5 ml della soluzione 5
- Raccogliere l'eluato in provette da 10 ml
- Portare a secco in evaporatore UNIVAPO
- Risolubilizzare il residuo essiccato con 0,25 ml di soluzione MeOH:H₂O 1:1

Condizioni analitiche:

fase mobile A (68%): H₂O : CH₃CN : CH₃CHOHCH₃: CH₃COOH 1% 79:7:7:7

fase mobile B (32%): CH₃CN

flusso 1 ml/min

Il volume di iniezione è stato stabilito a 20 μ l, mentre il detector fluorimetrico è stato impostato alle seguenti condizioni: λ Ex: 340 μ m, λ Em: 460 μ m.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le analisi hanno fornito risultati costantemente negativi.

Come già esposto nella parte compilativa, l'Ocratossina A è stata classificata come appartenente al gruppo 2B (della classificazione dello IARC 2002) al quale appartengono gli accertati cancerogeni per gli animali e possibili cancerogeni per l'uomo. Come dimostrato dalla letteratura, le micotossine oggi rappresentano un problema emergente nell'ambito della salute da non sottovalutare. Nelle specie avicole l'OTA causa importanti cali delle produzioni.

I risultati ottenuti da questo lavoro dimostrano la salubrità delle carni e quindi una sicurezza per la salute umana. Dato che nella bile di animali alimentati con diete sperimentalmente contaminate l'Ocratossina A risulta presente in concentrazioni apprezzabili anche quando nelle altre matrici la tossina risulta assente, il lavoro di questa tesi assume un particolare significato circa la salubrità delle derrate di origine animale.

CONCLUSIONI

L'assenza di ocratossina a livello della bile dei polli rivela, percorrendo a ritroso il meccanismo di accumulo della stessa, una verosimile assenza di contaminazione dell'alimento. Al macello preso in esame afferiscono diversi produttori affiliati, ciò significa che allevamenti di diverse aree geografiche sono stati simultaneamente presi in esame, così come diverse partite di mangimi presumibilmente di diversi produttori o provenienze

METALLI

INTRODUZIONE

La sicurezza e la salubrità degli alimenti di origine animale rappresentano, oggi, assieme all'elevata qualità, le caratteristiche che il consumatore ricerca negli alimenti che acquista e che richiede ai produttori. Nel quadro del mercato globale, in cui materie prime e prodotti finiti viaggiano da un continente all'altro, ogni Paese dipende dall'importazione per rispondere alla domanda interna di determinati beni, per i quali non risulta autosufficiente. Il rischio maggiore per la sicurezza alimentare è rappresentato dalla contaminazione, sia chimica sia microbiologica, di tali prodotti, che può arrecare anche gravi danni alla salute umana. A livello europeo, la normativa è molto specifica e il controllo della produzione, la biosicurezza, la tracciabilità e l'igiene sono caratteristiche indispensabili in ogni processo produttivo; campionamenti ed analisi vengono condotti lungo tutta la catena alimentare, sia partendo dalla produzione primaria, sia risalendo dal prodotto finito (Andrée *et al.*, 2010).

Per quanto concerne l'argomento oggetto di questa tesi, gli elementi chimici maggiormente implicati nella contaminazione degli alimenti sono quelli non essenziali che, se ingeriti, possono causare effetti negativi sulla salute dell'uomo; analogamente, anche gli elementi essenziali, se presenti in eccesso, possono risultare tossici. A questo riguardo l'Unione europea ha fissato, tramite regolamenti e direttive, i livelli massimi di alcuni contaminanti, tra i quali figurano anche dei metalli, negli alimenti, mentre per altri stabilisce la necessità di un controllo della loro presenza negli stessi, al fine di garantirne la sicurezza e di tutelare la salute dei consumatori; a livello italiano a questo scopo ogni anno viene attuato un Piano Nazionale per la ricerca dei Residui negli animali e in alcuni prodotti di origine animale (P.N.R.).

Dato che in alcuni Paesi extraeuropei meno attenzione è rivolta a queste problematiche, abbiamo ritenuto interessante, in collaborazione con il professore Khaled M. Al-Qudah della facoltà di Medicina Veterinaria della Jordan University of Science and Technology (Irbid, Giordania) e con il dottor Giorgio Fedrizzi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

“Bruno Ubertini”, determinare la concentrazione di contaminanti chimici in alimenti provenienti dalla Giordania. Lo scopo del lavoro è ricercare 13 elementi, sia essenziali (ferro, rame, selenio, zinco, manganese, cromo e cobalto) sia non essenziali (arsenico, cadmio, mercurio, piombo, alluminio e argento) in campioni di muscolo, fegato e rene di bovini allevati e macellati in Giordania e confrontare i dati ottenuti con quelli europei e internazionali, così da valutare la sicurezza di tali matrici edibili.

I METALLI

I metalli (dal greco *métallon*, che significa “miniera” e “minerale”) sono elementi chimici che, ad eccezione del mercurio, si presentano solidi a temperatura ambiente, risultano duttili e malleabili, buoni conduttori di calore e di elettricità e fondono ad alte temperature; tutti possono essere usati per costituire delle leghe.

I metalli vengono rilasciati nell'aria, nell'acqua e nel suolo sia come conseguenza di processi naturali sia da fonti antropiche: l'uomo, infatti, ha cominciato ad estrarli e utilizzarli almeno 6000 anni prima di Cristo, ma è con l'avvento dell'era industriale che si è avuto un aumento della loro dispersione nell'ambiente, dove costituiscono un fattore di rischio per la popolazione in generale oltre che per i lavoratori esposti durante i processi che li coinvolgono. I metalli possono essere classificati in essenziali e non-essenziali o tossici. Si definiscono essenziali i metalli indispensabili per gli organismi viventi; tra di essi distinguiamo i macronutrienti, il cui fabbisogno giornaliero è nell'ordine di grammi, quali calcio (Ca), magnesio (Mg), potassio (K), sodio (Na) e fosforo (P), e i micronutrienti, il cui fabbisogno può essere nell'ordine dei milligrammi, come ferro (Fe), rame (Cu), zinco (Zn), o di 1000 volte inferiore, vale a dire nell'ordine dei microgrammi, come vanadio (V), cromo (Cr), manganese (Mn), cobalto (Co), arsenico (As), selenio (Se) e molibdeno (Mo). Si definiscono invece non essenziali o tossici quei metalli di cui non si conosce nessuna funzione biologica e il cui apporto può risultare dannoso per la salute, quali piombo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), alluminio (Al), berillio (Be) e nichel (Ni).

METALLI PESANTI E LORO TOSSICITÀ

Non esiste ad oggi una definizione univoca di metallo pesante, che viene indicato come quell'elemento chimico che ha un numero atomico superiore a 20 e una densità maggiore di 5 g/cm³. Normalmente, anche se il termine viene considerato improprio dalla IUPAC (2002), vengono definiti metalli pesanti i seguenti elementi: alluminio (Al), argento (Ag), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V), zinco (Zn) e alcuni metalloidi con proprietà simili, quali l'arsenico (As), il bismuto (Bi) e il selenio (Se).

I metalli pesanti sono composti chimici che si trovano in natura e che possono essere presenti a concentrazioni diverse nel terreno, nell'acqua e nell'atmosfera, ma possono trovarsi anche nei prodotti alimentari sotto forma di residui derivati dalla loro presenza nell'ambiente a causa di attività agricole o industriali, gas di scarico dei veicoli o contaminazioni durante la lavorazione o la conservazione degli alimenti. L'esposizione delle persone e degli animali a questi metalli può avvenire sia attraverso l'ambiente sia per l'ingestione di cibi o acqua contaminati. La loro tossicità per gli organismi dipende dalla forma chimica in cui vengono assunti, dalla quantità e dalla via di somministrazione, oltre che dalla frequenza e dalla durata dell'assunzione; il loro accumulo in un essere vivente può produrre, nel tempo, effetti nocivi. A questo riguardo, anche molti elementi essenziali per l'organismo, come il rame (Cu), il selenio (Se), il ferro (Fe), lo zinco (Zn) e il manganese (Mn), se ingeriti in dosi eccessive, possono risultare tossici. Gli elementi essenziali svolgono delle funzioni fisiologiche ben precise, sia in modo diretto, fungendo da attivatori di specifici enzimi, sia in modo indiretto, per esempio come componenti di vitamine. La loro concentrazione nei tessuti deve essere sempre mantenuta entro valori normali affinché l'organismo possa funzionare in maniera adeguata: una dieta carente di un elemento specifico causerà la diminuzione della sua presenza e favorirà lo sviluppo di alcune

patologie, ma allo stesso modo anche un suo eccesso può determinare effetti negativi (Doyle and Spaulding, 1978).

I danni alla salute legati all'esposizione ai metalli, in particolare a quelli pesanti, sono noti da tempo e sono stati descritti da molti organismi internazionali, tra i quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO); tuttavia la loro produzione e la loro emissione nell'ambiente sono aumentate dagli anni '50 del secolo scorso, per diminuire soltanto negli ultimi 20 anni, soprattutto nei Paesi occidentali. Negli ultimi anni è anche cambiata la percezione dei consumatori nei confronti della presenza di tali contaminanti negli alimenti e il rischio legato alla loro assunzione è percepito maggiormente; a livello normativo, inoltre, l'Unione europea ha emanato alcuni provvedimenti a questo riguardo, al fine di tutelare la salute pubblica e la sicurezza alimentare.

CADMIO (Cd)

Generalità

Il cadmio (Cd) è un metallo pesante che si trova nell'ambiente come contaminante, sia per cause naturali (eruzioni vulcaniche ed erosioni di rocce) sia come conseguenza di processi industriali e agricoli. Per la popolazione in generale, ad eccezione dei fumatori, la fonte principale di esposizione a questo metallo è rappresentata dagli alimenti; anche se la capacità di assorbimento intestinale è limitata (circa il 3-5 % del totale), il cadmio viene ritenuto a livello renale ed epatico e si accumula in questi organi, con un tempo di emivita che varia dai 10 ai 30 anni (EFSA, European Food Safety Authority, 2009b). L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato il cadmio come cancerogeno per l'uomo (gruppo I) sulla base di studi occupazionali.

Ai fini della tutela della salute pubblica, la Commissione europea ha emanato il Regolamento 1831/2003 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti, tra i quali il cadmio, nelle diverse matrici alimentari.

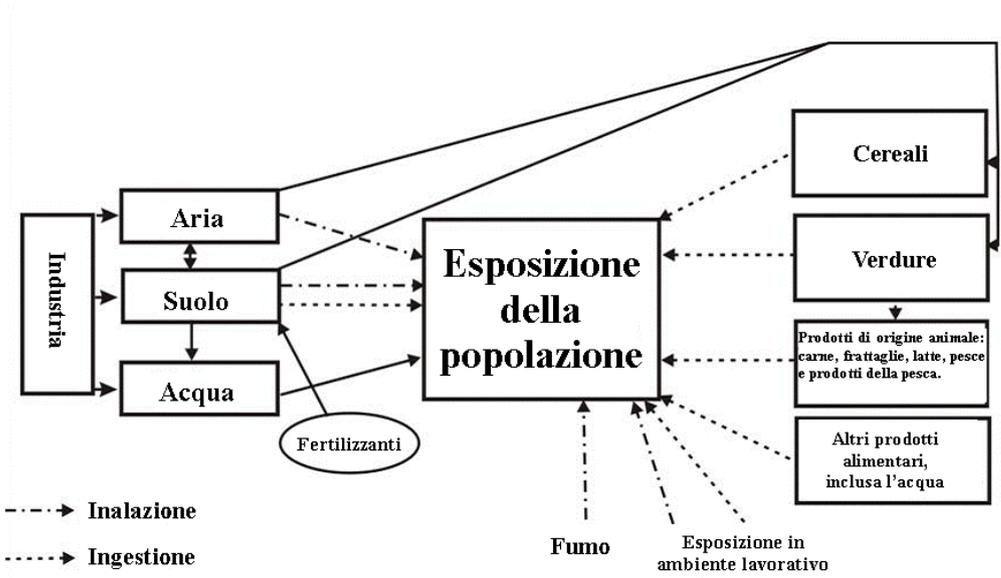
Nel 2009 il gruppo di esperti scientifici sui contaminanti della catena alimentare (CONTAM EFSA) ha stabilito una dose settimanale tollerabile (TWI, Tolerable Weekly Intake) per il cadmio corrispondente a 2,5 µg per kg di peso corporeo, riducendo in questo modo il precedente limite precauzionale di 7 µg/kg di peso corporeo per settimana definito dal Comitato Congiunto FAO-WHO di Esperti sugli Additivi Alimentari (JEFCA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). Si stima che in Europa l'esposizione media degli adulti attraverso la dieta sia prossima al TWI e che sottogruppi specifici della popolazione, quali i vegetariani, i bambini, i fumatori e i soggetti che vivono in aree altamente contaminate, possano superare questo limite anche del doppio (EFSA, 2009b).

Fonti di esposizione per l'uomo

Le fonti di contaminazione da cadmio per la popolazione in generale sono molteplici, ma la più importante, per i non-fumatori, è senz'altro rappresentata dal cibo, in modo particolare cereali e verdure, che apportano il 90% della quantità totale di metallo assunto (UNEP, United Nations Environment Programme, 2008); il resto è conseguenza dell'aspirazione di aria contaminata e dell'assunzione di acqua. Le concentrazioni di cadmio più elevate si trovano nelle alghe marine, nel pesce e nei frutti di mare, nel cioccolato e negli alimenti per diete specifiche. Alcuni alimenti presentano livelli molto elevati, come la carne di cavallo, le frattaglie, i molluschi bivalvi e i cefalopodi. In aree altamente contaminate gli alimenti prodotti o trasformati in loco possono presentare livelli più alti di cadmio e l'utilizzo agricolo di fertilizzanti contenenti questo metallo può determinare il suo aumento nei raccolti e nei derivati (EFSA, 2009b).

Ci sono poi categorie particolari di persone che entrano in contatto col cadmio in modo diverso, soprattutto i fumatori, dato che ciascuna sigaretta contiene 1-1,7 µg/g (Fresquez *et al.*, 2013) e specifiche categorie di lavoratori (occupati in industrie produttrici di batterie, fonderie e industrie siderurgiche) (Fig.1).

Figura 9. Fonti di esposizione per l'uomo al cadmio (Fonte: EFSA 2009b, modificata)



Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

Anche se non rappresenta la via principale di assunzione, l'assorbimento respiratorio del cadmio è abbastanza elevato, dal 7 al 50% del totale di metallo inalato (Boisset *et al.*, 1978; Nordberg *et al.*, 1985). Questa percentuale dipende dalla dimensione delle particelle che lo contengono: se ultrafini, possono venire trattenute fino al 50-60% a livello alveolare, mentre se più grandi vengono allontanate con l'*espirium*. L'importanza di questa via diventa evidente nei fumatori, dove la concentrazione di cadmio nel sangue è superiore rispetto ai non fumatori; inoltre, anche molti anni dopo avere smesso di fumare, è possibile rilevare la presenza del metallo nella loro aria espirata, dovuto a un suo accumulo importante a livello polmonare (Mutti *et al.*, 2006).

Ingestione

L'assorbimento intestinale di cadmio è un processo che non richiede nessun carrier specifico, mentre la quantità di metallo che viene assorbita dipende da numerosi fattori, come il contenuto di metallo nella dieta (sono legati da un rapporto inversamente proporzionale, cioè tanto più è alta la sua concentrazione, tanto meno ne verrà assorbito), lo stato nutrizionale del soggetto, l'età (l'assorbimento è maggiore nei neonati e nei bambini) e il sesso, oltre a fattori chimici come la presenza nell'alimento di cationi di- o trivalenti di zinco, ferro o calcio che competono con il cadmio stesso per il loro assorbimento. È stato dimostrato che, nell'uomo, la carenza di ferro nella dieta è un fattore che favorisce l'assorbimento intestinale di cadmio: il trasportatore di metalli divalenti (DMT-1), che normalmente consente l'ingresso del Fe^{2+} nell'enterocita, in caso di carenza aumenta la sua attività, e di conseguenza la sua affinità anche nei confronti del cadmio bivalente (Kim *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2002; Tallkivist *et al.*, 2001). Anche carenze di zinco e calcio possono favorire questo aumento, con maggior accumulo di cadmio nella parete intestinale, nel fegato e nel rene (Foulkes and Voner, 1981; Reeves and Chaney, 2008).

Trasporto e distribuzione

Una volta assorbito, il cadmio entra in circolo legato alla metallotioneina (MT), una proteina a basso peso molecolare presente in diversi tessuti, che, oltre a intervenire nella normale regolazione di metalli essenziali (rame e zinco), presenta un'elevata affinità per i metalli pesanti (cadmio e mercurio). In particolare, il cadmio crea legame con il gruppo solfidrico SH dell'amminoacido cisteina che la compone (Nordberg *et al.*, 1971b), ma può anche legarsi ad altri peptidi, sempre a basso peso molecolare, ricchi di gruppi SH o di amminoacidi quali glutatione e cisteina. È stato dimostrato che l'esposizione al cadmio, analogamente a quanto accade per lo zinco, induce un aumento della sintesi della metallotioneina in diversi tessuti (Nordberg *et al.*, 1985): per esempio, in seguito a inalazione del metallo aumenta la MT polmonare (Glaser *et al.*, 1986), mentre, a seguito della sua ingestione, aumenta la quota di MT intestinale (Muller *et al.*, 1986). Il legame

con la MT è necessario per diminuire la tossicità del cadmio, tanto che la quantità di proteina sintetizzata dal fegato è solitamente sufficiente a legare tutto il cadmio assunto (Nordberg *et al.*, 1971a).

Il cadmio può anche legarsi all'albumina e venire trasportato al fegato, dove il complesso viene scisso e il cadmio libero può essere coniugato con l'amminoacido glutatione (GSH) ed essere escreto con la bile (e, di conseguenza, eliminato con le feci), oppure venire legato alla metallotioneina e liberato in circolo.

Nel sangue, il cadmio si localizza negli eritrociti e arriva a livello renale: il basso peso molecolare della metallotioneina ne permette l'ultrafiltrazione glomerulare e il successivo riassorbimento nelle cellule del tubulo prossimale (Nordberg and Nordberg, 2000); se non fosse legato alla proteina, il metallo non verrebbe riassorbito in così grandi quantità. Nonostante l'emivita del complesso tra la proteina e il cadmio sia maggiore rispetto a quello con lo zinco, esso viene degradato, dopo il suo riassorbimento, nei lisosomi delle cellule tubulari. Il cadmio non legato è la causa della nefrotossicità: per contrastare l'aumento del metallo libero, infatti, la cellula sintetizza nuova metallotioneina, fino ad un punto critico, oltre il quale la quantità di MT prodotta non è più sufficiente a legare il cadmio presente, che causa la necrosi della cellula stessa. Il danno tubulare comporta enzimuria, proteinuria (le proteine a basso peso molecolare, ultrafiltrate a livello glomerulare, non vengono più riassorbite) e maggiore escrezione di cadmio con l'urina, sia in forma libera sia legato alla MT (Nomiya and Nomiya, 1986).

Nell'organismo, le maggiori concentrazioni di cadmio si trovano nel fegato e nei reni (Kotsonis and Klaassen, 1978): i due valori sono molto simili in seguito ad un'esposizione acuta (Andersen *et al.*, 1988), ma se essa diventa cronica la quantità presente a livello renale risulta maggiore di quella epatica (Bernard *et al.*, 1990). Nei soggetti adulti che vivono in Paesi industrializzati, è comunque possibile ritrovarlo in tutti i tessuti (Chung *et al.*, 1986; Sumino *et al.*, 1975).

Escrezione

L'escrezione del cadmio assorbito avviene giornalmente, ma molto lentamente, sia attraverso le urine sia attraverso le feci, in quantità pressoché uguali, pari, rispettivamente, allo 0,009 e allo 0,007% del peso corporeo (Kjellström and Nordberg, 1978; Nordberg *et al.*, 1985). I valori sono maggiori per determinate categorie, soprattutto i lavoratori per i quali il cadmio rappresenta un rischio occupazionale; in questo caso, la quantità escreta cresce in modo direttamente proporzionale alla quantità assunta, almeno fino a quando non si presenterà il danno renale; successivamente, il cadmio nelle urine aumenterà (Roels *et al.*, 1981).

Tossicodinamica

A livello cellulare, il cadmio ha un effetto genotossico indiretto, in quanto agisce inibendo i meccanismi enzimatici di riparazione della doppia catena del DNA, favorendo quindi l'effetto mutageno di altre sostanze a cui la cellula non riesce ad opporsi in maniera efficace. Inoltre, sempre in modo indiretto, causa un aumento dei radicali liberi (ROS, Reacting Oxygen Species) nel citoplasma, sia inducendo un aumento della loro produzione mitocondriale sia diminuendo la produzione di molecole antiossidanti da parte della cellula stessa (EFSA, 2009b). Questo metallo interferisce anche nella trascrizione genica e nella sintesi proteica, e, di conseguenza, nelle attività della cellula quali mitosi, differenziazione, apoptosi, fino ad indurre carcinogenesi (Waisberg *et al.*, 2003).

Il cadmio agisce come regolatore della concentrazione citoplasmatica di calcio, legandosi ai recettori extracellulari per il calcio (CaSR, Calcium Sensing Receptors) e interferendo in maniera diretta sulla sua omeostasi, specialmente a livello renale e mammario (Chang and Snoback, 2004).

Tossicità

Il cadmio provoca gravi danni alla salute dell'uomo sia in seguito ad un'esposizione acuta sia cronica, anche se quest'ultima, proprio per la tendenza del metallo ad accumularsi nell'organismo, è sicuramente la forma più frequente e coinvolge un maggior numero di distretti corporei.

Tossicità acuta

L'intossicazione acuta si ha in genere in seguito all'inalazione di alte concentrazioni di polveri o fumi ricchi di cadmio, di solito per incidenti sul luogo di lavoro; i sintomi clinici si manifestano a 4-6 ore dal contatto e il soggetto presenta tosse, dispnea, cianosi, irritazione tracheo-bronchiale ed edema polmonare (EFSA, 2009b).

L'intossicazione acuta può avvenire anche per via alimentare, per ingestione di cibi o bevande conservati in contenitori cadmiati di recente o a seguito di pasti consumati da operai che possono essere entrati in contatto con esso; compaiono gravi sintomi gastrointestinali quali nausea, vomito, dolore addominale, diarrea e lesioni a vari organi (EFSA, 2009b). La dose letale è compresa tra 350 e 8900 mg (Bernard and Lauwerys, 1986).

Tossicità cronica

A livello renale l'accumulo di cadmio dà una nefropatia a evoluzione lenta (in un periodo solitamente lungo, che va dai 10 ai 20 anni), caratterizzata da una disfunzione glomerulare, oltre a un'alterazione delle cellule dei tubuli prossimali, dovuta al suo accumulo in esse fino a causarne la necrosi.

I polmoni presentano solitamente fenomeni di irritazione bronchiale e molto spesso enfisema, che compare di solito dopo la nefropatia e dopo un'esposizione di circa 15-20 anni. Il cadmio nel tempo tende a irritare le mucose delle prime vie respiratorie e si manifestano anche sindromi ostruttive e restrittive, inclusa la fibrosi polmonare (EFSA, 2009b).

A livello gastroenterico il cadmio può dare anemia moderata per interferenza con il trasporto del ferro negli enterociti e danno modesto al fegato con lieve riduzione della capacità metabolica epatica. Molto caratteristica è la colorazione gialla che assume lo smalto dei denti: questa alterazione cromatica è considerata un segno clinico precoce di intossicazione e si manifesta entro 2 anni dall'esposizione cronica al metallo (EFSA, 2009b).

Il cadmio causa anche danni all'apparato scheletrico caratterizzati da osteoporosi, fratture spontanee e osteomalacia (Järup *et al.*, 1998).

In corso di gravidanza, durante il periodo dell'organogenesi o nelle fasi immediatamente precedenti, l'assunzione di cadmio riduce la percentuale di impianti embrionali (per alterata funzionalità ovarica e uterina) e comporta, inoltre, marcati effetti teratogeni (Giavini *et al.*, 1980), probabilmente per la sua capacità di accumularsi nella placenta in quantità 10 volte maggiori rispetto al sangue materno (Roels *et al.*, 1978).

Questo metallo viene, inoltre, classificato come agente cancerogeno per l'uomo (IARC, 1993), anche se un report dell'EC-JRC (European Commission Joint Research Center) del 2007 conclude che non ci sono ad oggi dati certi sull'attività cancerogena del cadmio in seguito alla sua ingestione; certo è il suo coinvolgimento nello sviluppo di tumori sia per la sua attività genotossica a livello di DNA cellulare sia per l'azione del suo ossido dopo inalazione. Dati epidemiologici più recenti riferiti alla popolazione generale hanno evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra esposizione a cadmio e aumento del rischio di cancro, ad esempio, del polmone, dell'endometrio, della vescica e della mammella (EFSA, 2009b). Diverse ricerche contemplano una certa rilevanza del cadmio nello sviluppo di tumori prostatici (Vinceti *et al.*, 2007), renali (Il'yasova, 2005), della vescica (Kellen *et al.*, 2007), del seno (McElroy *et al.*, 2006), del fegato, del testicolo e del pancreas (Huff *et al.*, 2007).

PIOMBO (Pb)

Generalità

Il piombo (Pb) è stato uno dei primi elementi metallici noti all'uomo, probabilmente già dal 5000 a.C.; utilizzato da molti popoli antichi (tra i quali i Romani), è conosciuto principalmente per la sua tossicità: col termine di saturnismo (che deriva dalla sua associazione col pianeta Saturno fatta dagli alchimisti) si identifica l'intossicazione cronica da piombo. È un metallo pesante naturalmente presente nell'ambiente come contaminante, anche se le maggiori quantità vengono rilasciate in seguito ad attività umane quali, ad esempio, l'estrazione mineraria, la siderurgia e la produzione di oggetti di uso comune, come le tubature per l'acqua, le vernici e la benzina. A partire dagli anni '70, la dimostrazione degli effetti nocivi del piombo sulla salute hanno portato all'adozione, sia in Europa sia negli Stati Uniti, di misure di controllo che hanno portato a un sistematico abbassamento della presenza del metallo nell'ambiente. Un passo importante è stato l'abolizione dell'uso del piombo nella preparazione di vernici e della benzina (dal 1° gennaio 2000 la benzina senza piombo è l'unica ammessa al commercio) e delle sue leghe nella produzione di contenitori per il cibo e di tubi per l'acqua (Direttiva 98/70/CE).

Il piombo si presenta in forma sia organica sia inorganica; nell'ambiente prevale la forma inorganica, anche se la popolazione esposta è limitata ai lavoratori del settore; la forma organica è invece più tossica (UNEP, United Nation Environment Programme, 2008a). L'uomo entra in contatto col piombo attraverso il cibo, l'acqua, il suolo, le polveri e l'aria; nell'organismo, il metallo si accumula nello scheletro, da cui poi viene gradualmente rilasciato nel tempo, causando gravi danni a tutti gli apparati.

Essendo un contaminante presente anche negli alimenti, per garantire la sicurezza dei consumatori e per tutelare la salute pubblica, la concentrazione massima di piombo in essi è regolamentata a livello europeo (Regolamento CE n. 1881/2006

e successive modifiche).

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2006) ha classificato i composti del piombo come potenzialmente cancerogeni (classe 2A); il piombo organico, invece, non è considerato classificabile in tal senso (gruppo 3), poiché non ci sono ancora adeguate dimostrazioni della sua attività cancerogena *in vivo*.

Nel 1993, il Comitato Congiunto FAO-WHO di Esperti sugli Additivi Alimentari (JEFCA) ha stabilito una dose settimanale tollerabile (PTWI), valida per tutta la popolazione, di 25 µg/kg di peso corporeo (EFSA, 2010).

Fonti di esposizione per l'uomo

L'uomo entra in contatto con il metallo sia attraverso l'inalazione delle sue polveri sia attraverso l'ingestione di acqua o cibo contaminati; causa frequente della sua assunzione è l'uso domestico di acqua proveniente da acquedotti dotati di tubazioni rivestite di piombo.

Gli alimenti possono contenere piombo, presente nella materia prima o come contaminante nella lavorazione successiva, ma anche, per frutta e verdura in particolar modo, possono essere rivestiti da una patina di polvere o sporcizia che lo contengono e che, se non lavati in modo accurato, possono diventare fonte di assunzione.

I bambini sono ritenuti una categoria a rischio, sia perché l'azione tossica del metallo è più grave, sia perché possono venire a contatto con dosi maggiori di metallo, per la loro tendenza ad ingerire (o comunque portare alla bocca) vari materiali, per esempio terra contaminata, polveri, o giocattoli non a norma, in quanto dipinti con vernice a base di piombo (risale al 2007 lo scandalo dei giocattoli prodotti in Cina e ritirati dal commercio, fonte www.repubblica.it).

Un'altra categoria a rischio è rappresentata dai fumatori, perché è stato calcolato che ciascuna sigaretta contiene da 0,60 a 1,16 µg/g di piombo (Fresquez *et al.*, 2013). È interessante notare come la pianta del tabacco sia una delle poche che riesce ad assorbire il metallo presente nel terreno e a concentrarla nelle foglie (Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2006), che possono essere contaminate esternamente anche dal piombo atmosferico e dai pesticidi usati (nelle parti del mondo dove

viene coltivato il tabacco, le foglie possono contenere non solo piombo, ma anche arsenico).

In passato, anche prodotti cosmetici e tinture per capelli presentavano piombo al loro interno (Cohen and Roe, 1991); ad oggi, tale utilizzo è vietato in Europa (SCCNFP, Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers, 2004).

Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

Le particelle di piombo inalate possono depositarsi a livello polmonare a seconda della loro grandezza: soltanto quelle di diametro inferiore ad 1 μm raggiungono le più fini diramazioni bronchiali e, di queste, più del 95% viene assorbita dopo l'ingestione da parte dei macrofagi o la necrosi delle cellule (Hursh *et al.*, 1969).

Ingestione

L'assorbimento a livello gastroenterico è influenzato da numerosi fattori, quali l'età, il digiuno, stati carenziali di ferro e calcio, la gravidanza, oltre alle caratteristiche chimico-fisiche del piombo stesso (dimensione, solubilità e tipologia). In studi condotti su soggetti a digiuno, è stato dimostrato che la quota di piombo assorbito è compresa tra il 37 e il 70% del totale (James *et al.*, 1985; Rabinowitz *et al.*, 1980), mentre scende al 15-20% se assunto durante il pasto (Skerfving and Bergdahl, 2007). Altri studi dimostrano che la capacità di assorbimento intestinale di piombo è maggiore nei bambini rispetto agli adulti (Heard and Chamberlain, 1982; James *et al.*, 1985; Rabinowitz *et al.*, 1980).

La carenza di ferro nella dieta aumenta la quantità di piombo assorbita (Bárány *et al.*, 2005), probabilmente per la sua capacità di legare anche ai carrier per il ferro, che risultano liberi (Bannon *et al.*, 2003). Analogamente, anche una carenza di calcio aumenta la quota di piombo nel sangue, soprattutto nei bambini (Mahaffey *et al.*, 1986). Si ritiene che lo stesso meccanismo sia alla base dell'interferenza del

piombo con l'assorbimento di altri cationi, quali cadmio, rame, magnesio e zinco. Nell'adulto, invece, si è visto che l'ingestione di calcio carbonato diminuisce la quota di piombo assorbita (Heard and Chamberlain, 1982); nonostante ciò bere latte, alimento ricco di calcio e per più di un secolo proposto come rimedio in seguito all'ingestione di piombo, aumenta la quantità assimilata, probabilmente per l'azione delle lattoferrina (James *et al.*, 1985).

Trasporto e distribuzione

Una volta assorbito, il piombo si riversa nel torrente circolatorio, trasportato all'interno dei globuli rossi (96-99% del totale) e, in minor misura, nel plasma (Bergdahl *et al.*, 1997, 1998, 1999; Manton *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). Negli eritrociti è legato a delle proteine, di cui l'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) è la più importante (Bergdahl *et al.*, 1997, 1998; Xie *et al.*, 1998); nel plasma è principalmente legato all'albumina (Al-Modhefer *et al.*, 1991).

Nell'adulto, circa il 90% del piombo totale si ritrova nelle ossa e questo deposito, tramite il rimaneggiamento del tessuto, porta al mantenimento di livelli elevati nel sangue anche quando l'individuo non è più esposto al metallo. Nel bambino la percentuale di piombo presente nelle ossa è pari al 70% (Fleming *et al.*, 1997; Inskip *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996). Nello scheletro il piombo si trova in forma inerte e vi può rimanere per decenni; in alcune ossa, quali il femore e il cinto pelvico, il suo contenuto decresce con l'età (Drasch *et al.*, 1987), soprattutto nelle donne (associato all'osteoporosi) e, parallelamente, aumenta la sua concentrazione nel sangue (Gulson *et al.*, 2002). Durante la gravidanza le riserve ossee del metallo diminuiscono nella madre per il rimaneggiamento subito durante la formazione dello scheletro nel feto, ed aumenta la quota ematica di piombo (Gulson *et al.*, 1997; Schuhmacher *et al.*, 1996).

Il piombo si accumula, seppur in misura minore, anche nei tessuti molli, specialmente nel fegato e, in concentrazioni decrescenti, in rene, pancreas, ovaio, milza, prostata, surrene, cervello, adipe, testicolo, cuore e muscoli (Barry, 1975; Gross *et al.*, 1975). Mentre nelle ossa l'accumulo di piombo continua durante tutta la vita dell'individuo, nei tessuti molli i valori restano pressoché invariati; questo

riflette il rapido turnover a cui è sottoposto in tali tessuti (Barry, 1975; Treble and Thompson, 1997). Come altri metalli pesanti, è possibile trovare tracce di piombo nei capelli e nelle unghie.

Infine, è importante sottolineare come questo elemento sia in grado di attraversare la barriera placentare, raggiungendo, nel feto, concentrazioni ematiche e tissutali uguali a quelle della madre (Goyer, 1990).

Escrezione

Nell'adulto, l'emivita del piombo del sangue è di circa 30 giorni (Gulson, 2008). Questo metallo viene escreto principalmente con le urine e con le feci (attraverso cui viene eliminato sia il piombo non assorbito a livello intestinale sia quello escreto con la bile), mentre vie minori sono rappresentate da sudore, saliva e latte materno (Hursh *et al.*, 1969; Rabinowitz *et al.*, 1976; Stauber *et al.*, 1994).

Tossicodinamica

Il piombo è sicuramente uno dei metalli pesanti più studiati, e i meccanismi che sono alla base della sua tossicità sono in gran parte conosciuti.

Stress ossidativo

L'azione del piombo induce un potente stress ossidativo a carico delle cellule sia promuovendo la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), sia esaurendo le riserve di molecole ad azione antiossidante (Matés, 2000). Il piombo inattiva anche molti enzimi, come la superossido dismutasi e la catalasi, sia legandosi ai loro gruppi sulfidrilici sia sostituendo gli ioni di zinco, importanti co-fattori per gli enzimi stessi (Flora *et al.*, 2007). Per la cellula, le conseguenze più gravi sono legate alla perossidazione dei lipidi della membrana plasmatica, i cui radicali ne comportano la distruzione e la morte. Il piombo causa anche l'ossidazione dell'emoglobina eritrocitaria, portando all'emolisi.

Cancerogenesi

Il piombo è considerato un elemento cancerogeno. I meccanismi d'azione alla base di questa sua caratteristica sono stati a lungo studiati e, ad oggi, sono state

formulate diverse ipotesi.

L'effetto genotossico del piombo è collegato al suo accumulo all'interno del citoplasma delle cellule, soprattutto renali, con conseguente danno diretto sul DNA (mutazione e delezione), alla base dell'evoluzione tumorale (Landolph, 1994; Waalkers, 1995).

Hartwig e colleghi (1990) invece propongono la possibile interferenza del piombo con i meccanismi di riparazione del DNA, specie dopo un danno dovuto ai raggi UV. Secondo altri (Trosko and Ruch, 1998), esso altera la comunicazione tra le cellule con la formazione di gap-junction tra di esse, che permettono scambi non controllati di sostanze citoplasmatiche alla base della mutazione neoplastica. Anche lo stress ossidativo indotto dal piombo può danneggiare la struttura del DNA. Un'altra teoria (Quintanilla-Vega et al., 2000) vede il legame del piombo in sostituzione dello zinco nelle protamine (piccole proteine nucleari che rimpiazzano gli istoni negli spermatozoi; sono ritenute essenziali per la stabilizzazione del DNA) come causa di minor protezione del DNA stesso verso possibili mutazioni. Anche il tumor suppressor factor p53 contiene zinco: la sua sostituzione col piombo ne altera la struttura e, di conseguenza, l'azione anti-tumorale (Hainaut and Milner, 1993).

Tossicità

Il piombo è un metallo che per gli esseri viventi può risultare soltanto tossico, in quanto non sono stati dimostrati suoi effetti positivi per l'organismo né è possibile definire una dose sicura nella sua assunzione, anche se è stata definita la PTWI. È un metallo pesante che causa danni irreversibili alla salute umana, a livello sia acuto sia cronico.

La tossicità acuta è solitamente associata ad un'esposizione di tipo professionale ed è poco comune. I sintomi clinici che la caratterizzano sono dolore muscolare e addominale, debolezza, emicrania, vomito, fino alle convulsioni e al coma (Flora et al., 2012).

La forma caratteristica di intossicazione da piombo è quella cronica, che si presenta quando i suoi livelli ematici arrivano a 40-60 µg/dL; è caratterizzata da

vomito persistente, encefalopatia, letargia, delirio, convulsioni e coma (Flora et al., 2012).

Rispetto ad altri metalli pesanti, per il piombo è interessante valutare la sua tossicità a carico dei vari apparati dell'organismo.

Il sistema nervoso è l'apparato più sensibile all'azione tossica del piombo, sia a livello centrale sia a livello periferico (Cory-Slechta, 1996).

La conseguenza diretta più grave all'esposizione a questo metallo è l'encefalopatia, intesa come una progressiva degenerazione di determinate aree del cervello, che si manifesta con debolezza, irritabilità, emicrania, riduzione della capacità di concentrazione, tremori muscolari, perdita di memoria e allucinazioni (Flora et al., 2012). L'esposizione a dosi elevate determina sintomi più gravi, quali delirio, perdita della coordinazione, convulsioni, paralisi, atassia e coma (Flora et al., 2006). Le manifestazioni di questo genere sono più frequenti nei bambini, poiché in essi la quantità di piombo che si deposita a livello centrale è maggiore e può causare alterazioni della crescita corporea ma anche dello sviluppo cerebrale, compromettendone lo sviluppo cognitivo, la memoria a breve termine e l'udito. Nei casi più gravi, può dare danni cerebrali permanenti e anche morte (Cleveland et al., 2008).

L'intossicazione acuta da piombo porta ad un'anemia emolitica, dato clinico visibile anche negli animali, perché rende più fragili le membrane dei globuli rossi, predisponendole alla rottura. L'intossicazione cronica causa invece un'anemia franca, poiché il metallo inibisce diversi enzimi che rientrano nel processo di sintesi dell'emoglobina, causando un danno diretto al sistema emopoietico (Vij, 2009).

A carico del rene, il piombo causa una nefropatia che può essere acuta o cronica. Nella forma acuta si ha un'alterazione nel meccanismo di trasporto a livello tubulare, con perdita di glucosio, fosfati e amminoacidi nelle urine (sindrome di Fanconi).

La nefropatia cronica porta ad alterazioni morfologiche e funzionali irreversibili: gravi modificazioni glomerulari e tubulo-interstiziali a cui conseguono insufficienza renale, ipertensione sistemica e iperazotemia (Rastogi, 2008).

Sia nell'intossicazione acuta sia in quella cronica il piombo può provocare

ipertensione sistemica (sia negli animali sia nell'uomo), ischemia coronarica, alterazioni nella circolazione periferica e cerebrale, tutte patologie potenzialmente letali (Navas-Acien et al., 2007).

Gli effetti a livello di riproduzione sono rilevabili sia nell'uomo sia nella donna. Nell'uomo, il piombo causa riduzione della libido, alterazione della spermatogenesi (riduzione del numero e della mobilità degli spermatozoi), riduzione della fertilità fino alla sterilità, alterazioni nella produzione di testosterone dalla prostata e conseguenti effetti sistemici. Nella donna causa infertilità, aborto, parto prematuro, eclampsia pre-parto e ipertensione in gravidanza (Flora et al., 2011). Durante la gravidanza, a livello sperimentale, sono stati riportati effetti negativi sullo sviluppo del feto (Saleh et al., 2009).

L'effetto cancerogeno del piombo e dei suoi composti è stato studiato negli animali da laboratorio, in particolare topi e ratti. La somministrazione di dosi elevate di piombo (maggiori rispetto alla PTWI) in queste specie ha comportato l'aumento di adenomi e carcinomi renali, solitamente rari (Waalkes et al., 1995). In uno studio condotto sui ratti (IARC, 2006), l'assunzione con l'alimento di 3 mg di piombo acetato per due mesi e successivamente di 4 mg per 16 mesi, ha evidenziato un significativo aumento nella comparsa di tumori in molti organi (polmone, ipofisi, ghiandola mammaria), ma soprattutto nelle ghiandole surrenali, testicoli e prostata nel maschio e ovaie nella femmina.

Il piombo inorganico viene classificato come cancerogeno per l'uomo, anche se, nonostante gli studi retrospettivi effettuati in questi anni, non sia stato ancora possibile dimostrare la presenza di una correlazione tra l'esposizione ad esso e i tumori maligni nell'uomo (Ilychova and Zaridze, 2012; Rousseau et al., 2007; Wynant et al., 2013).

MERCURIO (Hg)

Generalità

Il mercurio (Hg) è un metallo pesante che, dopo essere stato rilasciato nell'ambiente, entra in un ciclo caratteristico che coinvolge l'aria, il suolo e l'acqua, durante il quale l'uomo, le piante e gli animali vengono esposti ad esso, con varie ripercussioni sulla loro salute (EFSA, 2008).

Essendo un metallo pesante la cui tossicità è conosciuta da tempo, al fine di tutelare la salute pubblica, è regolamentato a livello europeo dal Regolamento 1881/2006, che stabilisce i valori massimi ammissibili negli alimenti, dalla Direttiva 98/83/CE, che definisce il limite massimo nell'acqua potabile di 1 µg/L e dalla Direttiva 2009/48/CE che ne definisce i limiti nelle vernici e nei componenti per i giocattoli. Il suo uso nei pesticidi è stato vietato dalla Direttiva del Consiglio europeo 79/117/CE, mentre nel Codex Alimentarius vengono definite delle linee guida per il mercurio totale e il metilmercurio contenuti nelle acque, nel pesce e in altri alimenti.

Nel 2010 il Comitato Congiunto FAO-WHO di Esperti sugli Additivi Alimentari (JEFCA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) ha stabilito che la dose settimanale tollerabile (PTWI) per il mercurio inorganico per l'uomo è di 4 µg/kg di peso corporeo (EFSA, 2010). Questo dato parte dal presupposto che la principale forma in cui il mercurio si trova nel cibo è quella inorganica, corretta poi da alcuni indici in modo da arrivare ad un valore che possa comprendere il mercurio totale assunto per via alimentare.

Fonti di esposizione per l'uomo

La fonte principale per l'uomo di metilmercurio, cioè la forma più tossica e pericolosa, è rappresentata da pesci e prodotti della pesca, che mostrano livelli di rischio dipendenti dalla specie (il tonno presenta le concentrazioni più elevate),

dalla quantità assunta e dall'area di pesca.

L'uomo è esposto al metallo atmosferico sia in ambiente lavorativo sia a casa, ove presenti fonti di contaminazione. Un'esposizione continua, a basse dosi, si ha in presenza di otturazioni dentali con amalgama a base di mercurio; a contatto con la saliva e con i tessuti che circondano i denti, questo rilascia ioni, che possono avere sia un'azione tossica locale sia, dopo inalazione, sistemica.

I fumatori sono una categoria a rischio, poiché ciascuna sigaretta contiene da 0,013 a 0,021 µg/g di mercurio (Fresquez *et al.*, 2013).

Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

L'inalazione di vapori contenenti mercurio, tipica dei lavoratori nel settore, per i quali rappresenta un rischio occupazionale, è molto pericolosa, in quanto per il 75% viene ritenuto e completamente assorbito (EFSA, 2012)

Ingestione

L'assorbimento del mercurio inorganico in seguito ad ingestione è di norma basso, anche se per le forme mercuriche è più alto che per le mercuriose data la loro maggiore solubilità in acqua. La percentuale di assorbimento è influenzata da fattori nutrizionali quali la presenza di selenio, di molecole che contengono gruppi sulfidrilici e di complessi organici nella dieta, oltre che dalla specie: negli animali da laboratorio oscilla tra il 2 e il 38%, mentre nell'uomo scende al 2% (EFSA, 2012). Il metilmercurio, al contrario, viene assorbito più rapidamente e fino all'80% del totale, sia negli animali sia nell'uomo, poiché attraversa facilmente la membrana cellulare per diffusione passiva, oppure perché forma complessi con altre molecole, come la L-cisteina, e utilizza i carrier corrispondenti (EFSA, 2012).

Trasporto e distribuzione

Nel sangue il mercurio bivalente si trova nei globuli rossi, legato ai gruppi sulfidrilici dell'emoglobina, e, in quota minore, a metallotioneina e glutatione, ma soprattutto si trova nel plasma, legato a diverse proteine. Essendo scarsamente lipofilo il mercurio non attraversa la barriera emato-encefalica e il filtro placentare, ma si concentra nel rene (tubulo contorto prossimale) e, a seguire, nel fegato (area periportale), nell'intestino (mucosa), nella cute, nel testicolo (cellule interstiziali) e nei plessi corioidei dell'encefalo (EFSA, 2012).

Più del 90% del metilmercurio si localizza invece nei globuli rossi, legato alla porzione proteica dell'emoglobina (Janzen *et al.*, 2011), mentre la porzione plasmatica è trasportata dall'albumina. Il metilmercurio attraversa sia la barriera emato-encefalica, accumulandosi nell'encefalo, sia la placenta, raggiungendo, nel feto, concentrazioni anche maggiori rispetto alla madre (Sakamoto *et al.*, 2004, 2008, 2010). Data la sua capacità ad attraversare le barriere e la membrana delle cellule, la sua distribuzione nei tessuti è generalmente uniforme e la concentrazione tissutale resta costante e in equilibrio con quella ematica; tale stato viene raggiunto in 30-72 ore dall'assorbimento. Circa il 5% del metilmercurio totale si ritrova nel sangue; nell'encefalo se ne può accumulare fino al 10% (EFSA, 2012).

La concentrazione maggiore di mercurio totale si rinviene nei reni (EFSA, 2012).

Metabolismo

Nei mammiferi le varie specie di mercurio subiscono processi di ossidazione/riduzione e di coniugazione col glutatione. Il metilmercurio viene demetilato nel fegato in presenza di specie reattive dell'ossigeno, coniugato col glutatione e riversato nell'intestino, dove può essere in parte riassorbito o convertito alla forma mercurica dalla flora intestinale (Chapman and Chan, 2000). La demetilazione avviene anche nell'intestino, nella milza e, in misura minore, ad opera dei fagociti (Suda and Hirayama, 1992). Nel cervello il metilmercurio e il

tiomersale vengono lentamente trasformati nella forma mercurica (Rodrigues *et al.*, 2010).

Escrezione

Il mercurio mercurico viene eliminato attraverso le urine e, in minori quantità, le feci (soprattutto la quota coniugata al glutatione nel fegato ed escreta con la bile). La sua emivita è di circa 40 giorni.

Il metilmercurio ha un'emivita, nell'uomo, di 70-80 giorni, e per il 90% viene eliminato con le feci dopo essere stato coniugato al glutatione negli epatociti ed essere stato riversato nella bile (Ballatori and Clarkson, 1985).

Tossicodinamica

I meccanismi alla base della tossicità sia del metilmercurio sia del mercurico dipendono dalla loro capacità di causare, a livello cellulare, stress ossidativo, squilibri nell'omeostasi del calcio e alterazioni del citoscheletro (EFSA, 2012). Le lesioni si manifestano principalmente in alcuni organi target.

Neurotossicità

Il metilmercurio rappresenta l'agente tossico principale per l'encefalo (Ni *et al.*, 2011). Il metilmercurio, durante la crescita e lo sviluppo, ha un'azione tossica nei confronti dei neuroni, dove altera i normali processi di proliferazione, differenziazione e migrazione (EFSA, 2012).

Stress ossidativo

Studi condotti sia *in vitro* sia *in vivo* dimostrano come la capacità di produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS) abbia un ruolo chiave nell'azione tossica del metilmercurio e del mercurio mercurico, poiché esse causerebbero un'alterazione della funzionalità mitocondriale (Garrecht and Austin, 2011) e un'inibizione dei meccanismi antiradicali, come la superossido dismutasi, la glutatione reduttasi e la glutatione perossidasi. Lo stress ossidativo comporterebbe inoltre disfunzione della pompa sodio-potassio ATP-dipendente, perossidazione dei lipidi, ossidazione delle proteine e danneggiamento del DNA (Farina *et al.*, 2011).

Alterazione dell'omeostasi del calcio

Il metilmercurio e il cloruro mercurico possono alterare l'attività neuromuscolare distruggendo i neurotrasmettitori glutammatergici, colinergici e dopaminergici. Agiscono anche sull'omeostasi del calcio in diverse cellule, tra cui i neuroni: il mercurio aumenta la quota di calcio intracellulare, comportando l'attivazione di enzimi di degradazione, alterazione della funzionalità mitocondriale, peggioramento del danno indotto dallo stress ossidativo e conseguente morte della cellula (Aschner *et al.*, 2010).

Effetto genotossico

Come già detto in precedenza, lo stress ossidativo e la produzione di ROS comportano alterazioni a carico del DNA e dei meccanismi di riparazione: nei linfociti umani è stato osservato un danno genetico (aberrazione cromosomica) in seguito ad esposizione professionale al mercurio elementare e organico (Cebulska-Wasilewska *et al.*, 2005); il metallo risulta inoltre genotossico, *in vitro*, sulle altre cellule dei mammiferi, ma dati *in vivo* non sono ancora disponibili (EFSA, 2012).

Tossicità

Come per altri metalli pesanti, l'intossicazione acuta è poco frequente e tipica di determinate categorie nella popolazione, mentre la forma cronica è caratteristica e ampiamente studiata: il caso più famoso risale agli anni '50 del secolo scorso, nella baia di Minamata in Giappone. Il mercurio è considerato un metallo molto tossico, che causa effetti a carico di molti apparati dell'organismo.

Tossicità acuta

L'inalazione di vapori contenenti mercurio può avvenire nei lavoratori che sono esposti al metallo, per esempio nelle miniere, e comporta, già poche ore dopo l'esposizione, la comparsa di tosse, dispnea, febbre, debolezza, disturbi gastroenterici, neuropatia periferica e insufficienza renale. L'avvelenamento da mercurio può avvenire anche in seguito ad ingestione di sue grosse quantità, (per

esempio l'ingestione accidentale di una batteria), e i suoi sali corrodono la mucosa intestinale, alterandone la permeabilità e aumentando il suo assorbimento (Graeme and Pollack, 1998). La prognosi in seguito ad una forma acuta di avvelenamento è solitamente riservata/infausta. La dose letale è compresa tra 0,1 e 0,5 mg/kg (EFSA, 2012).

Tossicità cronica

L'esposizione cronica al mercurio e ai suoi composti determina l'insorgenza di effetti tossici a carico di vari organi, sia reversibili sia irreversibili. Graeme and Pollack (1998) hanno cercato di elencare i sintomi più caratteristici.

Il sistema nervoso rappresenta, insieme al rene, l'organo target per il mercurio, specie nella forma di dimetilmercurio. Irritabilità, affaticamento, insonnia, cambiamenti della personalità, emicrania, riduzione dell'udito e della vista, diminuzione della capacità cognitiva, confusione, letargia, tremori, atassia e incoordinazione sono alcuni dei sintomi che si presentano in seguito ad avvelenamento da mercurio. Il metilmercurio, in particolare, porta anche a farfugliamento, ipersalivazione, disfagia, depressione, allucinazioni, crampi, paralisi, coma e morte.

A livello periferico, si ha riduzione della forza muscolare, minore sensibilità, neuropatie, paralisi spastica, parestesia e alterazione dei riflessi.

L'inalazione di piccole quantità di mercurio causa, nel tempo, l'instaurarsi di forme infiammatorie croniche quali polmoniti interstiziali, enfisema o atelettasia di alcune aree del polmone, bronchiolite necrotizzante, edema ed emorragie polmonari, pneumotorace.

I sali di mercurio sono molto corrosivi per gli occhi, la pelle e le membrane mucose: a livello intestinale ciò causa ematemesi, ematochezia, tenesmo, ulcere (anche buccali), enterite e necrosi della mucosa intestinale. L'avvelenamento cronico causa anche perdita dei denti e la formazione di una linea blu ("orletto") lungo il loro margine gengivale.

Il mercurio agisce a livello di apparato cardiocircolatorio indirettamente, poiché lo stress ossidativo, l'infiammazione, la perossidazione lipidica e il danno

mitocondriale da esso causati inducono alterazioni a carico della tonaca muscolare vasale, discontinuità endoteliale e trombosi (Azevedo *et al.*, 2012). Il metallo altera anche i canali Na^+/K^+ ATP-dipendenti e l'omeostasi del calcio, con ipertrofia del ventricolo sinistro e aumento della pressione diastolica (Furieri *et al.*, 2011).

L'effetto tossico sull'apparato genitourinario viene spiegato dal mercurio inorganico che si accumula nelle cellule tubulari fino a causarne la necrosi; al danno tubulare consegue proteinuria, ematuria, glicosuria, oliguria, uremia e insufficienza renale, sia acuta (negli avvelenamenti) sia cronica.

Studi condotti su donne esposte professionalmente ai vapori di mercurio hanno dimostrato che esso causa riduzione della fertilità, influenzando l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, ma, pur accumulandosi nelle ovaie, non sembra alterare il processo di ovulazione (Shuurs, 1997).

Nel maschio può dare infertilità per il suo effetto mutageno nella spermatogenesi. Durante la gravidanza, l'assunzione massiva di mercurio dà aborto tardivo, minor peso del neonato alla nascita e malformazioni congenite (Shuurs, 1997).

ARSENICO (As)

Generalità

L'arsenico (As) è un metalloide che si può trovare sia in forma organica sia in forma inorganica; la forma inorganica, più tossica, è la forma normalmente presente negli alimenti. L'arsenico è un elemento relativamente comune in natura, presente soprattutto nelle rocce e nel suolo, ma anche nell'acqua, sia superficiale sia di falda, e nell'aria; questo metalloide viene liberato anche come conseguenza di attività umane.

Conosciuto ed utilizzato dall'uomo fin dall'antichità, sia a scopo terapeutico sia come veleno, l'arsenico è un micronutriente essenziale per gli organismi viventi in concentrazioni molto basse, nell'ordine dei microgrammi, ma un'esposizione a dosi elevate risulta tossica per le piante, gli animali e l'uomo. Ancora oggi viene usato come medicinale, per esempio per la cura di alcune forme di leucemia promielocitica, data la sua capacità di indurre apoptosi delle cellule maligne (Ratnaike, 2003).

A livello europeo, la legislazione di riferimento è quella riguardante i contaminanti negli alimenti: il Regolamento 315/93, che delinea la necessità di stabilire dei limiti massimi di tolleranza, e il Regolamento 1881/2006, che stabilisce i tenori massimi di alcuni contaminanti, ma non dell'arsenico. Per questo elemento è quindi da considerare valida la legislazione dei singoli Paesi; in Italia, in particolare, nessuna legge regola il limite massimo dell'arsenico negli alimenti. La Direttiva della Commissione europea 2003/40, invece, stabilisce limiti precisi per l'acqua minerale destinata al consumo umano.

Nel 2009 il gruppo di esperti scientifici sui Contaminanti della Catena Alimentare (CONTAM) dell'EFSA ha stabilito che la dose settimanale tollerabile (TWI) per l'arsenico inorganico, corrispondente a 15 µg/kg di peso corporeo (dose giornaliera massima tollerabile di 2 µg/kg di peso corporeo), stabilita dal JEFCA nel 1989 non è più valida e deve essere abbassata. Da uno studio condotto su 19

Paesi europei, l'EFSA ha concluso che il consumo giornaliero pro capite di questo elemento è compreso in un range di 0,13-0,56 µg/kg di peso corporeo, con valori più elevati in specifiche categorie, quali i consumatori di riso (1 µg/kg p. c.), di alghe (4 µg/kg p. c.) e i bambini sotto i tre anni di età (0,50-2,66 µg/kg p. c.) (EFSA, 2009a).

Fonti di esposizione per l'uomo

Parlando di alimenti e di rischi per la salute connessi alla presenza in essi di contaminanti è opportuno precisare che, per quanto riguarda l'arsenico, quando vengono effettuate delle analisi, viene quantificato l'arsenico totale, senza distinzione tra la forma inorganica (l'unica effettivamente tossica) e quella organica; questo è dovuto alla difficoltà richiesta dall'analisi che permette la differenziazione di tutte le sue forme, tanto che solo pochi laboratori sono in grado di eseguirla. Poiché i dati vengono spesso letti come se si trattasse di arsenico inorganico, l'EFSA preferisce parlare di arsenico totale, ritenendo che molti rischi connessi a determinati alimenti siano da rivedere, in quanto sovrastimati (EFSA, 2009a). Un esempio lampante è rappresentato dal pesce e dai prodotti della pesca (soprattutto le alghe): essi rappresentano, a livello mondiale, la fonte principale di arsenico totale (12-34 mg/kg, Sirot *et al.*, 2009), ma di questo l'arsenico inorganico rappresenta solo lo 0,1% (eccetto nel tonno, dove il valore sale al 9%). Le concentrazioni più alte si ritrovano in alcune alghe (*Hizikia fusiforme*), vendute in forma secca, dove l'arsenico inorganico supera il 50% del totale (Almela *et al.*, 2002; Laparra *et al.*, 2003), e nella cozza comune (*Mutilus edulis*), che può presentare fino a 30 mg di arsenico inorganico/kg di peso secco (Sloth and Julshamn, 2008).

Le piante coltivate sulla terraferma presentano una bassa concentrazione di arsenico, sia totale sia inorganico. Il riso rappresenta un'eccezione, in quanto ne può contenere 0,1-0,4 mg/kg di alimento secco e, di questo, uno studio inglese dimostra che il 33-68% è rappresentato da arsenico inorganico (Meharg *et al.*, 2008). L'acqua (non solo come bevanda, ma anche utilizzata per cucinare), soprattutto in quelle aree dove la presenza dell'arsenico nelle falde è maggiore, è

sicuramente la fonte principale di assunzione dell'elemento per l'uomo, e anche la più pericolosa, dato che vi si trova principalmente in forma inorganica; il valore massimo raccomandato per l'acqua potabile dalla WHO è di 10 µg/L (WHO, 2001). La popolazione è esposta anche all'arsenico presente nell'aria e nel suolo, che rappresentano però fonti secondarie, rispetto alla dieta, per la popolazione europea; una categoria a parte sono i fumatori, in quanto ogni sigaretta contiene (a seconda della marca) 0,22-0,35 µg/g di arsenico (Fresquez *et al.*, 2013).

Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

I composti arsenicali introdotti per via inalatoria vengono completamente assorbiti a livello polmonare e dalle superfici mucose di tutto l'apparato respiratorio.

Ingestione

Studi effettuati su ratti e topi e sull'uomo hanno dimostrato che l'arsenite e l'arseniato presenti nell'acqua vengono rapidamente e completamente assorbiti a livello intestinale (ATSDR, 2007). Al contrario, l'assorbimento dell'arsenico inorganico dopo la sua ingestione dipende dalla sua solubilità (tanto essa è maggiore tanto maggiore sarà l'assorbimento), dalla presenza di altre sostanze nel tratto intestinale, oltre che dal tipo di alimento in cui è contenuto (EFSA, 2009a).

La capacità di assimilazione dipende molto dalla specie considerata: nei roditori la quantità di metilarsinato e di dimetilarsinato (dove l'arsenico è presente in forma pentavalente) assorbita a livello intestinale supera il 40% (Hughes *et al.*, 2005), mentre, nell'uomo, è superiore al 75% (Buchet *et al.*, 1981).

Trasporto e distribuzione

Una volta assorbito, l'arsenico si riversa nel torrente ematico, dove è presente sia nel plasma sia nei globuli rossi, legato alla porzione proteica dell'emoglobina; la

concentrazione che raggiungerà nei vari distretti dipende dalla sua valenza, dalla dose assunta e dalla specie considerata. In molte specie viene rapidamente trasportato a fegato, reni, milza e polmoni, ma l'accumulo (circa due settimane dopo l'ingestione) avviene a livello di capelli, unghie e pelle, tessuti che contengono numerose proteine ricche di zolfo, come la cheratina (EFSA, 2009a).

In seguito ad ingestione cronica di arsenico, esso tende ad accumularsi maggiormente nel rene e, a seguire, nel polmone, nella vescica, nella pelle, nel sangue e nel fegato; in minore misura, anche nei muscoli, nei sistemi nervoso e gastroenterico, oltre che nella milza (Kingston, 1993).

Nella specie umana l'arsenico riesce ad attraversare il filtro placentare (Concha *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 2007), raggiungendo gli stessi livelli presenti nel sangue materno e, in questo modo, passando rapidamente al feto; nel latte, invece, la quantità presente è bassa.

Metabolismo

A livello epatico l'arsenico inorganico subisce un processo di metilazione, in cui la forma pentavalente dapprima viene ridotta alla forma trivalente e successivamente, con l'aggiunta di un gruppo metilico, si forma l'acido metilarsonico che si trasforma, infine, in acido dimetilarsonico con il legame di un secondo gruppo metilico. Questi processi di biotrasformazione possono essere influenzati da fattori quali età, sesso e stato nutrizionale, e favoriscono l'eliminazione del metalloide (EFSA, 2009a).

L'arsenobetaina presente nei prodotti ittici non è metabolizzata dall'uomo, ma viene escreta tal quale nelle urine. È interessante notare come gli arsenozuccheri, abbondanti nelle alghe, vengano invece completamente metabolizzati in dimetilarsinati, gli stessi metaboliti derivati dall'arsenico inorganico (Ma and Le, 1998).

Escrezione

L'emivita dei composti dell'arsenico, sia organici sia inorganici, sembra essere breve, tra le 10 e le 48 ore (ATSDR, 2007). L'arsenico viene eliminato

rapidamente attraverso le urine, dove il dimetilarsinato è il metabolita più presente (Schuhmacher-Wolz *et al.*, 2009), e la bile (soprattutto nei roditori, Csanaky *et al.*, 2003). All'eliminazione di questo metalloide concorrono ancora, se pur in misura minore, le feci (il 10% delle sue forme solubili viene eliminato per questa via), il sudore, il latte, la pelle e i polmoni (Lucisano, 1994).

Tossicodinamica

Gli effetti tossici dell'arsenico a livello cellulare sono collegati al suo stato di ossidazione (Hughes, 2002).

Le specie trivalenti sono più tossiche rispetto a quelle pentavalenti, anche se i meccanismi non sono completamente definiti.

L'arsenico inorganico è classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2004) come cancerogeno per l'uomo, sulla base di studi epidemiologici, anche se il meccanismo alla base della cancerogenesi non è stato ancora del tutto chiarito; sono state però proposte diverse ipotesi. L'arsenico inorganico ha un'azione genotossica *in vitro* sulle cellule polmonari umane a dosi molto elevate (Yamanaka *et al.*, 1995) e contribuisce a modificare l'assetto dei cromosomi nei linfociti e fibroblasti umani (Dong and Luo, 1993; Rasmussen and Manzel, 1997). L'arsenico sembra avere un ruolo nell'inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA, probabilmente perché interferisce nella normale attività dell'enzima DNA-polimerasi (Yager and Wiencke, 1997); promuove anche lo stress ossidativo, in quanto si lega ad enzimi antiossidanti, come la catalasi e la superossido dismutasi, inibendone l'azione e mantenendo attive le specie reattive dell'ossigeno, che possono causare gravi danni alla cellula.

L'arsenico è anche un co-mutageno, dato che promuove e potenzia l'azione tossica nei confronti delle cellule da parte di altre sostanze chimiche (in particolare del benzo(a)pirene) e dei raggi UV.

Viene anche definito interferente endocrino, in quanto altera la produzione di ormoni steroidei (glucocorticoidi, mineralcorticoidi, progesterone ed androgeni) ed interferisce col legame col loro recettore (Bodwell, 2004 e 2006; Kaltreider, 2001). Un'alterazione del metabolismo dei glucocorticoidi può avere conseguenze

negative sullo sviluppo corporeo e provocare danni alla salute.

Tossicità

Ricordando che l'arsenico è un microelemento essenziale per la vita degli organismi in dosi minime (nell'ordine dei $\mu\text{g}/\text{giorno}$), bisogna tener presente che carenze di questo elemento portano ad uno scarso sviluppo, una ridotta sopravvivenza e ad una riduzione dell'efficienza riproduttiva in piante e animali.

Tossicità acuta

L'avvelenamento acuto (dopo l'ingestione di una singola dose) o subacuto (in seguito ad un'esposizione inferiore alle 3 settimane) da arsenico inorganico, si manifesta con sintomi che interessano tutti i grandi apparati dell'organismo, in modo particolare il gastroenterico, il cardiovascolare, il renale e il nervoso, in minor misura il respiratorio, il cutaneo, l'emopoietico e il fegato. L'ATSDR ha quantificato la dose letale per l'uomo in 100-300 mg (circa 1-5 mg/kg di peso corporeo); è importante ricordare che non è stato dimostrato che l'arsenico organico sia in qualche modo causa di intossicazioni acute nell'uomo (ATSDR, 2007).

Tossicità cronica

Senza dubbio sono l'esposizione cronica all'arsenico e il suo successivo accumulo nell'organismo a comportare i danni maggiori alla salute dell'uomo, tanto che esso viene considerato uno degli elementi più tossici che esistano. Il maggior numero di patologie che causa vengono studiate in Bangladesh (Ahsan *et al.*, 2000, 2006; McDonald *et al.*, 2007; Rahman *et al.*, 2006), dove si stima che circa 57 milioni di persone bevano acqua da pozzi con concentrazioni di arsenico al di sopra dei limiti massimi stabiliti dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità.

Un'esposizione cronica all'arsenico, nell'uomo, induce iperpigmentazione (a spots o diffusa) associata a ipercheratosi di alcune aree dei palmi delle mani e delle piante dei piedi, fino a portare allo sviluppo di neoplasie, sia a carico delle

cellule basali sia dello strato squamoso.

Nella forma cronica la diarrea si presenta sotto forma di attacchi ricorrenti, associata al vomito; sul lungo periodo, l'arsenico causa epatomegalia, fibrosi epatica e cirrosi, oltre a tumori.

L'arsenico è considerato un agente causale di ipertensione (Rahman *et al.*, 2006), oltre che di aritmie cardiache (Goldsmith, 1980), cardiomiopatie (Benowitz, 1992), fino all'infarto (Tsai *et al.*, 1999).

Gli effetti a livello di sistema nervoso sono diversi. A carico del sistema nervoso periferico si sviluppa una neuropatia con perdita progressiva della sensibilità, cambiamenti nella percezione sensoriale, ma anche modificazioni a carico della componente motoria, quali parestesia, debolezza muscolare, fino ad atrofia e paralisi (Ratnaike, 2003). A livello centrale causa alterazioni del comportamento, confusione e perdita di memoria (Morton *et al.*, 1989), aggravate da lesioni vascolari, soprattutto di tipo ischemico (Chiou *et al.*, 1997).

Nel 2004 un gruppo di lavoro della IARC (International Agency for Research on Cancer), sulla base di dati provenienti da Taiwan, Cile e Argentina, ha definito l'arsenico presente nell'acqua cancerogeno per la vescica, il rene e l'uretra (carcinoma delle cellule di transizione) (IARC, 2004).

Si è visto come elevate dosi di composti arsenicati somministrati ad animali da laboratorio gravidi producano un aumento nel riassorbimento fetale e, nei feti sopravvissuti, ritardo nella crescita, alterazioni nella struttura polmonare e neurotossicità (Hill *et al.*, 2008). Il cervello risulta particolarmente sensibile all'azione dell'arsenico, sia durante la vita fetale sia durante lo sviluppo post-natale: deficit neuro-comportamentali sono stati riscontrati in bambini esposti fin dalla tenera età (Wasserman *et al.*, 2004).

Nella donna, durante la gravidanza, l'assunzione di arsenico aumenta il rischio di aborto, parto prematuro, natimortalità e morte neonatale (Ahmad *et al.*, 2001).

ALLUMINIO (Al)

Generalità

L'alluminio (Al) è un metallo che costituisce l'8% della crosta terrestre, di cui risulta essere il terzo elemento per abbondanza, dopo l'ossigeno e il silicio. Viene ampiamente utilizzato per la produzione di contenitori e altri oggetti di uso quotidiano, come le lattine per le bibite e i contenitori per gli alimenti. Date le sue caratteristiche di leggerezza e di resistenza ad urti e corrosione, viene usato in varie tipologie di imballaggi, proteggendo il contenuto grazie all'effetto barriera contro luce, aria e umidità. L'alluminio, però, se rilasciato nell'ambiente, diventa un inquinante; anche la sua presenza nell'alimento rappresenta un fattore di rischio per l'uomo, causando effetti negativi sulla salute. Vista la tendenza ad accumularsi nell'organismo dopo ingestione, l'EFSA ha ritenuto opportuno stabilire una dose settimanale tollerabile (TWI) di 1 mg Al/ kg di peso corporeo (EFSA, 2008a).

Inoltre, a livello europeo, per tutelare la salute del consumatore e garantire la sicurezza dei prodotti alimentari, la sua presenza negli alimenti come additivo e nei contenitori a contatto con essi è strettamente regolamentata.

Fonti di esposizione per l'uomo

Nonostante l'alluminio sia ubiquitario nell'ambiente, la popolazione in generale è esposta ad esso attraverso l'inalazione di aria contaminata e l'ingestione di cibo e, in minor misura, di acqua che lo contengono. L'alluminio negli alimenti è presente sia come conseguenza dell'accumulo naturale nella materia prima, ma anche della contaminazione durante i processi di lavorazione, confezionamento e stoccaggio, oltre che come componente di alcuni additivi che possono essere aggiunti in essi. Dati europei (EFSA, 2008a) mostrano come la concentrazione di alluminio negli alimenti non trattati sia inferiore ai 5 mg/kg, mentre

concentrazioni maggiori, dai 5 ai 10 mg/kg siano presenti nei prodotti finiti, quali pane, torte e dolci (i biscotti hanno i livelli maggiori), alcune verdure (funghi, spinaci, ravanelli, bietole, lattuga e mais sono le più contaminate), prodotti caseari (il formaggio molle presenta la maggiore quantità), salsicce, fragole, prodotti della pesca, prodotti già cotti, farine e derivati. Livelli ancora più alti di alluminio si riscontrano nel the, nel cacao, nelle erbe aromatiche e nelle spezie.

A livello europeo l'EFSA stima che l'esposizione giornaliera della popolazione attraverso la dieta all'alluminio sia di 1,6-13 mg.

L'utilizzo dell'alluminio nei materiali d'imballaggio per gli alimenti è regolamentato a livello europeo dal Regolamento (CE) 1935/2004: i contenitori a contatto col cibo non devono trasferire i loro costituenti in quantità tali da poter essere dannosi per la salute umana o da alterare le caratteristiche dell'alimento stesso. Anche l'utilizzo dei suoi composti come additivi è regolato dalla Direttiva 95/2/CE, mentre la Direttiva 94/36/CE è dedicata all'alluminio metallico usato come colorante per torte e dolci. L'ultimo Regolamento in tal senso è il 380/2012 (che entrerà in vigore dal 1° agosto 2014), che stabilisce un elenco più stretto dei coloranti che possono essere prodotti utilizzando l'alluminio e i suoi composti. Non sono invece stabiliti valori massimi di ione Al^{3+} nell'acqua potabile (EFSA, 2008a).

I fumatori assumono dosi maggiori di alluminio, poiché ogni sigaretta ne contiene 0,6-3,7 mg/g (Exley *et al.*, 2006).

Altra fonte di esposizione all'alluminio, anche se controllata, è rappresentata dai cosmetici (l'alluminio esaidrato è un componente dei deodoranti) e dai farmaci, dove si trova nell'aspirina, negli antiacidi (idrossido di alluminio), negli antiulcera, oltre che nei vaccini (come adiuvante).

Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

L'esposizione professionale a vapori e polveri contenenti alluminio comporta l'assorbimento, a livello alveolare, dell'1,5-2% del metallo inalato, con valori maggiori tanto più piccole sono le dimensioni delle sue particelle (Mussi *et al.*, 1984; Yokel and McNamara, 2001); il rimanente viene allontanato con l'*espirium*. Zatta e colleghi (1993) hanno dimostrato che l'alluminio, dopo aver attraversato le cellule dell'epitelio nasale, può raggiungere direttamente il cervello per trasporto assonale lungo il nervo olfattorio.

Ingestione

Nell'ambiente acido dello stomaco la maggior parte dei composti dell'alluminio ingeriti vengono solubilizzati, liberando Al^{3+} ; questo ione, passando nell'ambiente basico duodenale, si lega gradualmente agli idrossidi qui presenti e forma l'idrossido di alluminio, insolubile. Esso precipita in intestino e viene eliminato con le feci, e soltanto la piccola quota che non ha ancora reagito potrà essere assorbita. In questo modo soltanto lo 0,1-0,6% del metallo ingerito viene assorbito, tramite diffusione passiva attraverso la membrana degli enterociti (ATSDR, 2008).

Trasporto e distribuzione

Dopo l'assorbimento l'alluminio passa nel sangue, in particolare nel plasma, dove per il 90% è legato al sito per il ferro della transferrina (Harris and Messori, 2002); soltanto il 10% dell'alluminio totale si localizza negli eritrociti, nei quali la sua emivita risulta più lunga rispetto alla porzione plasmatica (Priest, 2004).

La distribuzione dell'alluminio nei vari tessuti non è omogenea, ma dipende dalla densità dei recettori per la transferrina stessa nei vari organi (Morris *et al.*, 1989): così le concentrazioni maggiori saranno raggiunte nella milza, nel fegato,

nell'osso e nei reni, mentre saranno più basse nel cervello, nei muscoli, nel cuore e nei polmoni (Greger and Sutherland, 1997).

Escrezione

La via urinaria rappresenta la prima e principale via di escrezione dell'alluminio nell'uomo, in seguito sia ad inalazione sia ad ingestione; già in 24 ore il 60% dell'alluminio assunto può venire eliminato (EFSA, 2008a). La parte di alluminio non assorbita a livello enterico viene eliminata con le feci. La via biliare rappresenta una via secondaria di eliminazione (EFSA, 2008a).

Tossicodinamica

I meccanismi molecolari alla base della tossicità dell'alluminio nell'uomo non sono stati ancora del tutto chiariti (ATSDR, 2008). I composti dell'alluminio non esplicano alcun effetto mutageno nelle cellule dei mammiferi, anche se *in vitro* è possibile osservare un danneggiamento a carico del DNA con alterazione dell'integrità dei cromosomi (EFSA, 2008a). Negli animali da laboratorio la somministrazione di sali di alluminio ha sì effetti genotossici, ma di tipo indiretto (aberrazione dei cromosomi durante la mitosi, stress ossidativo, alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA); inoltre le dosi necessarie a indurli sono così elevate da non rappresentare un pericolo per l'uomo esposto all'alluminio con la dieta (EFSA, 2008a).

Tossicità

Tossicità acuta

L'intossicazione acuta da differenti sali di alluminio è stata valutata in ratti e topi, dove la dose letale 50 (LD₅₀) è elevata, dai 165 ai 900 mg/kg di peso corporeo. Non sono descritti molti casi di tossicità acuta nell'uomo, nonostante l'utilizzo di antiacidi sia molto diffuso, e si possa arrivare, con essi, a ingerire fino a 1200 mg al giorno di metallo (WHO, 1997).

Tossicità cronica

Per quanto riguarda l'alluminio è opportuno, data la sua emivita breve, parlare di tossicità sub-cronica; studiata nei ratti (esposti al metallo per 28 giorni nell'acqua) e nei cani (esposti per 26 settimane), esso dà alterazioni a carico di milza, fegato e reni solo in alcuni soggetti e a dosi molto elevate, almeno doppie rispetto alla NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) (EFSA, 2008a).

Nei soggetti esposti cronicamente all'alluminio possono comparire difficoltà respiratorie, dispnea e asma (ATSDR, 2008).

L'alluminio raggiunge il cervello sia per la sua capacità di attraversare la barriera emato-encefalica sia attraverso i plessi corioidi, trovandosi nel liquido cefalorachidiano dove passa rapidamente ma in concentrazioni inferiori rispetto al sangue. La neurotossicità dell'alluminio è stata studiata negli animali, dove induce alterazioni nello sviluppo cerebrale e nel comportamento nei roditori e forme neurodegenerative nei non-roditori dopo somministrazione parenterale (ATSDR, 2008). La causa molecolare scatenante questi cambiamenti non è stata ancora definita con certezza; di sicuro l'alluminio tende ad accumularsi nei neuroni e al loro interno potrebbe causare danni strutturali alle proteine del citoscheletro, squilibrio dell'omeostasi del calcio e alterazioni della sintesi proteica (ATSDR, 2008). L'emivita dell'alluminio nel cervello dell'uomo è di 50 anni, valore comunque ottenuto da studi sui ratti poi adattati (EFSA, 2008a).

La potenziale associazione tra l'alluminio e lo sviluppo della malattia di Alzheimer è stata a lungo dibattuta. Nella malattia sono presenti dei depositi di sostanza amiloide e di proteina neurofibrillare "tau" nei neuroni di varie parti del cervello, che predispongono alla loro perdita; analogamente, vari studi hanno dimostrato la presenza delle stesse proteine neurofibrillari quando l'alluminio si accumula a questo livello. Anche se tale coincidenza potrebbe essere causale, suggerisce la presenza di un ruolo dell'alluminio nell'eziopatogenesi della malattia stessa (Shaw and Tomljenovic, 2013).

L'aumento dell'incidenza dei Disturbi dello Spettro dell'Autismo (ASD) a partire dagli anni '90 ha suggerito una sua possibile relazione con l'utilizzo, in tenera età, di vaccini che contengono l'alluminio idrossido come adiuvante. Questo si

spiegherebbe col fatto che l'iniezione del vaccino, bypassando il sistema gastroenterico (dove normalmente solo una minima percentuale di alluminio verrebbe assorbita) permette all'organismo di assorbire fino al 100% dell'alluminio presente; inoltre, presentandosi in composti di elevato peso molecolare, non viene eliminato rapidamente dal rene. L'adiuvante è una sostanza che deve stimolare il sistema immunitario e aumentare così la risposta al vaccino; se la risposta immunitaria è elevata, possono comparire con maggiore frequenza degli anticorpi autoimmuni. Nei bambini autistici vengono rinvenuti diversi anticorpi attivi contro specifici antigeni neuronali; questo fatto supporterebbe ulteriormente l'ipotesi dell'esistenza di una correlazione tra la malattia e l'utilizzo di vaccini contenenti il metallo. L'alluminio interverrebbe anche indebolendo la barriera emato-encefalica e aumentandone la permeabilità, favorendone l'attraversamento da parte di questi anticorpi e la loro azione neurotossica (Shaw and Tomljenovic, 2013).

Anche la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS) che si presentava nel quadro sintomatologico della così detta Sindrome della (prima) Guerra del Golfo nei soldati tornati a casa sembra collegata all'utilizzo dell'alluminio come adiuvante nel vaccino contro l'antrace (Shaw and Tomljenovic, 2013).

Un caso particolare, descritto in seguito all'assunzione di antiacidi per lunghi periodi, riporta la comparsa di osteomalacia, dovuta alla carenza di fosfati in circolo: l'alluminio, infatti, si può legare al fosforo assunto con la dieta e ridurne l'assorbimento intestinale (ATSDR, 2008). Nei pazienti uremici sottoposti a dialisi è stato osservato un aumento dei livelli ossei di alluminio, con conseguente indebolimento della struttura scheletrica stessa, per la sua presenza nelle soluzioni usate dalla macchina (ATSDR, 2008).

Studi condotti sui topi dimostrano la capacità dell'alluminio di causare, nel maschio, danno al testicolo, riduzione della qualità dello sperma e riduzione della fertilità (EFSA, 2008a). Nelle femmine non sono state dimostrate alterazioni della fertilità.

Nelle ratte gravide l'alluminio, somministrato per via intraperitoneale ad alte dosi, ha effetti embriotossici e teratogeni; in seguito a somministrazione orale, dà

riduzione del peso fetale o alla nascita e ritardo nell'ossificazione (ATSDR, 2008).

Studi epidemiologici retrospettivi di soggetti esposti all'alluminio sul luogo di lavoro hanno suggerito una relazione tra l'inalazione della polvere che lo contiene e lo sviluppo di tumori, soprattutto a polmoni e vescica (IAI, International Aluminium Institute, 2007). L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha concluso che gli studi provano limitatamente che sia questo tipo di esposizione a portare allo sviluppo di tumori, poiché in questi ambienti potrebbe esserci l'inalazione anche di altri agenti di comprovata cancerogenicità come idrocarburi policiclici aromatici, amine aromatiche, composti azotati e amianto. Inoltre gli studi a questo riguardo sono pochi e datati; per tutti questi motivi l'alluminio non è classificato come cancerogeno per l'uomo.

RAME (Cu)

Generalità

Il rame (Cu) è un metallo pesante che, al suo stato nativo sotto forma di pepite, è stato individuato e utilizzato dall'uomo fin dal IX millennio a.C., dapprima da solo, successivamente in lega con lo stagno a formare il bronzo. Oggi, per le sue particolari proprietà chimico-fisiche, le sue maggiori applicazioni sono nella produzione dell'energia elettrica (ma non nel suo trasporto, poiché i cavi sospesi degli elettrodotti sono di alluminio) e nei circuiti elettronici. Il rame è sempre stato utilizzato anche per produrre un'amplessima gamma di oggetti di uso quotidiano e nella scultura: la famosa Statua della Libertà contiene ben 28 tonnellate di questo metallo.

Il rame è un micronutriente essenziale per gli animali e l'uomo, poiché entra nella struttura di alcuni enzimi fondamentali, oltre a intervenire nell'emopoiesi e nel metabolismo delle cellule. Deve quindi essere assunto giornalmente attraverso la dieta: il limite raccomandato per l'adulto è di 1,1 mg (SCF, Scientific Committee for Food, 1993). Come molti altri metalli essenziali, l'assunzione eccessiva di rame dà intossicazione, con effetti negativi sulla salute dell'uomo e degli animali. I composti del rame sono usati come additivi nei mangimi e regolamentati a livello europeo.

Fonti di esposizione per l'uomo

Per la popolazione in generale la fonte principale di esposizione al rame è rappresentata da acqua e cibo contaminati. In particolare, l'acqua potabile viene trasportata attraverso tubi che contengono rame, da cui potrebbe passare all'acqua stessa; altri fattori che ne influenzano il contenuto sono il pH e la durezza. Si stima che l'assunzione giornaliera di rame sia di 0,15 mg dall'acqua e 2 mg dal cibo, ma può aumentare in seguito al consumo dei cibi che ne contengono

maggiori quantità, come molluschi, frattaglie (soprattutto fegato e reni), legumi, cereali e noci (ATSDR, 2004a).

Per le sue caratteristiche positive, il rame è usato negli integratori alimentari e come additivo, sia per l'uomo sia per gli animali. A questo proposito, a livello europeo, il Regolamento (CE) n. 1924/2006 definisce quali sono le indicazioni nutrizionali e sulla salute che possono essere fornite sull'etichetta o nella pubblicità dei prodotti alimentari. Dato che molte proprietà del rame (per esempio: la capacità di proteggere il DNA, le proteine e i lipidi dai radicali liberi, la stimolazione del sistema immunitario, l'intervento nel metabolismo del colesterolo e del glucosio) vengono molto pubblicizzate dai produttori di alimenti che lo contengono, l'EFSA ha espresso delle Opinioni Scientifiche a tale riguardo (2009d; 2011). Analogo discorso per gli additivi dei mangimi, che sono regolamentati a livello europeo e su cui l'EFSA esprime dei pareri.

Ruolo biologico e carenza

Il rame è un microelemento essenziale, il terzo per abbondanza nel corpo umano dopo ferro e zinco, presente in quantità, nell'adulto, che variano dai 50 ai 150 mg (Turnlund, 1994). Negli organismi viventi risulta necessario per l'adeguato funzionamento di più di 30 enzimi, chiamati appunto cuproenzimi, come la citocromo C ossidasi, l'ultimo enzima della catena respiratoria dei mitocondri e la superossido dismutasi, coinvolta nella difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (EFSA, 2006). Il rame è anche un importante effettore di molecole che regolano l'espressione genetica delle cellule eucariotiche, attivando o bloccando la trascrizione di alcuni geni (Uauy *et al.*, 1998). Questo metallo è fondamentale per la normale crescita e lo sviluppo di neonati e bambini, per i meccanismi di difesa immunitaria, nella produzione di globuli rossi e bianchi, nel trasporto del ferro, nella struttura dell'osso e nel metabolismo di colesterolo e glucosio (Uauy *et al.*, 1998). Data la sua presenza in molti alimenti, la carenza di rame, nell'uomo, è poco frequente: si calcola che, in Europa, l'ingestione giornaliera sia di 1-2,3 mg nel maschio e 0,9-1,8 mg nella femmina, ancora più della dose raccomandata (EFSA, 2006).

Cinetica

Assorbimento

L'assunzione del rame avviene esclusivamente per via digerente e non sono disponibili dati sul suo assorbimento in seguito a inalazione (ATSDR, 2004a). Il rame viene rapidamente assorbito nel piccolo intestino e, in minor quantità, nello stomaco, in forma ionica o legato ad amminoacidi. Nel duodeno l'assorbimento avviene grazie a un meccanismo di trasporto attivo e saturabile quando la quantità di rame è ridotta, e attraverso diffusione passiva quando è presente in maggiori quantità (Turnlund, 1994). La percentuale di rame assorbito è influenzata dalla quantità presente nella dieta: Turnlund e colleghi (1989) hanno dimostrato come essa diminuisca all'aumentare della quota presente nella dieta, con un valore medio del 24-60%. Altri fattori possono influenzare questa fase, come la competizione con altri metalli quali zinco, ferro e cadmio: un significativo abbassamento della quota di rame assorbita si registra quando il suo rapporto con il cadmio è di 1:4 (Davies and Campbell, 1977). Analogamente, l'ingestione di elevati livelli di zinco riduce l'assorbimento del rame (Prasad *et al.*, 1978).

Trasporto e distribuzione

Dopo l'ingestione, i livelli ematici di rame salgono rapidamente e viene trasportato dal sangue, legato all'albumina, al fegato. A livello epatico il rame viene in parte utilizzato nella sintesi delle proteine. Il rame in eccesso viene immagazzinato legato alla metallotioneina, di cui induce la sintesi, o legato ad amminoacidi oppure viene eliminato, in quanto il fegato regola l'omeostasi del metallo.

Per raggiungere gli altri organi, negli epatociti il rame viene legato alla sua proteina plasmatica, la ceruloplasmina, che lega 6 o 7 ioni, trasportando così il 60-95% del metallo totale presente nel plasma (Harris, 1993). Arrivata ai tessuti, la ceruloplasmina non entra nella cellula, ma rilascia gli ioni Cu^+ e Cu^{2+} che vengono trasportati attraverso la membrana citoplasmatica da dei carrier specifici,

di cui il più importante è il Copper Transporter 1 (Percival and Harris, 1990). Gli ioni possono anche uscire dalla cellula e ritornare in circolo, cosicché il turnover del rame risulta bifasico. La sua emivita plasmatica è di 2,5 giorni nella prima fase (quando cioè è legato alla ceruloplasmina), 69 giorni nella seconda. Le maggiori concentrazioni di rame, oltre che nel fegato, si ritrovano nel cervello, nei reni e nel cuore (ATSDR, 2004a).

Escrezione

Il turnover del rame dipende dalla quantità assunta con la dieta: se l'assorbimento dovesse diminuire, anche l'escrezione calerà, in modo da mantenere un certo quantitativo di metallo nell'organismo e non andare incontro a carenze. L'escrezione avviene ad opera del fegato attraverso la bile e il riassorbimento del rame biliare è trascurabile. Nelle feci è presente anche il metallo non assorbito e la quota presente nelle cellule epiteliali desquamate e perdute. Soltanto una minima quantità di rame (dallo 0,5 al 3 %) è escreta attraverso le urine (ATSDR, 2004a).

Tossicodinamica

I meccanismi alla base della tossicità del rame, che si presenta quando le quantità assunte sono molto elevate, hanno come target il fegato, in particolare i mitocondri degli epatociti, dove può indurre uno stress ossidativo alla base del danno cellulare. Questo, nell'uomo, è caratteristico di un'intossicazione cronica, mentre nella forma acuta si registrano danni ad altri organi (EFSA, 2006). Il suo eventuale potere cancerogeno non è stato dimostrato, e l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) lo considera non classificabile come cancerogeno (gruppo 3).

Tossicità

Tossicità acuta

L'inalazione del rame, irritante per l'apparato respiratorio, da parte dei lavoratori esposti alle polveri che lo contengono provoca tosse, starnuti, dolore toracico e scolo nasale, oltre a irritazione oculare (ATSDR, 2004a).

I sintomi di un'intossicazione acuta da rame, evento poco frequente associato all'ingestione di cibo o acqua fortemente contaminati, sono ipersalivazione, dolore addominale, nausea, vomito e diarrea, oltre all'irritazione a carico delle mucose del tubo digerente (EFSA, 2006). Il rame può indurre anche danno ossidativo alla membrana degli eritrociti ed è tra le cause di anemia emolitica acuta, sia nell'uomo sia negli animali (ATSDR, 2004a).

Tossicità cronica

Nell'uomo, l'esposizione prolungata a dosi elevate di rame è stata collegata a delle patologie gravi, che si presentano soprattutto nei bambini (EFSA, 2006). La cirrosi infantile indiana (ICC, Indian Childhood Cirrhosis) è una patologia mortale dei bambini dell'India associata a elevati livelli epatici di rame; compare precocemente, con alterazioni importanti del fegato ma concentrazione ematica di rame normale. Sembra essere causata da un'intossicazione cronica legata all'abitudine di bollire e conservare il latte di vacca in contenitori di rame od ottone (EFSA, 2006). La malattia di Wilson è una patologia ereditaria autosomica recessiva caratterizzata da elevati livelli di rame nel fegato e bassi livelli di ceruloplasmina circolante, causati da mutazioni a carico del gene che sintetizza i trasportatori del rame nella membrana dell'epatocita e che ne permettono l'escrezione biliare. Ne consegue un accumulo cronico del metallo nel fegato, fino a quando, a circa 10-12 anni di età, non compaiono cirrosi, epatite cronica reattiva o insufficienza epatica fulminante (ATSDR, 2004a).

Il rame viene descritto anche come tossico per il sistema nervoso centrale dove, inducendo la produzione di radicali, favorirebbe lo sviluppo della malattia di

Alzheimer (Multhaup *et al.*, 1996); questa teoria deve essere ancora provata in modo efficace.

Come già in precedenza accennato, il rame non è classificato come cancerogeno per l'uomo; tuttavia, la concentrazione di rame e di ceruloplasmina presenti nel siero di pazienti oncologici è maggiore rispetto a quella del resto della popolazione, suggerendo un possibile collegamento (Di Silvestro, 1990). Livelli elevati di ceruloplasmina sono stati osservati anche in pazienti affetti da malattie cardiovascolari, tanto che vengono considerati come fattori di rischio di patologie coronariche (Di Silvestro, 1990).

FERRO (Fe)

Generalità

Il ferro (Fe) è un metallo pesante che, più di altri, è sempre stato utilizzato dall'uomo, data la sua diffusione e le sue caratteristiche, dapprima da solo, poi in lega col carbonio a formare la ghisa (che presenta il 4% di carbonio) e l'acciaio (che presenta meno dell'1% di carbonio); quest'ultimo è stato alla base dell'epopea della Rivoluzione Industriale nell'Ottocento. Ancora oggi il ferro rappresenta, da solo, il 95% della produzione mondiale di metalli; il suo costo limitato, la sua resistenza, duttilità ed elasticità (nella forma di acciaio) lo rendono un ottimo materiale da costruzione, indispensabile nella produzione di automobili, ferrovie, aerei e navi, nella costruzione di piattaforme per l'estrazione di greggio e gas e molto altro. Il ferro trova anche applicazioni nella vita quotidiana: di acciaio sono le pentole e molti utensili da cucina, i lavelli e i rubinetti, gli elettrodomestici, e sono solo alcuni esempi.

Il ferro è anche un micronutriente essenziale per la vita degli organismi animali, dove è il costituente fondamentale dell'emoglobina (quella proteina che, nei globuli rossi, permette la fissazione dell'ossigeno atmosferico e la conseguente utilizzazione a fini respiratori), della mioglobina e di alcuni metallo-enzimi. L'uomo deve quindi assumere il ferro attraverso la dieta, per evitare carenze che porterebbero gravi danni per la salute. Di conseguenza, gli integratori a base di ferro sono molto diffusi, sia per prevenire stati carenziali sia per migliorare le condizioni corporee: essi sono regolamentati a livello europeo. Nonostante la sua importanza, il ferro può risultare tossico per gli organismi quando viene assunto in dosi eccessive.

Fonti di esposizione per l'uomo

L'uomo assume il ferro di cui ha bisogno attraverso la dieta sia sotto forma di ferro non-eme, contenuto soprattutto in cereali, tuberi, verdure e legumi, sia sotto forma di ferro eme, cioè costituente dell'emoglobina e della mioglobina di origine animale che si ritrova nella carne rossa, nelle frattaglie e nel fegato (che sono i cibi ricchi di ferro per eccellenza), nel pesce, nel pollo e nei prodotti che contengono sangue. Il ferro eme è molto biodisponibile, tanto che il 20-30% viene assorbito, e rappresenta circa il 10-15% della dose giornaliera (WHO, 1989). Attraverso il cibo può venire introdotto anche il ferro esogeno, cioè presente nell'ambiente, ma anche derivato dal processo di cottura.

Svolgendo delle importanti funzioni nell'organismo, viene usato come additivo, sia per l'uomo sia per gli animali. A livello europeo, il suo utilizzo è definito dal Regolamento (CE) n. 1924/2006, relativo alle indicazioni nutrizionali che possono essere fornite sull'etichetta di un prodotto alimentare. L'EFSA a questo proposito ha espresso delle Opinioni sulla capacità del ferro di favorire la produzione dei globuli rossi e dell'emoglobina, il trasporto dell'ossigeno, lo sviluppo intellettuale e del sistema immunitario, l'attività muscolare e altro, usate a fini pubblicitari (EFSA 2009e, 2010c, 2013).

Ruolo biologico e carenza

Il ruolo principale che il ferro svolge nell'organismo è come costituente del gruppo eme dell'emoglobina, una proteina a 4 subunità, ognuna delle quali contiene la forma ionica Fe^{2+} , che lega l'ossigeno atmosferico nei capillari alveolari e lo trasporta ai tessuti. Nei muscoli si trova invece legato alla mioglobina, cromoproteina con un solo gruppo eme, che fissa l'ossigeno anche a tensioni molto basse, come quelle presenti nel sangue venoso, favorendone il trasporto nei tessuti muscolari e fungendo da riserva dello stesso in casi di ridotta ossigenazione tissutale.

Il ferro entra pure, come Fe^{3+} , nella composizione di alcuni metallo-enzimi

catalizzatori di reazioni di ossidoriduzione nella cellula, quali i citocromi, le perossidasi, le catalasi e le xantinossidasi che, sfruttando la capacità del metallo di cedere un elettrone e passare alla forma bivalente, permettono di difendere le cellule dall'azione dei radicali liberi (EFSA, 2006).

In totale, il corpo di un uomo adulto contiene 2,2-3,8 g di ferro, di cui il 70% si trova nei globuli rossi, il 3-5% nella mioglobina e il 16% negli enzimi; una piccola quota circola legata alla transferrina, la rimanente, sotto forma di ferritina ed emosiderina, è distribuita nei vari tessuti, in particolare nel midollo osseo, nel fegato e nella milza. Giornalmente dal corpo viene escreto 1 mg di ferro, e, dato che nell'intestino viene assorbito il 10% del metallo assunto, ne consegue che il fabbisogno giornaliero per un uomo adulto è di 8-10 mg (EFSA, 2006).

La carenza di ferro è associata ad anemia: l'anemia ferropriva è il disturbo nutrizionale più diffuso a livello mondiale, che colpisce soprattutto donne e bambini, in particolare nel Terzo Mondo (WHO, 1989). Con una minore disponibilità di ferro si manifestano anche riduzioni della produzione e della funzione di enzimi e proteine che lo contengono, minor generazione di ATP nella cellula (per la minor attività dei citocromi) e alterazioni della sintesi di RNA (EFSA, 2006).

Cinetica

Assorbimento

Il ferro non-eme presente sotto forma di sali o legato a proteine subisce l'azione dell'acido cloridrico presente nello stomaco, che libera lo ione ferroso, l'unico assorbibile a livello intestinale. L'assorbimento duodeno-digiunale del ferro non-eme dipende anche dalla presenza di altri composti nella dieta, a cui si lega: l'acido ascorbico (vitamina C), il citrato, gli aminoacidi e oligopeptidi della digestione della carne lo favoriscono, mentre i fitati, i fosfati e gli ossalati lo inibiscono (EFSA, 2006; WHO 1989). Il ferro eme presente nell'alimento, viene assorbito grazie a un eme-recettore specifico in quantità variabili dal 15% del totale in soggetti sani al 35% in stati carenziali (EFSA, 2006); soltanto elevati livelli luminali di calcio sembrano inibire questo meccanismo.

Trasporto e distribuzione

Negli enterociti il ferro viene legato all'apoferritina e, passato nel sangue, si scinde da essa e si ossida a ione ferrico, per legarsi a una specifica proteina plasmatica, la transferrina, che lega due ioni Fe^{3+} con elevata affinità. In forma libera si trova a basse concentrazioni in condizioni normali (quando cioè la transferrina non è saturata); questo è fondamentale per evitare la proliferazione batterica in sangue e linfa, poiché lo ione sopprime l'attività delle cellule immunitarie, favorisce la crescita di agenti patogeni e predispone allo sviluppo di infezioni anche mortali (Collins, 2003).

A livello tissutale, la transferrina si lega a dei recettori specifici e il ferro entra nel citoplasma della cellula, dove viene annesso agli enzimi e alle proteine che lo contengono. Se è presente in eccesso, viene legato alla ferritina, proteina che può trattenere fino a 4500 atomi di ferro e la cui degradazione dà origine all'emosiderina; da essa, quando richiesto, può venire rimobilitato e, legato alla transferrina, raggiungere gli eritroblasti, dove sarà disponibile per la sintesi dell'emoglobina.

Escrezione

L'eliminazione renale del ferro è molto lenta e non rappresenta la via principale per la sua escrezione. La maggiore quota (0,6 mg al giorno) viene persa attraverso la desquamazione degli enterociti e con le feci prima che possa passare in circolo. Dalla cute vengono persi 0,2-0,3 mg (EFSA, 2006).

Tossicodinamica

Il meccanismo che più di tutti sembra essere alla base della tossicità del ferro è lo stesso che viene utilizzato dai metallo-enzimi che lo contengono: lo ione ferroso può fungere da catalizzatore nella reazione di Fenton, in cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS) trasformano anioni superossidi in radicali idrossidi reattivi (EFSA, 2006).

Tossicità

Tossicità acuta

Avvelenamenti da ferro sono stati descritti in seguito all'assunzione di preparati pseudo-medicinali che ne contenevano in quantità eccessiva: l'azione irritante diretta del metallo causa erosione della mucosa di stomaco e intestino, mentre il suo assorbimento dà shock con vasodilatazione e collasso cardiaco, danno renale e insufficienza epatica. La dose mortale è di 60 mg/kg di peso corporeo (EFSA, 2006). L'assunzione di dosi minori ma comunque elevate, probabile se vengono usati integratori, è associata a nausea, vomito, bruciore gastrico, diarrea e costipazione (Liguori, 1993).

Tossicità cronica

Intossicazioni croniche da ferro vengono associate a difetti genetici nei meccanismi che ne regolano l'omeostasi, a un'eccessiva assunzione con la dieta o a una somministrazione iatrogena sovrabbondante (per esempio durante il trattamento di un'emoglobinopatia).

Nel primo caso, la malattia più diffusa è l'emocromatosi ereditaria, caratterizzata da una mutazione genetica che comporta un aumento dell'assorbimento di ferro e, dopo la saturazione della transferrina e della ferritina, il suo accumulo in fegato, pancreas e cuore, con sviluppo di epatomegalia, diabete mellito, cardiomiopatia ed epatoma. (EFSA, 2006).

Nei soggetti colpiti da emocromatosi si registra una maggiore frequenza di carcinomi epatocellulari, forse associati all'accumulo di ferro e al suo effetto pro-ossidante.

Nella popolazione in generale, sembra esserci una correlazione tra livelli elevati di ferro in circolo e lo sviluppo di cancro nell'intestino crasso, così come la tendenza a recidivare dell'adenoma coloretale dopo la sua rimozione sembra collegato a un'alta concentrazione sierica di ferritina e ad abbondanti quantità di ferro e carne assunte con la dieta (Tseng *et al.*, 2000).

Altri studi collegano livelli elevati di ferro a maggiore rischio di infarto del miocardio, ma probabilmente in questi casi intervengono altri fattori, come il fumo, la pressione sistolica alta, la glicemia e alti livelli ematici di colesterolo e trigliceridi (EFSA, 2006).

ZINCO (Zn)

Generalità

Lo zinco (Zn) è un metallo che fin dall'antichità è stato impiegato in lega con il rame a costituire l'ottone che i Romani utilizzavano per produrre monete e altri oggetti, ma la sua scoperta ufficiale risale al '700; oggi trova ampie applicazioni in campo siderurgico.

Lo zinco è un micronutriente essenziale per gli animali e l'uomo, presente in tutti i tessuti e liquidi del corpo come ione Zn^{2+} . Data la sua importanza biologica, è un ingrediente di molti integratori alimentari e di additivi per i mangimi degli animali.

Fonti di esposizione per l'uomo

Lo zinco è uno degli elementi maggiormente presenti nell'organismo e la popolazione in generale lo assume principalmente attraverso il cibo e l'acqua; lo si ritrova in molti alimenti, soprattutto di origine animale, come prodotti della pesca (una porzione di ostriche ne contiene più del fabbisogno giornaliero dell'adulto) e carne, mentre frutta e verdura ne contengono quantità minori. In media carne, pesce e pollo ne contengono 24,5 mg/kg, cereali e derivati 8 mg/kg, le patate 6 mg/kg (Mahaffey *et al.*, 1975); una dieta italiana tipica garantisce 10,6 mg al giorno di zinco, di cui 4,3 mg provenienti da carne e derivati (Lombardi-Boccia *et al.*, 2003).

Dato che svolge un importante ruolo nell'organismo, lo zinco entra nella composizione di alcuni integratori alimentari ad uso umano, di cui il Regolamento (CE) n. 1924/2006 definisce le modalità di etichettatura e di pubblicità sulla cui veridicità l'EFSA ha espresso dei pareri, l'ultimo dei quali risale al 2010 (EFSA, 2010d). In ambito zootecnico, il cloruro di zinco tetrabasico, l'ossido di zinco, lo zinco chelato con aminoacidi e il solfato di zinco monoidrato sono invece degli

additivi autorizzati nei mangimi per gli animali; anche in questo caso l'EFSA ha espresso dei pareri sulla loro sicurezza (EFSA 2012 b, c, d, e).

Ruolo biologico e carenza

Lo zinco è uno dei principali elementi presenti in traccia nel corpo, dove si ritrova in tutti i tessuti, secondo per quantità solo al ferro, ed è indispensabile per la crescita e lo sviluppo di microrganismi, piante e animali.

Lo zinco è prima di tutto un cofattore di 300 enzimi, che svolgono essenzialmente un ruolo catalitico, strutturale e regolatorio: la superossido dismutasi, la fosfatasi alcalina e l'alcol deidrogenasi sono solo alcuni esempi. Esso interviene anche nella stabilizzazione della struttura di un elevato numero di proteine, inclusi enzimi che intervengono nella trasduzione e nella trascrizione del genoma. I fattori di trascrizione che lo contengono sono chiamati zinc finger proteins, una famiglia di proteine che legano l'acido nucleico e intervengono nella regolazione trascrizionale dei processi metabolici della cellula (Chasapis *et al.*, 2012).

Il metallo è un elemento fondamentale nel processo di cicatrizzazione e nella coagulazione del sangue, regola le funzioni del sistema immunitario, la produzione di prostaglandine, la mineralizzazione ossea e garantisce un'adeguata funzionalità della tiroide. Nel maschio, lo zinco interviene nella produzione dello sperma, mantiene le funzioni della prostata, ed è importante soprattutto nella secrezione di testosterone. Lo zinco garantisce una crescita armonica del feto e, nel bambino, uno sviluppo regolare delle funzioni cognitive; aiuta anche la memoria. Il metallo favorisce la crescita e il mantenimento del tessuto connettivo e del collagene di cui sono composti i capelli, la pelle e le unghie. Lo zinco sembra regola il pH dei liquidi corporei e ha un ruolo nella percezione dei sapori (Chasapis *et al.*, 2012).

Il corpo umano adulto contiene dai 2 ai 4 g di zinco totale, e la dose giornaliera raccomandata è di 9,5 mg al giorno nell'uomo e 7 mg nella donna (EFSA, 2006). La carenza non è frequente e ci sono molti tipi di integratori disponibili come terapia; se ingerito in eccesso può dare diversi problemi legati alla sua tossicità, tanto che il livello massimo raccomandato è di 25 mg al giorno (ATSDR, 2005).

La carenza di zinco, anche se lieve, causa gravi patologie, che coinvolgono tutti gli apparati. I sintomi caratteristici sono perdita di appetito, anoressia e alterazioni del gusto e del tatto. Nel sangue si manifestano anemia, problemi durante l'aggregazione piastrinica e alterazioni del sistema immunitario. Durante la gravidanza, la carenza del metallo non permette un adeguato sviluppo delle cellule cerebrali del feto. Nei bambini impedisce il normale sviluppo fisico e intellettuale e causa alterazioni all'apparato riproduttivo. Nel maschio adulto, la carenza è associata a iperplasia prostatica, alterazioni delle funzioni riproduttive e infertilità. Carenze di zinco sembrano accompagnare anche disturbi gastroenterici e renali, l'anemia falciforme, stati di alcolismo, cancro e AIDS; è invece presente una fisiologica diminuzione dei livelli di metallo durante l'invecchiamento, poiché rimane legato in quantità maggiori alla metallotioneina e non entra nelle cellule (Chasapis *et al.*, 2012).

Tossicocinetica

Assorbimento

Ingestione

L'assorbimento dello zinco avviene a livello intestinale, in particolare nel duodeno, per diffusione passiva o per trasporto mediato da carrier, quest'ultimo facilmente saturabile. Anche la metallotioneina, di cui lo zinco induce la produzione negli enterociti, può intervenire in questa fase, ma il metallo ad essa legato rimane confinato nelle cellule intestinali, da cui verrà allontanato solo attraverso la loro desquamazione.

In generale, circa il 20-30% dello zinco ingerito viene assorbito a livello intestinale, ma la quantità assimilata dipende da diversi fattori, prima di tutto la solubilità dello zinco stesso e la sua disponibilità. Anche l'omeostasi dello zinco ne influenza l'assorbimento, che nelle persone con un deficit di metallo tenderà ad essere maggiore (ATSDR, 2005).

Trasporto e distribuzione

Nel sangue, lo zinco è principalmente localizzato negli eritrociti (per l'87% legato all'enzima carbonato deidratasi), ai quali conferisce maggiore resistenza all'emolisi, stabilizzandone la membrana. Nel plasma si trova legato per due terzi all'albumina (quota che passa ai tessuti con facilità), per il resto all' α 2-macroglobulina; anche altre proteine, come la transferrina e la ceruloplasmina, possono trasportarlo.

Lo zinco si distribuisce in tutti i distretti corporei, con differenze soggettive, ma le maggiori concentrazioni si trovano sempre nei muscoli, che ne contengono il 60% del totale, nello scheletro, che ne contiene il 30%, e, a seguire, nel fegato, nell'apparato gastroenterico, nel rene, nella cute, nei polmoni, nel cervello, nel cuore e nel pancreas, e anche nella prostata e nella retina (ATSDR, 2005).

Escrezione

Lo zinco viene eliminato principalmente, attraverso la bile nelle feci, dove si ritrova anche lo zinco non assorbito a livello intestinale. L'eliminazione è fondamentale nel normale mantenimento dell'omeostasi del metallo: se ne aumenta l'ingestione con la dieta e il soggetto presenta valori normali, ne aumenta la perdita con le feci; al contrario, se ne viene assunto di meno, ne verrà assorbito molto e la quota allontanata sarà minore. Lo zinco può essere escreto anche con le urine (Hambidge *et al.*, 1986). Una minore quota di metallo viene eliminata con la saliva, il sudore e attraverso i capelli (dove si accumula quando la quantità ingerita è molto elevata) (ATSDR, 2005).

Tossicodinamica

Se lo zinco viene assunto in dosi eccessive, la sua azione tossica si esplica attraverso l'alterazione dell'omeostasi di altri metalli essenziali, con cui compete per i siti di legame. La presenza di zinco nell'intestino, infatti, induce la produzione, da parte degli enterociti, della metallothioneina, proteina che lo lega e che ne permette l'accumulo citoplasmatico, fino a quando la cellula desquamata

non verrà eliminata con le feci. Ma la metallotioneina è anche la proteina che lega il rame: se essa è presente in quantità elevate nell'endotelio intestinale legata allo zinco, meno rame verrà assorbito e si potrà andare incontro a carenza (EFSA, 2006). Studi sui ratti hanno dimostrato che alti livelli di zinco possono alterare anche l'omeostasi del ferro e aumentarne il turnover, con anemia conseguente (Walsh *et al.*, 1994, Chiba and KiKuchi, 1984).

Tossicità

Tossicità acuta

La “metal fume fever” è una patologia che si presenta nei lavoratori che inalano un'elevata quantità di ossidi di vari metalli, soprattutto di zinco, caratterizzata da sintomi respiratori che compaiono a poche ore dall'esposizione, quali secchezza della gola e tosse, seguiti da dolore toracico, dispnea, febbre e cefalea. Già documentata nel 1927 (Drinker *et al.*), regredisce rapidamente dopo l'allontanamento dal luogo dell'esposizione, senza conseguenze croniche (Malo *et al.*, 1990).

L'intossicazione acuta in seguito a ingestione è poco frequente nell'uomo, associata ad avvelenamento da cibo od acqua stoccati in contenitori galvanizzati con lo zinco in modo non corretto; i sintomi riferiti sono nausea, vomito, dolore e crampi addominali e diarrea (Brown *et al.*, 1964).

Tossicità cronica

L'assunzione per lunghi periodi di 50-300 mg di zinco al giorno è associata a leucopenia, neutropenia, anemia sideroblastica (per deficit nella sintesi di eme), riduzione della concentrazione plasmatica di rame e dell'attività degli enzimi che lo contengono, come la superossidodismutasi e la ceruloplasmina, alterazione del metabolismo delle lipoproteine e danneggiamento della funzione immunitaria (Sandstead, 1995). La sintomatologia per molti aspetti è simile a quella visibile in corso di carenza di rame (EFSA, 2006).

Come già detto in precedenza, l'eccesso di zinco a livello intestinale induce una diminuzione dell'assorbimento di rame e può causarne la carenza; sono necessari però lunghi periodi. Un caso particolare è rappresentato dalle persone colpite dalla malattia di Wilson, a cui vengono prescritti 75 mg al giorno di zinco per contrastare l'eccesso di rame epatico (EFSA, 2006).

CROMO (Cr)

Generalità

Il cromo (Cr) è un metallo pesante presente in natura in vari stadi di ossidazione, i più importanti dei quali sono lo stato metallico (Cr), quello trivalente (Cr^{3+}) e quello esavalente (Cr^{6+}). Il cromo esavalente, presente in diversi composti di origine industriale (in particolare cromati e tiolati), è considerato la forma più pericolosa data la sua maggiore solubilità e capacità di penetrare nelle strutture cellulari; esso viene classificato come cancerogeno per l'uomo (gruppo 1) dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 1990). La forma trivalente invece è caratterizzata da una tossicità relativamente bassa ed è considerata un nutriente essenziale, rientrando in alcuni processi dell'organismo, dove potenzia l'azione dell'insulina e influenza il metabolismo di carboidrati, proteine e grassi.

La tossicità dei composti del cromo è stata valutata da numerose autorità internazionali, ma solo l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stabilito un limite massimo di 250 μg di assunzione giornaliera nell'adulto (WHO, 1996).

La normativa per il cromo, a livello europeo, si rifà al Regolamento (CE) n. 315/93, che definisce la necessità di stabilire limiti massimi per i contaminanti negli alimenti, e al Regolamento (CE) n. 1881/2006 che, pur stabilendo i limiti massimi per alcuni di essi, non riguarda questo metallo. La legislazione di riferimento è quindi quella italiana, in cui diverse leggi individuano metodiche di analisi, modalità di campionamento e quantitativi massimi di cromo presenti nelle varie matrici (acqua, suoli, alimenti, fanghi, ecc.). La concentrazione massima ammissibile nelle acque destinate al consumo umano è di 50 $\mu\text{g/L}$ (D.P.R. 24/05/1988 n. 236).

Fonti di esposizione per l'uomo

Il cromo trivalente si trova naturalmente negli alimenti, soprattutto nella frutta, nella verdura e nei cereali, dove la sua concentrazione dipende dalle condizioni del terreno in cui sono stati coltivati e dai processi di lavorazione, trasformazione ed eventuale arricchimento subito dal prodotto (Anderson *et al.*, 1997; Berner *et al.*, 2004). La quantità di cromo assunta dall'uomo dipende molto dal tipo di dieta che segue; secondo uno studio inglese (EVM, Expert Group on Vitamins and Minerals, 2003), la maggiore concentrazione si ritrova nei prodotti a base di carne (230 µg/kg), seguita da olio e grassi (170 µg/kg), pane (150 µg/kg), noci e cereali (140 µg/kg), pesce, zuccheri e conservanti (130 µg/kg). Il cromo si ritrova anche nell'acqua, dove la sua concentrazione dipende dalla natura del suolo sottostante e dall'eventuale presenza di impianti industriali.

Una categoria a rischio è rappresentata dai bambini, nei quali l'esposizione al cromo è più alta, per poi decrescere con l'età; questo perché, in molti Paesi, i cereali presentano elevate concentrazioni di cromo e sono tra gli alimenti maggiormente consumati da questo gruppo, ma anche latte e latticini, pur non essendo tra le fonti principali di cromo, vengono consumati in quantità elevate, aumentandone l'apporto (EFSA, 2010a).

Un'altra categoria a rischio per l'assunzione di dosi eccessive di cromo è rappresentata dai fumatori, poiché ogni sigaretta contiene da 1,4 a 3,2 µg Cr/g (Fresquez *et al.*, 2013).

Ruolo biologico e carenza

Il ruolo del cromo trivalente come elemento essenziale per l'organismo è stato documentato per la prima volta nel 1977 (Jeejeebhoy *et al.*, 1977). Il cromo svolge un ruolo fondamentale nella normale attività dell'insulina, potenziandone l'azione a livello periferico e prevenendo stati di ipo o iperglicemia. Il cromo interviene inoltre nel metabolismo dei lipidi, riducendo il contenuto sierico di trigliceridi e di colesterolo, prevenendo così importanti malattie cardiovascolari come l'ateriosclerosi (Abraham *et al.*, 1991) e partecipa anche al metabolismo

delle proteine, sia negli animali sia nell'uomo.

La carenza di cromo causa diversi sintomi: minore tolleranza al glucosio, iperglicemia, glicosuria, ipoglicemia, aumento dell'insulina circolante, riduzione del numero di recettori per l'insulina e del suo legame con essi, calo del peso corporeo, aumento della massa adiposa, aumento della pressione oculare, neuropatia periferica, encefalopatia e minore efficienza respiratoria (Anderson, 1997).

Cinetica

Assorbimento

Inalazione

L'assorbimento del cromo per via inalatoria è stata provata in seguito alla misurazione della sua concentrazione in siero, urine e capelli di lavoratori di industrie che lo utilizzano (Minoia and Cavalleri, 1988; Tossavainen *et al.*, 1980). L'apparato respiratorio rappresenta il principale bersaglio dell'azione tossica e cancerogena del cromo esavalente, anche se può venire ridotto alla forma trivalente nel liquido alveolare ad opera di ascorbato e glutazione (Suzuki and Fukuda, 1990).

Ingestione

L'apparato gastroenterico è la via fisiologica di assorbimento dell'elemento essenziale, ma rappresenta anche la via attraverso la quale la maggior parte del cromo esavalente entra nell'organismo, anche se meno del 5% del totale di cromo tossico presente nell'alimento viene effettivamente assorbito (Donaldson and Barreras, 1966). In questo senso è importante l'azione svolta dai succhi gastrici: in ambiente acido, infatti, viene ridotto alla sua forma trivalente e, di conseguenza, il suo passaggio nello stomaco diventa fondamentale per ridurne l'assorbimento per via orale (Donaldson and Barreras, 1966).

Trasporto e distribuzione

Una volta assorbito, il cromo viene riversato in circolo, dove la forma esavalente entra nei globuli rossi utilizzando carrier per fosfati e solfati, mentre una percentuale rimane nel plasma per lunghi periodi (Wiegand *et al.*, 1985). All'interno delle emazie viene ridotto grazie all'azione del glutatione (Debetto and Luciani, 1988; Petrilli and De Flora, 1978); durante questo processo, può interagire con altre molecole del citoplasma, incluso il DNA (Wiegand *et al.*, 1985), od uscire dalla cellula (US EPA, 1998).

Il cromo trivalente non riesce ad utilizzare gli stessi carrier, ed entra nella cellula in piccole quantità; si trova nel plasma, legato ad amminoacidi e proteine plasmatiche come le globuline (O'Flaherty, 1996).

Dal sangue il cromo in poche ore si deposita nell'osso (Witmer and Harris, 1991), nel fegato, nella milza e nel rene; in queste cellule il cromo esavalente può venire ridotto, ma anche esplicare la sua attività tossica, soprattutto a carico del DNA. Nei tessuti l'emivita è di qualche giorno (ATSDR, 2012a).

Escrezione

Il cromo viene escreto per via urinaria: è stato dimostrato che la quantità così eliminata non è legata alla quota assunta con la dieta, ma rimane pressoché stabile nel tempo (Anderson and Kozlovsky, 1985). Nell'uomo, i reni eliminano il 60% del cromo esavalente assorbito sotto forma di trivalente nel giro di 8 ore.

Per via fecale viene eliminato tutto il cromo non assorbito dall'intestino (permettendo, a livello sperimentale, di calcolare la quota di cromo effettivamente assorbita) e solo il 10% viene escreto per via biliare, dopo essere passato per il fegato e, in misura minore, attraverso i capelli, le unghie, il latte e il sudore (ATSDR, 2012a).

Tossicodinamica

Numerosi studi hanno dimostrato che il cromo trivalente non risulta tossico per gli animali da laboratorio a dosi di 750 µg/kg, cosicché non viene considerato tossico

per l'organismo (US EPA 1998a; EVM, 2003) né cancerogeno (tanto che la IARC lo mette nel gruppo 3, tra le sostanze non classificabili come cancerogene, insieme al cromo metallico). Quindi, quando si parla degli effetti tossici che il cromo ha nell'uomo, ci si riferisce all'esavalente.

Lo stato di ossidazione e la solubilità sono i fattori che influenzano maggiormente la tossicità del cromo stesso; la sua forma esavalente, infatti, avendo un maggior potere ossidante, tende ad essere irritante e corrosiva per i tessuti. Un altro fattore da considerare è la sua capacità di attraversare la membrana cellulare e di raggiungere il citoplasma, dove reagisce con altre molecole, ma in cui può subire la riduzione alla forma trivalente e stabile. La riduzione è un processo di detossificazione importante: se avviene fuori dalla cellula il cromo trivalente prodotto non viene trasportato dentro al citoplasma, cosicché nessun effetto tossico è visibile. L'equilibrio esistente tra la concentrazione extracellulare di cromo esavalente e quella intracellulare di cromo trivalente è importante per evitare che il Cr^{6+} entri nella cellula (Cohen and Kargacin, 1993, De Mattia and Bravi, 2004).

Cancerogenesi

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) all'interno della cellula comporta alterazioni nel citoplasma, che sono alla base della cancerogenesi stessa. Il cromo rientra tra gli agenti causali di stress ossidativo, i cui prodotti possono indurre mutazioni a carico del DNA cellulare (Chervona *et al.*, 2012), ma anche alterare il normale ciclo della cellula e causarne l'apoptosi. Altri tumori, come quello ai polmoni, vedono come causa principale l'azione infiammatoria e irritativa operata dal cromo, con lo sviluppo di un processo infiammatorio cronico che predispone alla trasformazione neoplastica (Daniels and Jett, 2005; Malkinson, 2005).

Tossicità

Tossicità acuta

I casi di intossicazione acuta da cromo in seguito ad inalazione di quantità elevate sono stati riportati in lavoratori esposti, che presentavano dispnea, tosse e difficoltà respiratorie. Altri effetti possono presentarsi a carico dell'apparato digerente e nervoso (US EPA, 1998).

L'ingestione causa ulcere buccali, dolore addominale, vomito, diarrea ed emorragie. La dose letale per ingestione di vari composti di cromo esavalente è nel range di 1,5-16 g, che provoca alterazioni emorragiche in vari organi, in particolare nel tratto gastroenterico, con conseguente shock e morte.

Tossicità cronica

L'inalazione cronica di cromo, solitamente di tipo professionale, porta allo sviluppo di polmoniti croniche, enfisema, tracheiti, bronchiti e faringiti croniche e broncopolmoniti (Dayan and Paine, 2001). A livello cutaneo, si manifesta una dermatite allergica associata a secchezza della cute, eritema, ulcerazioni, papule, desquamazione, vescicole e tumefazioni (Adams, 1990). La sua capacità di penetrare attraverso la cute causa ulcerazioni ("chrome holes") sulle dita, sulle nocche e sugli avambracci (Lewis, 2004).

L'ingestione cronica di elevate quantità di cromo può causare irritazioni a carico dell'apparato gastroenterico, dolori addominali, nausea, vomito, diarrea grave fino al collasso cardiocircolatorio e alla morte.

Numerosi studi sono stati condotti per valutare gli effetti del cromo su animali da laboratorio (ratti e topi) gravidi (ATSDR, 2012a). Uno studio condotto sui topi (Trivedi *et al.*, 1989) descrive come alte dosi di cromo esavalente (250-500 ppm nell'acqua) alterino il normale sviluppo fetale con ridotto peso, riassorbimento e sviluppo anomalo (alterazioni della coda e dell'ossificazione del cranio) e come a dosi ancora più alte (1000 ppm) non avvenga l'impianto embrionale. Non sono disponibili dati riguardanti effetti avversi nell'uomo (ATSDR, 2012a).

L'esposizione occupazionale al cromo è stata associata all'incremento dei tumori dell'apparato respiratorio (ATSDR, 2012a). Il cancro al polmone associato alla sua inalazione è l'unico tumore riconducibile al cromo con certezza.

MANGANESE (Mn)

Generalità

Il manganese (Mn) è un metallo la cui scoperta risale al '700, anche se l'uomo lo ha utilizzato fin dalla preistoria, dapprima come pigmento e in seguito nella fabbricazione del vetro. Ancora oggi trova ampia applicazione nell'industria metallurgica per produrre diversi tipi di acciaio.

Il manganese è un micronutriente essenziale per gli organismi viventi, ma in dosi eccessive ha un effetto nocivo sulla salute. Al contrario, la carenza comporta vari disturbi, ma nell'uomo è un evento poco frequente, poiché il metallo è contenuto in molti alimenti di uso quotidiano, come i cereali.

Fonti di esposizione per l'uomo

La fonte principale di manganese per la popolazione in generale è rappresentata dal cibo. I cereali, il riso e le noci contengono livelli elevati di metallo, dai 10 ai 30 mg/kg; le maggiori concentrazioni si rinvencono però nei vegetali a foglia verde e nel the, dato che una tazza ne può contenere da 0,4 a 1,3 mg (EFSA, 2006). Nell'acqua potabile la quantità presente è solitamente bassa, inferiore ai 10 µg/L (ATSDR, 2012b).

L'inalazione rappresenta un'altra via di contatto col manganese, caratteristica degli operai delle industrie che lo utilizzano, che rappresentano una categoria a rischio, e dei fumatori, in quanto ciascuna sigaretta ne contiene 131-245 µg/g (Fresquez *et al.*, 2013).

Il manganese, essendo un nutriente essenziale, viene utilizzato come additivo nei mangimi per gli animali e come ingrediente negli integratori per l'uomo (EFSA, 2009c).

Ruolo biologico e carenza

Il manganese è un componente di alcuni metallo-enzimi che svolgono un ruolo importante nell'organismo, come le arginasi (che intervengono nella sintesi di urea dall'arginina, ultimo passaggio del ciclo dell'urea), le piruvato carbossilasi (enzimi della gluconeogenesi e del ciclo di Krebs) e le superossido dismutasi (che proteggono le cellule dai radicali liberi e dallo stress ossidativo) (EFSA, 2006). Il metallo è un cofattore in altri sistemi enzimatici per la sua capacità attivante; interviene inoltre nella mineralizzazione ossea e nel metabolismo energetico e delle proteine (ATSDR, 2012b).

Per questo elemento non è definita una Dose Giornaliera Raccomandata (RDA), ma si ritiene che l'assunzione di 2-5 mg al giorno, fino ad un massimo di 10 mg, non causi effetti collaterali nell'adulto (EFSA, 2006). La carenza di manganese, poco comune nell'uomo, dà ritardo nella crescita, anomalie scheletriche, deficit riproduttivi, difetti nel metabolismo di lipidi e carboidrati e, nei neonati, atassia (EFSA, 2006).

Cinetica

Assorbimento

Inalazione

La dimensione delle particelle inalate ne influenza l'assorbimento: le più piccole, giunte nelle più fini diramazioni bronchiali e a livello alveolare, vengono rapidamente assorbite nel sangue e nella linfa, mentre le particelle più grandi, depositate sulla mucosa nasale, vengono rimosse dal sistema muco ciliare e in seguito eliminate o deglutite. Dal naso sembra che il manganese possa, risalendo il nervo olfattorio, arrivare al cervello (ATSDR, 2012b).

Ingestione

L'assorbimento avviene a livello del piccolo intestino attraverso un meccanismo mediato da carrier, ma anche per diffusione passiva. La quantità di manganese

assorbito è solitamente ridotta (3-5% sia dal cibo sia dall'acqua) a causa della sua bassa solubilità (Davidsson *et al.*, 1988), ma è maggiore nei bambini.

Trasporto e distribuzione

Nel sangue portale il manganese bivalente è legato all'albumina e all' α_2 macroglobulina; una piccola parte viene ossidata alla forma Mn^{3+} ed entra nella circolazione sistemica, solitamente legato alla transferrina. Essendo un elemento essenziale, in tutti i tessuti corporei ne sono presenti da 0,1 a 1 μg , e le maggiori concentrazioni si ritrovano nel fegato, nel pancreas e nel rene (poiché le loro cellule sono più ricche di mitocondri), meno nell'osso e nel grasso. Soprattutto nei soggetti giovani, il manganese si accumula in alcune parti del cervello, come il globus pallidus, la sostanza nera e il nucleo della base (EFSA, 2008b).

Escrezione

Il manganese viene principalmente escreto attraverso le feci, dove si trova la quota non assorbita e quella eliminata per via biliare. Una piccola quantità viene escreta con le urine (EFSA, 2008b).

Tossicodinamica

Il manganese esplica la sua azione tossica nelle cellule del sistema nervoso, anche se i meccanismi d'azione non sono ancora del tutto chiari.

Il manganese bivalente distrugge i neuroni dopaminergici, forse perché induce l'autossidazione o aumenta il turnover delle varie catecolamine intracellulari, con maggiore produzione di radicali liberi, specie reattive dell'ossigeno e altri metaboliti citotossici e diminuzione dei meccanismi di difesa anti-radicalici della cellula (Garner and Nachtman, 1989).

Il manganese darebbe anche stress ossidativo alterando la funzione della xantina ossidasi, enzima che metabolizza le xantine e le ipoxantine derivate dal catabolismo dell'ATP.

Il Mn^{2+} può inoltre sostituire lo ione Ca^{2+} , accumularsi nei mitocondri usando la

via di trasporto del calcio stesso e inibire la fosforilazione ossidativa; la membrana degli organelli perde la sua integrità, e meno energia viene prodotta.

Tossicità

Tossicità acuta

L'inalazione di polveri contenenti elevate concentrazioni di manganese può comportare, nell'uomo, una risposta infiammatoria da parte del polmone, con infiltrazione di macrofagi e leucociti, edema localizzato, tosse, bronchite e, a volte, polmonite (ATSDR, 2012b).

Difficilmente l'intossicazione acuta si può manifestare in seguito all'ingestione di dosi elevate di manganese, anche se bisogna sempre considerare gruppi a rischio i neonati e i bambini (poiché ne assimilano di più), le persone anziane, quelle con deficit di ferro e con patologie epatiche in atto (EFSA, 2006).

Tossicità cronica

L'esposizione per via inalatoria ad elevate quantità dei composti del manganese, soprattutto quelli contenenti il Mn^{2+} e il Mn^{3+} , causa una sindrome neurologica denominata manganismo, di tipo degenerativo e irreversibile; viene chiamata anche Parkinson-like disease o Parkinson manganese-indotto per i sintomi che condivide con questa patologia (difficoltà nel cammino e nel controllo preciso dei movimenti della mano (ATSDR, 2012b).

La somministrazione con l'acqua di elevate dosi di manganese (50-200 mg/kg/giorno) per lunghi periodi agli animali da laboratorio causa neurotossicità, anemia da sequestro di ferro, riduzione della fertilità e ritardo nello sviluppo sessuale nel maschio (EFSA, 2008b). Nell'uomo al riguardo sono riportati solo alcuni studi epidemiologici; per esempio, l'ingestione di acqua che conteneva elevate concentrazioni del metallo ha causato, in Giappone, 16 casi di intossicazione, con comparsa di letargia, aumento del tono muscolare, tremori e disturbi mentali; due pazienti sono poi deceduti (EFSA, 2006).

Il manganese non sembra avere effetti cancerogeni o genotossici; anche se *in vitro* sono state riportate delle mutazioni associate alla sua presenza, nel topo non sono riportati effetti di questo tipo (EFSA, 2006).

SELENIO (Se)

Generalità

Il selenio (Se) è un non-metallo del quale, anche se la sua scoperta risale ai primi dell' '800, soltanto dal 1960 si conosce il ruolo quale elemento essenziale per gli organismi viventi. Come micronutriente lo si ritrova in molti alimenti, ma in quantità elevate esplica un'azione tossica pericolosa per la salute umana. La sua carenza è associata a problemi in vari organi e viene indicata come causa di due patologie, presenti in Cina, dove il terreno (e, di conseguenza, le piante coltivate) è povero di questo elemento: la malattia di Keshan-Beck, che colpisce i bambini con ritardo nella crescita, atrofia muscolare, deformità della colonna vertebrale e artrosi, e la cardiomiopatia di Keshan, in cui il trattamento con selenio a scopo profilattico diminuisce l'incidenza. Il suo utilizzo negli integratori è permesso e regolamentato a livello europeo.

Il selenio si trova anche come contaminante nell'ambiente, rilasciato da fonti sia naturali sia umane, ed è stato usato molto nel campo dell'elettronica, anche se oggi è stato rimpiazzato dal silicio.

Fonti di esposizione per l'uomo

La popolazione in generale entra in contatto col selenio principalmente attraverso la dieta, ma anche attraverso l'aria contaminata. La Food and Drug Administration ha dimostrato che il 50% della dose giornaliera di selenio è rappresentata da cereali e derivati, il 36% da carne rossa, pollo e pesce e il 10% da latticini, per un totale di 0,071-0,152 mg. Anche gli organi animali, come fegato e rene, contengono elevate concentrazioni (ATSDR, 2003).

Il gruppo considerato più a rischio per gli effetti tossici del selenio è rappresentato dai lavoratori nell'industria dei metalli ed elettronica, i pittori e il personale ospedaliero (il selenio radioattivo viene usato come marker nella ricerca di tumori maligni non visualizzabili con altri metodi).

Il selenio è contenuto in molti integratori, dove viene reclamizzato per le sue proprietà antiossidanti. A questo riguardo, il Regolamento (CE) n. 1924/2006 definisce le modalità di etichettatura e di pubblicità dei prodotti che lo contengono e, come per altri metalli con queste caratteristiche, l'EFSA ne controlla la veridicità attraverso dei pareri scientifici. Come additivo nei mangimi è molto usato negli allevamenti di pollame e di bovini, ed è strettamente regolamentato; l'ultimo Regolamento (n. 427/2013) in tal senso riguarda la supplementazione massima della seleniometionina prodotta dal *Saccharomyces cerevisiae*.

Ruolo biologico e carenza

L'importanza biologica del selenio viene descritta in maniera esaustiva da Rayman (2000).

Il selenio, come amminoacido selenocisteina, entra nella composizione di circa 35 selenoproteine, alcune delle quali svolgono un importante ruolo enzimatico e le cui tre principali famiglie sono la deiodinasi, la tioredoxina riduttasi e la glutatione deidrogenasi. Tutti questi enzimi giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività della tiroide. La tioredoxina riduttasi e la glutatione deidrogenasi intervengono nel controllo dello stato redox della cellula, riducendo i radicali, come il perossido di idrogeno e gli idroperossidi, così da evitare alterazioni a carico dei fosfolipidi di membrana e la propagazione del danno cellulare. Il selenio rappresenta infatti una delle sostanze tipicamente descritte come antiossidanti, ed è utile per limitare il danno da ri-perfusione post-ischemico; sembrerebbe anche avere un'attività antitumorale, poiché ricerche epidemiologiche hanno indicato una diminuzione della mortalità per cancro associata ad un suo maggiore contenuto nella dieta.

Il selenio stimola inoltre il sistema immunitario e induce la proliferazione dei linfociti T attivati; tale azione è utile per prevenire le infezioni virali, tanto che la somministrazione dell'elemento è consigliata nei pazienti affetti da epatite (B o C), dove sembra evitare l'evoluzione tumorale. Anche ai soggetti affetti da HIV viene prescritto in quanto alla malattia è associata una diminuzione dei livelli sierici di selenio, usata come marker precoce, e perdita progressiva dei linfociti T

helper CD4; inoltre *in vitro* inibisce la replicazione del virus.

Il selenio è fondamentale per l'attività riproduttiva: la sua carenza causa aborto idiopatico nella pecora e predispone all'interruzione della gravidanza nel primo trimestre nella donna. Nel maschio è richiesto nella sintesi del testosterone e nella spermatogenesi, dove carenze causano negli spermatozoi anomalie, scarsa mobilità e perdita della coda con calo della fertilità del soggetto.

A livello cerebrale, il selenio permette il meccanismo di circolazione preferenziale e diminuisce la frequenza delle convulsioni nei bambini epilettici; la carenza comporta, in vecchiaia, una maggiore velocità di perdita delle facoltà cognitive, e nei soggetti affetti da Alzheimer le sue concentrazioni sono minori. L'encefalo, inoltre, è carente di catalasi, quindi il compito di allontanare i prodotti dell'ossidazione è affidato alle selenoproteine. Carenze sembrano associate anche a cambiamenti dell'umore.

Il selenio sembrerebbe proteggere da alcune malattie cardiovascolari, poiché la sua carenza è associata all'aumento degli idroperossidi, che inibiscono l'enzima prostaciclina sintetasi responsabile della produzione di prostaciline vasodilatatrici da parte dell'endotelio vasale, e alla stimolazione della produzione di trombociti, associati a vasocostrizione e aggregazione piastrinica.

Il selenio è anche un antinfiammatorio, poiché diminuisce la produzione di prostaglandine e leucotrieni intervenendo nell'azione delle ciclossigenasi e delle lipossigenasi.

La carenza dell'elemento è associata ad artrite reumatoide, pancreatite e asma.

Ralston e Raymond (2010) descrivono un'altra caratteristica importante del selenio, cioè la sua capacità di contrastare la tossicità del mercurio, in particolare del metilmercurio. Prima di tutto bisogna sottolineare che l'elevata affinità del mercurio per il selenio porta alla formazione di legami tra il metilmercurio e i selenoenzimi, per i quali è un inibitore specifico e irreversibile. Il metilmercurio si lega anche al selenio libero, formando il seleniuro di mercurio insolubile: ne consegue che sue elevate quantità comportano una carenza di selenio, che non sarà più disponibile per la sintesi di altri enzimi, con danni conseguenti soprattutto a carico del tessuto nervoso ed endocrino. Pertanto, l'effetto terapeutico e antitossico dell'assunzione di selenio si manifestano quando vengono garantiti i

livelli dell'elemento necessari a ripristinare le quantità sequestrate dal metallo pesante, così che i processi biologici non vengano compromessi.

Si stima che il corpo umano adulto contenga dai 5 ai 15 mg di selenio; la dose giornaliera raccomandata dal Comitato Scientifico per l'Alimentazione della Commissione europea è di 55 µg (EFSA, 2006).

Cinetica

Assorbimento

Il selenio viene assorbito rapidamente nell'intestino e, in minor misura, dallo stomaco dell'uomo, anche se la sua disponibilità dipende dallo stato fisico dei composti (solidi o in soluzione), dalla quantità assunta e dalla forma chimica (organico o inorganico) in cui si presenta (ATSDR, 2003).

Trasporto e distribuzione

Nel plasma il selenio è legato a tre proteine principali, la selenoproteina P, la glutatione perossidasi e l'albumina; da qui viene distribuito ai vari organi e raggiunge le massime concentrazioni in fegato e reni, dove viene usato per produrre gli aminoacidi e, successivamente, nella sintesi delle proteine che lo contengono (ATSDR, 2003). La selenometionina, se non viene subito usata, viene immagazzinata nei muscoli, nel fegato, nel pancreas, nello stomaco, nella mucosa intestinale e negli eritrociti. Il selenio attraversa la placenta e arriva al feto; si trova anche nel latte materno.

Escrezione

Prima dell'escrezione il selenio subisce la metilazione, meccanismo col quale viene detossificato, soprattutto quando è presente in concentrazioni elevate; viene eliminato con le urine e le feci ma anche, in corso di intossicazione acuta, con l'*espirium*, a cui conferisce un caratteristico odore agliaceo (ATSDR, 2003).

Tossicodinamica

I meccanismi molecolari alla base della tossicità del selenio non sono ancora chiari, anche se sono state avanzate diverse ipotesi, tra le quali un danno ossidativo dovuto a suoi metaboliti, l'inibizione della sintesi proteica e la sua reazione con gruppi sulfidrilici di proteine e cofattori (EFSA, 2006).

Tossicità

Tossicità acuta

L'assunzione di dosi elevate (250 mg) di selenite, seleniato o selenometionina causa nausea, vomito, alterazione delle unghie, perdita dei capelli, gonfiore delle punte delle dita, irritabilità, affaticamento ed *espirium* di odore agliaceo (EFSA, 2006).

Tossicità cronica

Gli effetti legati all'assunzione cronica di elevate quantità di selenio sono stati valutati in alcuni studi epidemiologici, condotti in aree dove la concentrazione dell'elemento nel suolo è elevata. L'intossicazione cronica prende il nome di selenosi, caratterizzata da disturbi gastroenterici, alterazioni patologiche delle unghie, perdita di capelli e dermatiti.

COBALTO (Co)

Generalità

Il cobalto (Co) è un metallo pesante i cui composti sono stati utilizzati, nell'antichità, per colorare il vetro e le ceramiche di diverse tonalità di blu e di verde; la sua scoperta come elemento risale però al '700. È un metallo molto usato nell'industria, dove trova svariate applicazioni, dalla metallurgia alle vernici; il suo isotopo radioattivo ^{60}Co è un importante radionuclide, e viene utilizzato come fonte di radiazioni gamma per diversi scopi.

Il cobalto è anche un micronutriente essenziale per gli organismi viventi quale atomo presente nella cobalamina o vitamina B₁₂. Date le sue funzioni biologiche, viene venduto anche negli integratori, il cui utilizzo è regolamentato a livello europeo.

Fonti di esposizione per l'uomo

L'uomo deve assumere la cobalamina attraverso la dieta, che rappresenta anche la fonte principale di esposizione al cobalto per la popolazione in generale. Gli alimenti contengono solitamente livelli bassi del metallo, e si stima che l'ingestione giornaliera sia di circa 11 µg, il 30% dei quali attraverso cereali e prodotti da forno e il 22% dalle verdure. Anche il fegato di bovino, i semi (di erba medica, di lino, di papavero e soia) e il cioccolato contengono livelli abbastanza alti di cobalto. L'acqua potabile contiene solitamente concentrazioni inferiori ai 2 µg/L (ATSDR, 2004).

Le sigarette ne contengono da 0,44 a 1,11 µg/g (Fresquez *et al.*, 2013); di conseguenza i fumatori possono essere considerati una categoria a rischio, come la popolazione che vive vicino a miniere, industrie metallurgiche o discariche che lo contengono o come i lavoratori che possono inalarne le polveri durante i processi di lavorazione.

Ruolo biologico e carenza

La vitamina B₁₂ è il nome generico delle cobalamine, un gruppo di molecole che contengono cobalto (Co³⁺) e che svolgono un importante ruolo biologico sia negli animali sia nell'uomo. La vitamina B₁₂ è un coenzima del metabolismo intermedio: la metilcobalamina entra nella reazione per la sintesi dell'aminoacido metionina, mentre la 5-deossiadenosincobalamina è il coenzima che permette la produzione del succinil-CoA, importante intermedio del ciclo di Krebs. La vitamina B₁₂, insieme all'acido folico, è una componente di alcuni enzimi coinvolti nella sintesi dell'emoglobina e, di conseguenza, nell'emopoiesi; partecipa anche al metabolismo delle proteine, dei lipidi e dei carboidrati, oltre ad essere necessaria al normale metabolismo del tessuto nervoso.

Il corpo umano adulto contiene circa 2,5 mg di questa vitamina, e il fabbisogno giornaliero è di 1 µg; poiché l'organismo non riesce a produrla, la fonte principale è rappresentata dagli alimenti. Di cobalamina sono ricchi i prodotti di origine animale come carne rossa, latticini e pesce, e le concentrazioni maggiori si trovano nel fegato e nelle sardine. Si calcola che l'ingestione effettiva giornaliera della vitamina sia di 2-6 µg, e in alcune diete possa arrivare ai 32 µg; non sono però associati effetti negativi sulla salute umana da ipervitaminosi (EFSA, 2006).

La carenza è caratteristica dei vegetariani e dei vegani (che devono integrarla) e dei soggetti che presentano alterazioni nel suo assorbimento. Essa è associata principalmente ad anemia macrocitica megaloblastica, la stessa dovuta a carenza di acido folico; altri sintomi, solitamente tardivi e che compaiono nel 75-90% dei casi, sono alterazioni neurologiche quali perdita di memoria e una degenerazione progressiva del midollo spinale caratterizzata da parestesia e debolezza alle gambe (EFSA, 2006).

Tra gli animali domestici, i monogastrici hanno bisogno di assumere la vitamina con la dieta; fanno eccezione il cavallo e il coniglio, dove viene prodotta dalla flora microbica cecale e successivamente assorbita dalla mucosa. Anche la microflora dei ruminanti è in grado di sintetizzare la cobalamina, a condizione che nell'alimentazione sia presente una quantità di cobalto sufficiente. L'utilizzo del

cobalto e dei suoi composti nei mangimi per gli animali è autorizzato dal Regolamento (CE) n. 1831/2003, mentre l'EFSA ha valutato il rischio derivante dal loro utilizzo sugli animali (EFSA, 2009).

Cinetica

Assorbimento

La vitamina B₁₂ assunta con gli alimenti viene liberata nello stomaco ad opera della pepsina e dell'acido cloridrico; per non essere distrutta dal pH acido, viene immediatamente legata all'aptocorrina o R-proteina, prodotta dalle ghiandole salivari e dalla mucosa gastrica. Nel duodeno tale legame viene degradato dalle proteasi pancreatiche, e la cobalamina libera si lega al fattore intrinseco, una glicoproteina secreta dalle cellule parietali del fondo e del corpo dello stomaco. Nell'ileo il complesso vitamina B₁₂-fattore intrinseco trova degli specifici recettori sulla membrana degli enterociti e viene internalizzato; la quantità di cobalamina assorbita diminuisce tanto più è alta la dose assunta. Nel citoplasma la cobalamina si lega alla transcobalamina II, con la quale viene riversata nel sangue portale; il picco sierico viene raggiunto 8 ore dopo l'ingestione (EFSA, 2006).

Trasporto e distribuzione

Nel sangue la vitamina B₁₂ è trasportata per l'80% dalla transcobalamina I e III e per il 20% dalla II; quest'ultima rappresenta il carrier che la porta nei tessuti, specie cervello e midollo osseo. La vitamina viene immagazzinata nel fegato (che ne contiene il 50-90% del totale) e nei reni (EFSA, 2006), ma si ritrova in tutti i tessuti corporei (ATSDR, 2004).

Escrezione

La vitamina B₁₂ viene eliminata attraverso la bile, legata alle cobalofiline, ma in larga parte viene riassorbita dall'ileo (circolo enteroepatico della cobalamina); soltanto 0,5 µg vengono persi giornalmente con le feci.

Tossicocinetica

Assorbimento

Ingestione

L'assorbimento gastrointestinale del cobalto nell'uomo varia dal 18 al 97% della dose assunta e dipende dalla quantità ingerita, dalla forma con cui si presenta nell'alimento e dallo stato nutrizionale del soggetto; in particolare, una carenza di ferro predispone ad una maggiore assimilazione (ATSDR, 2004).

Trasporto e distribuzione

Il cobalto circola nel plasma legato all'albumina. Nell'uomo non sono stati svolti degli studi sulla sua distribuzione, anche perché il cobalto si ritrova in molti tessuti come componente della cobalamina. Studi condotti sugli animali hanno dimostrato che il metallo si accumula nel fegato, ma alti livelli sono presenti anche in reni, cuore, stomaco e intestino (ATSDR, 2004).

Escrezione

In seguito ad ingestione, il cobalto assorbito viene rapidamente escreto con le urine e, in minor misura, con la bile, mentre la quota non assorbita viene eliminata con le feci (ATSDR, 2004).

Tossicodinamica

Il cobalto può avere effetti dannosi sulla salute sia nella sua forma stabile sia come isotopo radioattivo.

Il cobalto stabile agisce con una serie di meccanismi, molti dei quali non sono stati completamente chiariti. Analogamente al ferro bivalente, il Co^{2+} fungerebbe da catalizzatore in una reazione simile a quella di Fenton, in cui vengono prodotti dei radicali superossidi a partire dal perossido di idrogeno; lo stress ossidativo sarebbe alla base del danno al DNA, della perossidazione lipidica e della

riduzione dei livelli di glutatione ridotto a fronte dell'aumento di quello ossidato (Christova *et al.*, 2001, 2002).

Il cobalto blocca i canali del calcio delle cellule, alterando l'azione del glucagone sulle cellule epatiche e l'attività delle cellule β pancreatiche (Henquin *et al.*, 1983); interferisce anche nella trasmissione neuromuscolare (Weakly, 1983).

Il cobalto inibisce la sintesi del gruppo eme, influenzando l'attività dell'emoglobina e di altri enzimi che lo contengono, come la citocromo P450 e le catalasi (Legrum *et al.*, 1979); esso sembrerebbe però svolgere anche un'azione stimolante la produzione di globuli rossi, promuovendo la liberazione dell'eritropoietina e dando policitemia (Di Giulio *et al.*, 1991).

Il metallo stimola il sistema immunitario e interferisce sul metabolismo del glucosio, abbassandone i livelli ematici tramite l'alterazione dei trasportatori cellulari del glucosio non dipendenti dall'insulina (ATSDR, 2004).

Il cobalto radioattivo rappresenta un maggiore pericolo per la salute umana, poiché i raggi gamma e beta da esso prodotti hanno un elevato potere di penetrazione tissutale e causano gravi danni agli organi interni. Le radiazioni ionizzanti (che hanno, cioè, sufficiente energia per ionizzare atomi e molecole con cui reagiscono, oltre che per spezzare i legami tra di essi) alterano in maniera irreparabile il DNA, l'RNA e i lipidi, causando la morte della cellula o la sua trasformazione tumorale (ATSDR, 2004).

Tossicità

Tossicità acuta

L'intossicazione acuta da questo metallo non è un evento riportato in letteratura.

Il cobalto radioattivo, invece, attraverso le radiazioni che produce, può risultare letale per l'uomo e gli animali quando esse sono molto intense, anche in seguito ad un'unica esposizione. L'esposizione accidentale alle radiazioni causa polmoniti nelle 3-13 settimane successive, ma anche dispnea, congestione polmonare e tosse. In una seconda fase si sviluppano, sempre a carico dei polmoni, fibrosi, enfisema e ispessimento pleurico. A livello gastroenterico si manifestano dolore, vomito, emorragie, perdita di peso ed eventualmente morte. I danni si presentano

anche nei nervi periferici. L'esposizione può portare a cali della fertilità sia nel maschio sia nella femmina e avere effetti teratogeni sul feto, poiché alle radiazioni sono più sensibili le cellule in attiva e rapida mitosi. Negli animali da laboratorio sono state segnalate possibili alterazioni nello sviluppo di tutti gli organi, e, dopo la nascita, ritardo nella crescita, alterazioni neuro-comportamentali, endocrine ed epatiche, oltre che una maggiore incidenza di tumori. Si registrano anche alterazioni ematologiche e linforeticolari e tendenza alla cancerogenesi (ATSDR, 2004). Bisogna ricordare che il ^{60}Co è oggi molto usato nella radioterapia per il trattamento di alcuni tumori, dove gli effetti delle radiazioni vengono usati per distruggere le cellule alterate, cercando di ridurre le conseguenze negative per l'organismo, che comunque si possono presentare.

Tossicità cronica

Gli effetti di un'esposizione cronica (dai 2 ai 17 anni) per via inalatoria al cobalto includono irritazione dell'apparato respiratorio, diminuzione della funzionalità polmonare, asma, polmonite e fibrosi (ATSDR, 2004).

Il cobalto causa una cardiomiopatia, molto frequente negli anni '60, quando veniva usato come stabilizzatore della schiuma della birra: accumulandosi nelle miofibre ne comporta la degenerazione e la frammentazione, oltre ad alterare la funzionalità dei mitocondri, con conseguente compromissione della respirazione cellulare. Ne conseguiva tachicardia sinusale, insufficienza cardiaca sinistra, diminuzione della portata cardiaca, mancata risposta del miocardio alle catecolamine e danno intracellulare esteso. Da questa patologia erano affette persone che assumevano, per anni, 0,04-0,14 mg di metallo/kg/giorno (corrispondenti a 4-15 litri di birra); la morte sopraggiungeva qualche anno dopo la diagnosi (Ferrans *et al.*, 1964).

Il cobalto può sensibilizzare, dopo ingestione, il sistema immunitario, agendo come allergene: dopo una prima esposizione, vengono prodotti anticorpi specifici contro di esso e dopo il secondo contatto si sviluppa una dermatite allergica (ATSDR, 2004). La dermatite può comparire anche in seguito al contatto per via cutanea col metallo o i suoi composti.

ARGENTO (Ag)

Generalità

L'argento (Ag) è un metallo pesante conosciuto più per il suo valore economico che per la sua tossicità; raro e prezioso, l'uomo lo ha usato prima come mezzo di scambio, poi come moneta, oltre che nelle opere d'arte orafa e negli oggetti ornamentali di lusso. L'argento per la sua attività antibatterica ha trovato, in passato, applicazioni anche in medicina; ancora oggi è un ingrediente di alcuni farmaci ad uso topico e, come nanoparticella, rappresenta per molti il futuro in questo campo.

Non è un elemento essenziale per l'uomo e gli animali; come altri metalli, ha effetti dannosi sugli organismi viventi, anche se gli studi al riguardo sono limitati.

Fonti di esposizione per l'uomo

La maggiore fonte di contaminazione per la popolazione in generale è rappresentata dal cibo e dall'acqua. Negli USA si sono misurate le concentrazioni di argento in diversi alimenti, ottenendo i seguenti valori medi: latticini meno di 0,061 mg/kg, carne, pesce e pollo 0,015 mg/kg, cereali e derivati 0,008 mg/kg, vegetali con foglie 0,007 mg/kg, frutta meno di 0,05 mg/kg, olio e grasso meno di 0,03 mg/kg, per un totale, nella dieta, di 0,0091 mg/kg (Cunningham and Stroube, 1987).

Si stima che ogni persona ingerisca, giornalmente, 70 µg di argento (ATSDR, 1990).

I molluschi allevati o pescati vicino a scarichi industriali o di liquami contaminati, presentano concentrazioni maggiori di metallo e possono diventare pericolosi per la popolazione. L'argento è anche utilizzato come colorante alimentare (E174), soprattutto nei dolci, ai quali conferisce il suo colore metallico.

Tossicocinetica

Assorbimento

Inalazione

L'inalazione di vapori o polveri che contengono argento è tipica dell'esposizione professionale al metallo. L'assorbimento è rapido, sia attraverso la mucosa nasale sia a livello alveolare, e dipende dal diametro delle particelle; a livello bronchiale la clearance muco-ciliare cattura quelle di maggiori dimensioni, che vengono allontanate o deglutite e successivamente assorbite (ATSDR, 1990).

Ingestione

L'assorbimento caratteristico avviene in intestino, attraverso la mucosa, e la sua entità dipende dalla velocità di transito: più l'argento attraversa rapidamente l'apparato gastroenterico, meno ne verrà trattenuto. Il 21% della dose ingerita rimane nell'organismo per una settimana prima di essere escreta (East *et al.*, 1980).

Trasporto e distribuzione

L'argento, indipendentemente dalla via di assunzione, raggiunge il fegato, dove in parte si deposita e in parte viene eliminato attraverso la bile. A seconda della quantità presente e della solubilità del composto, il metallo si accumula sotto forma di granuli visibili al microscopio in altri organi oltre al fegato (dove si trova nelle cellule di Kupffer e nell'endotelio dei sinusoidi), come reni (dove si deposita sulla membrana basale dei glomeruli), muscoli, milza, cuore, ossa e ghiandole surrenali (ATSDR, 1990).

Escrezione

L'argento principalmente viene eliminato attraverso le feci, dove si trova la quota ingerita ma non assorbita, quella allontanata con la bile e quella inalata e successivamente deglutita. Una minore quantità viene eliminata con le urine e, in

generale, la velocità di escrezione è maggiore nella prima settimana dopo l'assunzione. Se è presente ingestione cronica di alti livelli di metallo, la capacità di eliminazione epatica attraverso la bile viene saturata ed esso si deposita in pancreas, apparato gastroenterico e tiroide (ATSDR, 1990).

Tossicodinamica

I meccanismi alla base della tossicità dell'argento non sono stati molto indagati nel corso degli anni, probabilmente perché i casi di intossicazione sono poco frequenti. Il metallo ha un'attività battericida conosciuta da tempo, attivo contro i Gram positivi e i Gram negativi, ma anche contro funghi, protozoi e virus; alla base ci sarebbe la capacità dello ione Ag^+ di indurre la creazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Tossicità

Tossicità acuta

Se inalato in quantità elevate, l'argento ha un'azione irritante a carico delle vie respiratorie superiori e il soggetto presenterà tosse e difficoltà respiratoria. L'esposizione professionale al nitrato d'argento causa bruciore agli occhi e alla cute in seguito a contatto diretto; possono formarsi anche dei depositi granulari di metallo nella congiuntiva e nella cornea (ATSDR, 1990).

Tossicità cronica

L'argiria è una condizione clinica legata, nell'uomo, all'esposizione prolungata, per mesi o anni, all'argento e ai suoi composti, in quantità che superano la capacità escretoria di fegato e reni; è caratterizzata dall'accumulo di granuli in cute, mucose, occhi e organi interni, come reni, milza, midollo osseo e sistema nervoso centrale. Il sintomo tipico è una colorazione grigia o grigio-blu assunta dalla cute: l'area interessata può essere limitata qualora il contatto ripetuto col metallo avvenga per via cutanea, oppure può essere più estesa se l'esposizione è

orale o di tipo inalatorio. Istologicamente è contraddistinta da un accumulo di granuli contenenti argento nel derma, in particolare sulla membrana basale, e la colorazione compare dopo l'esposizione al sole della parte: i raggi UV riducono il cloruro d'argento che si è accumulato nelle cellule in argento metallico, poi ossidato dai tessuti e legato come solfuro d'argento nero. L'argiria è una malattia incurabile, ma come forma cutanea non causa altri sintomi, rimanendo un problema tipicamente estetico (Lencastre *et al.*, 2013).

Tossicità delle nanoparticelle d'argento

In campo medico, oggi trovano sempre maggiori applicazioni le nanoparticelle, definite come particelle formate da aggregati atomici o molecolari di diametro inferiore ai 100 nm; quelle di argento sono tra le più usate. Le nanoparticelle si ossidano lentamente, liberando ioni Ag^+ ; le loro dimensioni ridotte ne permettono l'ingresso attraverso le membrane cellulari e l'elevato rapporto superficie/volume ne consente il massimo contatto con l'ambiente. Esse vengono usate per la loro attività biocida contro infezioni batteriche cutanee e malattie fungine (*Candida*) che colpiscono frequentemente i soggetti immunodepressi; svolgono pure un'azione antinfiammatoria, modulando la produzione di citochine, interferone gamma e altri fattori e diminuendo l'infiltrazione di neutrofili (Ravindran *et al.*, 2012).

Alcuni studi sono stati condotti per comprendere se esista un rischio associato all'esposizione alle nanoparticelle. Se inalate, si depositano nel polmone, dove si accumulano e da dove passano al sangue, legate all'albumina, per raggiungere fegato e reni o, attraverso il nervo olfattorio, il bulbo olfattorio e il cervello. In seguito ad ingestione, solitamente accidentale, causano ulcere gastrointestinali, accumulo epatico e argiria. Per via cutanea, dove bende contenenti nanoparticelle vengono usate per evitare la proliferazione batterica sulla pelle ustionata, possono dare argiria (Johnston *et al.*, 2010).

NORMATIVA EUROPEA

Generalità

L'Unione europea ha stabilito, nel corso degli anni, i tenori massimi di alcune sostanze contaminanti in molti prodotti alimentari, al fine di ridurre la presenza a livelli minimi. L'obiettivo è uniformare la normativa degli Stati membri per garantire la libera circolazione, nel mercato unico europeo, di prodotti alimentari che condividono le stesse caratteristiche per quanto concerne i contaminanti e, nello specifico, i metalli pesanti, così da garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica, in particolare dei gruppi più sensibili della popolazione, come bambini, anziani e soggetti immunodepressi.

Il primo Regolamento comunitario (CEE) che stabilisce procedure relative ai contaminanti nei prodotti alimentari è il n. 315/93. In esso i contaminanti vengono definiti come “ogni sostanza non aggiunta intenzionalmente ai prodotti alimentari, ma in essi presente quale residuo della produzione [...], della fabbricazione, della trasformazione, della preparazione [...], del trasporto o dello stoccaggio di tali prodotti, o in seguito a contaminazione dovuta all'ambiente”. Il regolamento prevede che un prodotto alimentare non possa essere commercializzato qualora contenga contaminanti in quantitativi inaccettabili sotto il profilo della salute pubblica e in particolare sul piano tossicologico; di conseguenza, essi dovrebbero essere mantenuti ai livelli più bassi che si possano ottenere mediante l'applicazione di buone pratiche durante tutto il processo di produzione. Sempre al fine di tutelare la salute pubblica, la Commissione può stabilire le tolleranze massime per contaminanti specifici, indicandone i valori massimi nei diversi prodotti alimentari, tenendo conto delle modalità di campionamento e di analisi e della sensibilità del metodo adottato. Tutte le disposizioni che possono incidere sulla salute pubblica sono adottate previa consultazione del Comitato Scientifico dell'Alimentazione Umana (SCF) della Commissione europea. Questo regolamento costituisce il riferimento normativo per molti altri Regolamenti (CE) successivi, in particolare il 466/2001 e il 1881/2006, oltre che per la Direttiva

2001/22/CE, che verranno trattati in seguito. Nel gennaio del 2000 è stato pubblicato a livello europeo il “Libro bianco per la sicurezza alimentare”, avente come obiettivo quello di descrivere un insieme di azioni necessarie a completare e modernizzare la legislazione dell’Unione europea in materia di alimentazione, così da renderla più coerente, comprensibile ed elastica, consentirne una migliore applicabilità, garantire una maggiore trasparenza ai consumatori e un alto grado di sicurezza alimentare. Per riuscire in tutto questo, si ritenne necessario migliorare le norme relative alla qualità e rafforzare i sistemi di controllo su tutta la catena alimentare, dall’azienda agricola al consumatore. Nel quadro di questi cambiamenti è compresa anche la legislazione relativa ai contaminanti nei prodotti alimentari, attraverso la modifica del Regolamento (CE) n. 194/97, in modo da fissare dei limiti massimi per alcuni di essi, tra i quali cadmio e piombo (che non erano infatti presenti).

Il Regolamento (CE) n. 178/2002 rafforza le norme applicabili alla sicurezza degli alimenti e dei mangimi che circolano nel mercato interno, al fine di proteggere i consumatori da pratiche commerciali fraudolente o ingannevoli e di garantire la salute e il benessere degli animali, oltre alla salute delle piante e dell’ambiente. Il Regolamento istituisce l’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA, *European Food Safety Authority*), un ente indipendente che deve fornire pareri scientifici e assistenza scientifica e tecnica a tutti i settori che abbiano un impatto sulla sicurezza alimentare; deve inoltre individuare le modalità di valutazione dei rischi e identificare quelli emergenti. Con questo regolamento viene anche creato il Sistema di Allarme Rapido per gli Alimenti e i Mangimi (RASFF, *Rapid Alert System for Food and Feed*), che mette in comunicazione gli Stati membri, la Commissione e l’EFSA, consentendo scambi di informazioni riguardanti le misure volte a limitare l’immissione o a ordinare il ritiro degli alimenti dal mercato; lo scambio riguarda anche i rapporti sugli interventi compiuti, pure a livello frontaliere. Il Regolamento 178/2002 crea una legislazione comune basata sull’analisi e l’identificazione del rischio e sulla gestione delle situazioni di crisi, istituendo il principio di precauzione da applicare ai prodotti sospettati di avere un effetto nocivo, nell’ottica di garantire la libera circolazione di alimenti sani e sicuri nella Comunità europea.

Valori massimi ammissibili e specifiche legislazioni dei principali metalli pesanti secondo normative vigenti in Italia ed Europa.

I valori massimi dei principali metalli pesanti (piombo, cadmio, mercurio e metilmercurio) negli alimenti furono indicati per la prima volta nel Regolamento (CE) n. 466/2001. Esso delinea un elenco comunitario, non esaustivo, in cui possono essere indicati i valori massimi per lo stesso contaminante a seconda dei diversi prodotti alimentari; viene inoltre specificato che ogni valore fissato a livello comunitario dovrà essere riesaminato regolarmente sulla base dei progressi compiuti in campo scientifico e tecnico, oltre che dei miglioramenti delle prassi industriali e agricole volti a ottenere una riduzione dei livelli stessi. Nell'allegato I vengono indicati dei prodotti che non possono essere commercializzati qualora presentino tenori di contaminanti maggiori di quelli specificati nell'allegato stesso.

Il Regolamento (CE) n. 466/2001 è stato poi abrogato e sostituito dal Regolamento (CE) n. 1881/2006, in vigore dal 1° marzo 2007, che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Quest'ultimo regolamento è stato poi modificato dal Regolamento (CE) n. 629/2008 e dal Regolamento (UE) n. 420/2011 per quanto riguarda i livelli di piombo, cadmio e mercurio in alcuni prodotti.

Tabella 15: tenori massimi di piombo nei prodotti alimentari come previsto dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 e successive modifiche del Regolamento (CE) n. 629/2008 e del Regolamento (UE) n. 420/2011.

Prodotti alimentari ⁽¹⁾	Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
Latte crudo ⁽⁶⁾ , latte trattato termicamente e latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte	0,020
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	0,020
Carni (escluse le frattaglie) di bovini, ovini, suini e pollame ⁽⁶⁾	0,10
Frattaglie di bovini, ovini, suini e pollame ⁽⁶⁾	0,50
Muscolo di pesce ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾	0,30
Crostacei ⁽²⁶⁾ : muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici.	0,50
Molluschi bivalvi ⁽²⁶⁾	1,5
Cefalopodi (senza visceri) ⁽²⁶⁾	1,0
Legumi ⁽²⁷⁾ , cereali e leguminose	0,20
Ortaggi, esclusi quelli del genere Brassica, ortaggi a foglia, erbe fresche, funghi e alghe marine ⁽²⁷⁾ . Nel caso delle patate, il tenore massimo si applica alle patate sbucciate.	0,10
Ortaggi del genere Brassica, ortaggi a foglia ⁽⁴³⁾ e i seguenti funghi ⁽²⁷⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (prataioli), <i>Pleurotus ostreatus</i> (orecchioni), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	0,30
Frutta, escluse le bacche e la piccola frutta ⁽²⁷⁾	0,10
Bacche e piccola frutta ⁽²⁷⁾	0,20
Oli e grassi, compreso il grasso del latte	0,10
Succhi di frutta, succhi di frutta concentrati ricostituiti e nettari di frutta ⁽¹⁴⁾	0,050
Vini (compreso il vino spumante, esclusi i vini liquorosi), sidro, sidro di pere e vini di frutta ⁽¹¹⁾	0,20 ⁽²⁸⁾
Vini aromatizzati, bevande aromatizzate a base di vino e cocktail aromatizzati di prodotti vitivinicoli ⁽¹³⁾	0,20 ⁽²⁸⁾
Integratori alimentari ^(*)	3,0

(*) Il tenore massimo si applica agli integratori alimentari nella forma in cui vengono messi in vendita.

Tabella 16: tenori massimi di cadmio nei prodotti alimentari come previsto dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 e successive modifiche del Regolamento (CE) n. 629/2008 e del Regolamento (UE) n. 420/2011.

Prodotti alimentari ⁽¹⁾	Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
Carni (escluse le frattaglie) di bovini, ovini, suini e pollame ⁽⁶⁾	0,050
Carne di cavallo, escluse le frattaglie ⁽⁶⁾	0,20
Fegato di bovini, ovini, suini, pollame e cavallo ⁽⁶⁾	0,50
Rene di bovini, ovini, suini, pollame e cavallo ⁽⁶⁾	1,0
Muscolo di pesce ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ , escluse le specie elencate nei tre punti seguenti.	0,050
Muscolo dei seguenti pesci ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ : palamita (<i>Sarda sarda</i>) sarago fasciato comune (<i>Diplodus vulgaris</i>) anguilla (<i>Anguilla anguilla</i>) cefalo (<i>Chelon labrosus</i>) suro o sugarello (<i>Trachurus species</i>) luvaro o pesce imperatore (<i>Luvarus imperialis</i>) sardina (<i>Sardina pilchardus</i>) sardine del genere <i>Sardinops</i> (<i>Sardinops species</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>) sogliola cuneata (<i>Dicologlossa cuneata</i>)	0,10
Muscolo di pesce dei seguenti pesci ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ : tombarello (<i>Auxis species</i>)	0,20
Muscolo di pesce dei seguenti pesci ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ : acciuga (<i>Engraulis species</i>), pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>)	0,30
Crostacei ⁽²⁶⁾ : muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) muscolo delle appendici.	0,50
Molluschi bivalvi ⁽²⁶⁾	1,0
Cefalopodi (senza visceri) ⁽²⁶⁾	1,0
Cereali, esclusi crusca, germe, grano e riso	0,10
Crusca, germe, grano e riso	0,20
Semi di soia	0,20
Ortaggi e frutta, esclusi ortaggi a foglia, erbe fresche, cavoli a foglia, funghi, ortaggi a stelo, pinoli, ortaggi a radice e tubero e alghe marine ⁽²⁷⁾	0,050

Ortaggi a stelo, ortaggi a radice e tubero, escluso il sedano rapa ⁽²⁷⁾ . Nel caso delle patate il tenore massimo si applica alle patate sbucciate.	0,10
Ortaggi a foglia, erbe fresche, cavoli a foglia, sedano rapa e i seguenti funghi ⁽²⁷⁾ : <i>Agaricus bisporus</i> (prataioli), <i>Pleurotus ostreatus</i> (orecchioni), <i>Lentinula edodes</i> (Shiitake)	0,20
Funghi, esclusi quelli elencati nel punto precedente ⁽²⁷⁾	1,0
Integratori alimentari ^(*) esclusi gli integratori alimentari elencati nel punto seguente.	1,0
Integratori alimentari ^(*) composti esclusivamente o principalmente da alghe marine essiccate, da prodotti derivati da alghe marine o da molluschi bivalvi essiccati.	3,0

(*) Il tenore massimo si applica agli integratori alimentari nella forma in cui vengono messi in vendita.

Tabella 17: tenori massimi di mercurio nei prodotti alimentari come previsto dal Regolamento (CE) n. 1881/2006 e successive modifiche del Regolamento (CE) n. 629/2008 e del Regolamento (UE) n. 420/2011.

Prodotti alimentari ⁽¹⁾	Tenori massimi (mg/kg di peso fresco)
Prodotti della pesca ⁽²⁶⁾ e muscolo di pesce ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ , escluse le specie elencate al punto seguente. Il tenore massimo si applica al muscolo delle appendici e dell'addome ⁽⁴⁴⁾ . Nel caso dei granchi e dei crostacei analoghi (<i>Brachyura</i> e <i>Anomura</i>) si applica al muscolo delle appendici.	0,50
Muscolo dei seguenti pesci ⁽²⁴⁾ ⁽²⁵⁾ : rana pescatrice (<i>Lophius species</i>) pesce lupo (<i>Anarhichas lupus</i>) palamita (<i>Sarda sarda</i>) anguilla (<i>Anguilla species</i>) pesce specchio (<i>Hoplostethus species</i>) pesce topo (<i>Coryphaenoides rupestris</i>)	1,0

ippoglosso (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) marlin (<i>Makaira species</i>) rombo del genere <i>Lepidorhombus</i> (<i>Lepidorhombus species</i>) triglia (<i>Mullus species</i>) abadeco (<i>Genypterus blacodes</i>) luccio (<i>Esox lucius</i>) palamita bianca (<i>Orcynopsis unicolor</i>) cappellano (<i>Trisopterus minutus</i>) squalo portoghese (<i>Centroscymnus coelolepis</i>) razze (<i>Raja species</i>) scorfano del genere <i>Sebastes</i> (<i>Sebastes marinus</i> , <i>S. mentella</i> , <i>S. viviparus</i>) pesce vela del Pacifico (<i>Istiophorus platypterus</i>) pesce sciabola (<i>Lepidopus caudatus</i> , <i>Aphanopus carbo</i>) pagello (<i>Pagellus species</i>) squali (tutte le specie) tirsite (<i>Lepidocybium flavobrunneum</i> , <i>Ruvettus pretiosus</i> , <i>Gempylus serpens</i>) storione (<i>Acipenser species</i>) pesce spada (<i>Xiphias gladius</i>) tonno e tonnetto (<i>Thunnus species</i> , <i>Euthynnus species</i> , <i>Katsuwonus pelamis</i>)	
Integratori alimentari (*)	0,10

(*) Il tenore massimo si applica agli integratori alimentari nella forma in cui vengono messi in vendita.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA

La sicurezza e la salubrità degli alimenti di origine animale rappresentano, oggi, assieme all'elevata qualità, le caratteristiche che il consumatore ricerca negli alimenti che acquista e che richiede ai produttori. Nel quadro del mercato globale, in cui materie prime e prodotti finiti viaggiano da un continente all'altro, ogni Paese dipende dall'importazione per rispondere alla domanda interna di determinati beni, per i quali non risulta autosufficiente. Il rischio maggiore per la sicurezza alimentare è rappresentato dalla contaminazione, sia chimica sia microbiologica, di tali prodotti, che può arrecare anche gravi danni alla salute umana. A livello europeo, la normativa è molto specifica e il controllo della produzione, la biosicurezza, la tracciabilità e l'igiene sono caratteristiche indispensabili in ogni processo produttivo; campionamenti ed analisi vengono condotti lungo tutta la catena alimentare, sia partendo dalla produzione primaria, sia risalendo dal prodotto finito (Andrée *et al.*, 2010).

Con tali presupposti, l'obiettivo principale di questa ricerca è svolgere un monitoraggio dell'eventuale contaminazione da metalli di prodotti alimentari di origine animale in Giordania, nello specifico, nelle regioni del Nord. Lo studio oggetto di questa tesi nasce dalla collaborazione con il professore Khaled M. Al-Qudah della facoltà di Medicina Veterinaria della Jordan University of Science and Technology (Irbid, Giordania). Sono stati prelevati direttamente dai macelli della zona di Irbid dei campioni di vari organi e tessuti (quali muscolo, polmoni, cuore, fegato, rene, ...) di bovini. L'analisi dei campioni è stata effettuata nei laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini", sotto la supervisione del dottor Giorgio Fedrizzi.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato effettuato nel macello di Irbid (Giordania) tra marzo e maggio 2012 da parte di due campionatori locali, che hanno prelevato aliquote di fegato, rene, polmone, muscolo, cuore, grasso e milza da carcasse di bovini. I campioni sono arrivati in Italia via aereo e sono stati conservati nei congelatori del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, ex Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Servizio di Farmacologia e Tossicologia fino al momento delle analisi.

Oggetto di questo elaborato sono i campioni di muscolo, fegato e rene prelevati da 30 diverse carcasse di bovino.

Caratteristiche dei campioni

I campioni provengono da 30 bovini identificati con lo stesso numero assegnato loro in Giordania; sono 28 maschi e 2 femmine, di età compresa tra gli 8 mesi e i 30 mesi. Da tutti gli animali sono stati prelevati campioni di fegato, da 29 animali sono stati prelevati anche campioni di muscolo, mentre solo da 13 animali sono stati prelevati campioni di reni, per un totale di 72 aliquote (tabella 18). I bovini provenivano da allevamenti diversi, di cui si riporta il nome del proprietario (tabella 19).

Tabella 18. Caratteristiche dei bovini analizzati nella prova: numero identificativo, età, sesso e campioni a disposizione.

NUMERO ANIMALE	ETÀ (mesi)	SESSO	MUSCOLO	FEGATO	RENE
1	12	m	X	X	NO
3	12	m	X	X	X
4	12	m	X	X	X
5	12	m	X	X	X
24	18	m	X	X	NO
29	18	m	X	X	NO
30	18	f	X	X	NO
46	30	m	X	X	NO
54	18	m	X	X	X
57	18	m	X	X	X
58	12	m	X	X	X
61	12	m	X	X	NO
64	24	f	X	X	NO
67	18	m	X	X	X
68	12	m	X	X	NO
75	18	m	X	X	NO
76	18	m	X	X	NO
83	12	m	NO	X	X
84	12	m	X	X	NO
92	12	m	X	X	NO
93	12	m	X	X	X
116	18	m	X	X	X
137	18	m	X	X	NO
142	18	m	X	X	NO
143	12	m	X	X	NO

151	18	m	X	X	NO
152	12	m	X	X	NO
196	12	m	X	X	X
197	8	m	X	X	X
212	8	m	X	X	X

Tabella 19: allevamenti di provenienza, identificati col nome del proprietario, dei bovini analizzati nella prova.

ALLEVATORE	NUMERO ANIMALE
ABU SAIM	3
	4
	24
	57
	61
	93
ABU SHOKAT	116
AL KHALILI	196
	197
ALAWNEH	1
	46
	67
	152
ALLNGE	143
ALNJII	212
ARAFAT	5

KAZAN	92
QADDOUMI	68
	137
SAADI	54
	58
	75
	76
SALAYMEH	64
	83
	84
	142
SAMARA	29
	30
YOSEPH	151

Fase analitica

Le determinazioni analitiche dei campioni sono state effettuate presso i laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, reparto chimico degli alimenti di Bologna. L'analisi quali-quantitativa è stata condotta secondo il metodo di prova interno dell'Istituto per la ricerca e la determinazione dei metalli in alimenti di origine animale e vegetale, mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP/MS). Tale metodo è attuato su carni, frattaglie, muscoli di pesce, crostacei, molluschi, cefalopodi, cereali, ortaggi, frutta, bacche, oli, succhi di frutta, vini e distillati; per gli alimenti di origine animale, il campo di applicazione è compreso tra 0,005 mg/kg e 2 mg/kg per ciascun metallo sottoposto a prova. I campioni sono stati sottoposti a mineralizzazione per via umida con acido nitrico concentrato, dopodiché sono stati portati ad opportuno volume con soluzione acida ed analizzati con ICP/MS.

Soluzioni di riferimento

- Soluzione multistandard di metalli per ICP-MS
- Soluzioni dei materiali di riferimento: 100 ng/mL (50 ng/mL per mercurio)
- Curva di taratura per l'ICP-MS: preparate le seguenti soluzioni da iniettare per ogni serie di analisi oltre alla soluzione dei materiali di riferimento
 - 50 ng/mL (25 ng/mL per il mercurio): diluire 50 mL di soluzione 100 ng/mL a 100 mL con la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento.
 - 10 ng/mL (5 ng/mL per il mercurio): diluire 20 mL di soluzione 50 ng/mL a 100 mL con la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento.
 - 5 ng/mL (2,5 ng/mL per il mercurio): diluire 25 mL di soluzione 10 ng/mL a 50 mL con la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento.
 - 1 ng/mL (0,5 ng/mL per il mercurio): diluire 10 mL di soluzione 5 ng/mL a 50 mL con la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento.
 - 0,5 ng/mL (0,25 ng/mL per il mercurio): diluire 20 mL di soluzione 1 ng/mL a 40 mL con la soluzione di diluizione dei materiali di riferimento.

Controlli di qualità interni ed estrazione dei campioni

Tutti i campioni sono stati conservati prima dell'analisi in frigorifero, congelatore o a temperatura ambiente in relazione alla tipologia della matrice.

Durante tutto lo svolgimento delle analisi ci si è attenuti a semplici regole qui sotto riportate:

- Per ogni serie di analisi mineralizzare un bianco reagente che verrà trattato come i campioni; se alla lettura strumentale la concentrazione del bianco sarà significativa ($> 2 \mu\text{g/mL}$) per uno o più metalli da sottoporre ad analisi, sottrarre tale valore a ciascun campione analizzato nella stessa serie di analisi. Se il bianco di processo presenta una concentrazione per uno o più metalli da sottoporre ad analisi $> 10 \mu\text{g/mL}$, ripetere la serie di analisi relativamente al metallo in questione. Procedere inoltre alla verifica ed eventuale sostituzione dei reagenti.

- Per ogni serie di analisi è necessario leggere in ICP-MS, parallelamente ai campioni, un materiale di riferimento certificato a scelta tra quelli disponibili e precedentemente mineralizzato. L'esito di tale lettura dovrà essere pari al valore nominale \pm l'incertezza di misura definita per il metodo stesso. Per la mineralizzazione preparare i materiali di riferimento pesando esattamente le quantità necessarie e procedere come descritto di seguito per i campioni. L'idrolizzato del materiale di riferimento, se conservato in frigorifero, è stabile per 12 mesi.
- Ogni 20 serie di analisi e comunque con frequenza non superiore al mese, mineralizzare e processare un materiale a titolo noto alternando i mineralizzatori al fine di verificare l'efficienza di mineralizzazione. L'esito di tale materiale dovrà essere pari al valore nominale \pm l'incertezza di misura definita per il metodo stesso.
- Con frequenza almeno bimestrale effettuare una prova di ripetibilità iniettando in due repliche la soluzione di un campione e verificando che i valori rientrino all'interno del limite di ripetibilità previsto dal metodo stesso.

Preparazione dei campioni

Dato che l'ICP-MS necessita di un campione allo stato liquido, il primo passaggio nella sua preparazione consiste nella mineralizzazione, cioè il processo chimico con cui si distrugge la parte organica della matrice aggiungendo acido nitrico e mettendolo a bagnomaria in un mineralizzatore.

Campioni di $3 \pm 0,5$ g di materiale da analizzare sono stati pesati nei tubi da digestione con una bilancia analitica di sensibilità di 0,1 mg. Successivamente, in ciascun tubo, sono stati aggiunti 10 mL di acido nitrico concentrato. Dopo 15 minuti, i tubi venivano coperti con i relativi tappi, ma non completamente chiusi, affinché il gas prodotto durante la reazione potesse venire allontanato ed aspirato dalla cappa. I campioni sono stati posti poi nei mineralizzatori a bagnomaria, con l'acqua a 75 ± 10 °C, per 750 minuti.

Ogni campione veniva poi portato al volume di 20 mL con acqua demineralizzata.

Ad 1 mL di idrolizzato, venivano poi aggiunti 9 mL di soluzione di diluizione in una provetta di polistirato, in modo da ottenere una diluizione di 1:10 del campione. Il campione era poi sottoposto ad analisi. Il fattore di diluizione totale del campione è 200, in quanto prima la sua concentrazione viene portata a 1:20 aggiungendo l'acqua distillata e successivamente viene diluito a 1:10 nella provetta.

Espressione dei risultati

Modalità di calcolo

L'identificazione e la quantificazione di ciascun metallo è effettuata direttamente sulla curva di taratura, che si ottiene iniettando una miscela di riferimento di cromo, arsenico, piombo, cadmio e di tutti i metalli che si vogliono ricercare alla concentrazione di 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL ciascuno; discorso a parte per il mercurio, le cui concentrazioni sono di 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL. La quantificazione avviene per interpolazione del valore ottenuto sulla retta di taratura; col software di calcolo fornito con la strumentazione si ottiene la concentrazione C (espressa in mg/kg) mediante la seguente formula:

$$C(\text{mg/kg}) = \frac{[\text{metallo (ng/mL)}] * V1 * v2}{\text{Peso} * 1000}$$

Dove V1= fattore relativo alla diluizione operata, 200 in condizioni standard;

V2= eventuale successiva diluizione (nel caso in cui la concentrazione di alcuni metalli sia tale da determinare un effetto memoria nei campioni successivi, è necessario effettuare una diluizione);

Peso= è il peso del campione, espresso in mg, con 4 cifre decimali.

Modalità di espressione

La presenza del metallo viene indicata con un numero seguito da 3 cifre decimali: X,XXX mg/kg.

Il campo di applicazione del metodo è compreso tra 0,005 mg/kg e 2 mg/kg per ciascun metallo sottoposto ad analisi; la strumentazione utilizzata permette comunque una quantificazione accurata a concentrazioni superiori. Dato che il

limite inferiore di applicazione del metodo è 0,005 mg/kg, sia l'assenza del metallo sia la sua presenza in concentrazione inferiore a tale valore, viene segnalato con <0,005 mg/kg, cioè come non rilevato (N.R.).

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei risultati si è deciso di riportare la media (μ), la deviazione standard (σ) e la mediana.

RISULTATI

I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni giordani sono riportati nell'appendice I, tabelle 45, 46 e 47. Al fine di compararli con la letteratura a disposizione, nelle tabelle 20, 21 e 22 sono riportati i valori medi, il range delle concentrazioni minima e massima e la mediana di ogni metallo per ciascuna matrice. Tutti i risultati sono indicati in mg/kg e, all'occorrenza, anche i dati forniti da altri autori sono stati convertiti in questa unità di misura. Si è poi deciso di confrontare i diversi valori raggruppando i soggetti in gruppi omogenei per età (tabelle 23-26) e allevamento (tabelle 27-33); dato che soltanto due bovini sottoposti alla prova sono femmine, non si è ritenuto utile fare un confronto per sesso. La discussione dei risultati è suddivisa per elemento chimico.

Tabella 20: media, deviazione standard, range e mediana dei valori dei campioni di muscolo per ciascun metallo, espressi in mg/kg.

METALLO	NUMERO CAMPIONI (^a)	MEDIA D.S.^b	±	RANGE (MIN.- MAX.)	MEDIANA
Al	29 (23)	2,303	± 4,71	0,020-12,834	0,237
Cr	29 (0)	0,213	± 0,13	0,105-0,819	0,174
Mn	29 (0)	0,183	± 0,11	0,049-0,362	0,16
Fe	29 (0)	25,887	± 11,19	10,56-49,27	22,97
Co	29 (29)	N.R.		N.R.	N.R.
Cu	29 (0)	2,889	± 1,98	0,526-6,759	2,22
Zn	29 (0)	44,323	± 14,32	22,129-73,566	48,45
As	29 (26)	0,043	± 0,06	0,006-0,114	0,009
Se	29 (0)	0,320	± 0,17	0,138-1,096	0,273
Ag	29 (29)	N.R.		N.R.	N.R.
Cd	29 (25)	0,012	± 0,006	0,005-0,018	0,012
Hg	29 (29)	N.R.		N.R.	N.R.
Pb	29 (24)	0,006	± 0,002	0,005-0,010	0,005

^a = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

Tabella 21: media, deviazione standard, range e mediana dei valori dei campioni di fegato per ciascun metallo, espressi in mg/kg.

METALLO	NUMERO CAMPIONI (a)	MEDIA D.S.^b ±	RANGE (MIN.- MAX.)	MEDIANA
Al	30 (28)	0,603 ± 0,62	0,168-1,039	0,603
Cr	30 (0)	0,155 ± 0,05	0,075- 0,286	0,142
Mn	30 (0)	1,47 ± 0,53	0,087-2,621	1,536
Fe	30 (0)	43,016 ± 31,56	20,93-198,12	35,59
Co	30 (1)	0,039 ± 0,016	0,005-0,064	0,041
Cu	30 (0)	29,142 ± 31,30	0,791-164,064	24,15
Zn	30 (0)	35,347 ± 14,41	19,434-82,803	32,739
As	30 (24)	0,007 ± 0,001	0,005-0,009	0,008
Se	30 (0)	0,6281 ± 0,66	0,305-4,001	0,487
Ag	30 (10)	0,0116 ± 0,008	0,005-0,036	0,008
Cd	30 (3)	0,032 ± 0,02	0,007-0,111	0,028
Hg	30 (28)	0,019 ± 0,003	0,017-0,022	0,019
Pb	30 (2)	0,029 ± 0,04	0,006-0,217	0,018

a = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

b D.S. = deviazione standard (σ)

Tabella 22: media, deviazione standard, range e mediana dei valori dei campioni di rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg.

METALLO	NUMERO CAMPIONI (^a)	MEDIA D.S.^b	±	RANGE (MIN.- MAX.)	MEDIANA
Al	13 (13)	N.R.		N.R.	N.R.
Cr	13 (0)	0,159	± 0,02	0,134-0,211	0,157
Mn	13 (0)	0,692	± 0,44	0,198-1,580	0,661
Fe	13 (0)	41,214	± 7,12	23,22-51,08	40,34
Co	13 (0)	0,016	± 0,009	0,005-0,038	0,017
Cu	13 (0)	10,22	± 14,52	3,860-57,513	5,39
Zn	13 (0)	22,703	± 4,87	18,144-36,594	21,462
As	13 (10)	0,013	± 0,01	0,005-0,026	0,008
Se	13 (0)	1,16	± 0,89	0,349-2,672	0,559
Ag	13 (12)	N.R.		0,010*	N.R.
Cd	13 (5)	0,081	± 0,049	0,009-0,131	0,105
Hg	13 (12)	N.R.		0,111*	N.R.
Pb	13 (6)	0,024	± 0,011	0,008-0,041	0,024

^a = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella colonna del range.

Tabella 23: media, deviazione standard e range dei valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, nei bovini di 8 mesi di età.

8 MESI, n=2 (197, 212)						
ELEMENTO	MUSCOLO		FEGATO		RENE	
	MEDIA ± D.S. ^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S. ^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S. ^a	RANGE (MIN.- MAX.)
Al	N.R.	N.R.	N.R.	0,168*	N.R.	N.R.
Cr	0,193±0,03	0,158-0,229	0,124±0,007	0,117-0,132	0,150±0,01	0,137-0,164
Mn	0,169±0,10	0,068-0,271	1,278±0,22	1,059-1,496	0,52±0,32	0,198-0,842
Fe	19,53±0,6	18,93-20,13	56,735±8,24	48,50-64,97	47,69±3,39	44,30-51,08
Co	N.R.	N.R.	0,031±0,01	0,021-0,041	0,014±0,004	0,010-0,018
Cu	3,126±1,89	1,236-5,017	28,001±2,17	25,83-30,17	5,564±0,59	4,972-6,155
Zn	34,24±3,2	31,04-37,44	29,944±3,84	26,10-33,78	22,893±0,09	22,80-22,98
As	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Se	0,229±0,005	0,224-0,234	0,425±0,12	0,305-0,545	1,225±0,74	0,482-1,968
Ag	N.R.	N.R.	0,011±0,004	0,007-0,016	N.R.	N.R.
Cd	N.R.	0,005*	0,0115±0,00	0,011-0,012	N.R.	0,027*
Hg	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Pb	N.R.	0,005*	0,025±0,02	0,006-0,045	N.R.	0,027*

^a D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto due soggetti appartengono a questa categoria, quando uno dei due presenta un valore non rilevabile, viene riportato il risultato positivo dell'altro nella colonna del range.

Tabella 24: media, deviazione standard e range dei valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, nei bovini di 12 mesi di età.

12 MESI, n=14			
(1, 3, 4, 5, 58, 61, 68, 83, 84, 92, 93, 143, 152, 196)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIERO CAMPIONI^(a)	TIERO CAMPIONI^(a)	TIERO CAMPIONI^(a)
	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)
Al	13 (9) 0,157 ± 0,10 0,020-0,319	14 (13) N.R. 1,039*	7 (7) N.R. N.R.
Cr	13 (0) 0,251 ± 0,17 0,121-0,819	14 (0) 0,175 ± 0,06 0,075-0,286	7 (0) 0,164 ± 0,02 0,146-0,211
Mn	13 (0) 0,168 ± 0,10 0,049-0,348	14 (0) 1,459 ± 0,57 0,087-2,040	7 (0) 0,732 ± 0,40 0,217-1,580
Fe	13 (0) 26,256 ± 11,63 10,56-49,27	14 (0) 47,474 ± 42,73 20,93-198,12	7 (0) 40,92 ± 3,92 36,76-47,82
Co	13 (13) N.R. N.R.	14 (1) 0,038 ± 0,016 0,005-0,062	7 (0) 0,017 ± 0,010 0,005-0,038
Cu	13 (0) 2,953 ± 1,92	14 (0) 33,134 ± 20,39	7 (0) 12,95 ± 18,23
Zn	13 (0) 42,936 ± 14,50	14 (0) 33,649 ± 8,25	7 (0) 23,478 ± 5,66
As	13 (11) 0,0075 ± 0,0015 0,006-0,009	14 (11) 0,008 ± 0,0005 0,008-0,009	7 (5) 0,017 ± 0,009 0,008-0,026
Se	13 (0) 0,351 ± 0,23 0,174-1,096	14 (0) 0,718 ± 0,91 0,331-4,001	7 (0) 1,212 ± 0,91 0,349-2,672
Ag	13 (13) N.R. N.R.	14 (5) 0,012 ± 0,006 0,006-0,021	7 (6) N.R. 0,010*

Cd	13 (13)	14 (2)	7 (2)
	N.R.	0,032 ± 0,02	0,074 ± 0,04
	N.R.	0,009-0,071	0,009-0,115
Hg	13 (13)	14 (12)	7 (6)
	N.R.	0,0195 ± 0,0025	N.R.
	N.R.	0,017-0,022	0,111*
Pb	13 (13)	14 (1)	7 (3)
	N.R.	0,021 ± 0,013	0,027 ± 0,010
	N.R.	0,005-0,047	0,013-0,041

(a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 25: media, deviazione standard e range dei valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, nei bovini di 18 mesi di età.

18 MESI, n=12			
(24, 29, 30, 54, 57, 67, 75, 76, 116, 137, 142, 151)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIERO CAMPIONI^(a)	TIERO CAMPIONI^(a)	TIERO CAMPIONI^(a)
	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)
Al	12 (10) 6,595 ± 6,239 0,356-12,834	12 (12) N.R. N.R.	4 (4) N.R. N.R.
Cr	12 (0) 0,185 ± 0,066 0,105-0,392	12 (0) 0,147 ± 0,03 0,105-0,190	4 (0) 0,154 ± 0,011 0,134-0,165
Mn	12 (0) 0,214 ± 0,10 0,070-0,362	12 (0) 1,529 ± 0,52 0,310-2,621	4 (0) 0,706 ± 0,49 0,203-1,467
Fe	12 (0) 27,339 ± 11,33 13,54-45,87	12 (0) 35,779 ± 11,54 24,33-61,21	4 (0) 38,49 ± 9,55 23,22-48,56

Co	12 (12) N.R. N.R.	12 (0) 0,039 ± 0,016 0,006-0,064	4 (0) 0,017 ± 0,01 0,008-0,030
Cu	12 (0) 3,172 ± 1,85 0,933-6,565	12 (0) 29,363 ± 41,60 2,675-164,064	4 (0) 7,773 ± 4,59 3,860-15,581
Zn	12 (0) 45,938 ± 14,56 24,425-73,566	12 (0) 40,389 ± 18,89 21,674-82,803	4 (0) 21,323 ± 2,47 18,873-25,397
As	12 (11) N.R. 0,114*	12 (9) 0,006 ± 0,001 0,005-0,008	4 (3) N.R. 0,005*
Se	12 (0) 0,301 ± 0,10 0,138-0,513	12 (0) 0,525 ± 0,18 0,281-0,930	4 (0) 1,036 ± 0,79 0,483-2,390
Ag	12 (12) N.R. N.R.	12 (3) 0,011 ± 0,01 0,005-0,036	4 (4) N.R. N.R.
Cd	12 (9) 0,014 ± 0,004 0,009-0,018	12 (1) 0,036 ± 0,03 0,007-0,111	4 (2) 0,124 ± 0,007 0,117-0,131
Hg	12 (12) N.R. N.R.	12 (12) N.R. N.R.	4 (4) N.R. N.R.
Pb	12 (8) 0,007 ± 0,002 0,005-0,010	12 (0) 0,040 ± 0,06 0,005-0,217	4 (2) 0,016 ± 0,008 0,008-0,024

(a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 26: valori dei campioni di muscolo e fegato per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dell'unico bovino di 24 mesi di età e dell'unico di 30 mesi.

ELEMENTO	24 MESI, n=1 (64)		30 MESI, n=1 (46)	
	MUSCOLO	FEGATO	MUSCOLO	FEGATO
Al	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cr	0,154	0,105	0,153	0,084
Mn	0,161	1,695	0,075	1,089
Fe	23,19	53,91	16,49	29,11
Co	N.R.	0,054	N.R.	0,045
Cu	0,526	0,791	0,547	1,247
Zn	55,178	19,434	52,306	25,316
As	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Se	0,269	1,056	0,372	0,584
Ag	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cd	N.R.	0,016	N.R.	0,048
Hg	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Pb	N.R.	0,025	N.R.	N.R.

Tabella 27: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Abu Saim.

ABU SAIM, n=6 (3, 4, 24, 57, 61, 93)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIPO CAMPIONI^(a)	TIPO CAMPIONI^(a)	TIPO CAMPIONI^(a)
	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)
Al	6 (5) N.R.	6 (5) N.R.	4 (4) N.R.
Cr	6 (0) 0,204 ± 0,06 0,133-0,330	6 (0) 0,152 ± 0,05 0,075-0,218	4 (0) 0,159 ± 0,01 0,150-0,172
Mn	6 (0) 0,208 ± 0,09 0,090-0,345	6 (0) 1,387 ± 0,53 0,291-1,903	4 (0) 0,814 ± 0,46 0,379-1,580
Fe	6 (0) 25,56 ± 9,66 17,01-45,87	6 (0) 34,035 ± 8,55 20,93-45,64	4 (0) 39,90 ± 2,37 38,01-43,96
Co	6 (6) N.R. N.R.	6 (0) 0,037 ± 0,019 0,005-0,060	4 (0) 0,021 ± 0,011 0,009-0,038
Cu	6 (0) 3,038 ± 1,25 1,352-4,557	6 (0) 27,92 ± 19,12 4,579-56,336	4 (0) 18,053 ± 22,80 4,000-57,513
Zn	6 (0) 42,752 ± 11,49 27,166-59,994	6 (0) 32,279 ± 10,67 21,830-49,212	4 (0) 25,15 ± 7,12 18,144-36,594
As	6 (6) N.R. N.R.	6 (5) N.R. 0,009*	4 (3) N.R. 0,026*
Se	6 (0) 0,423 ± 0,31 0,216-1,096	6 (0) 1,015 ± 1,34 0,281-4,001	4 (0) 1,365 ± 0,91 0,483-2,672

Ag	6 (6) N.R. N.R.	6 (4) 0,007 ± 0,002 0,005-0,009	4 (3) N.R. 0,010*
Cd	6 (6) N.R. N.R.	6 (1) 0,021 ± 0,006 0,012-0,028	4 (1) 0,082 ± 0,03 0,035-0,113
Hg	6 (6) N.R. N.R.	6 (5) N.R. 0,022*	4 (3) N.R. 0,111*
Pb	6 (6) N.R. N.R.	6 (0) 0,013 ± 0,006 0,009-0,024	4 (1) 0,022 ± 0,008 0,013-0,032

(^a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 28: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Alawneh.

ALAWNEH, n=4			
(1, 46, 67, 152)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIPO CAMPIONI(^a)	TIPO CAMPIONI(^a)	TIPO CAMPIONI(^a)
	MEDIA ± D.S.^b	MEDIA ± D.S.^b	MEDIA ± D.S.^b
	RANGE (MIN-MAX)	RANGE (MIN-MAX)	RANGE (MIN-MAX)
Al	4 (3) N.R. 0,319*	4 (4) N.R. N.R.	1 (1) N.R. N.R.
Cr	4 (0) 0,177 ± 0,03 0,153-0,234	4 (0) 0,17 ± 0,08 0,084-0,286	1 (0) N.R. 0,157*
Mn	4 (0) 0,112 ± 0,06 0,049-0,198	4 (0) 1,080 ± 0,48 0,310-1,580	1 (0) N.R. 1,467*

Fe	4 (0) 21,145 ± 13,36 10,56-43,99	4 (0) 38,178 ± 9,98 27,39-49,26	1 (0) N.R. 23,22
Co	4 (4) N.R. N.R.	4 (0) 0,031 ± 0,016 0,006-0,046	1 (0) N.R. 0,030
Cu	4 (0) 1,979 ± 1,87 0,547-5,174	4 (0) 22,916 ± 29,43 1,247-73,357	1 (0) N.R. 15,581*
Zn	4 (0) 41,602 ± 10,93 23,827-52,306	4 (0) 31,998 ± 9,73 21,674-46,949	1 (0) N.R. 20,976*
As	4 (3) N.R. 0,006*	4 (4) N.R. N.R.	1 (1) N.R. N.R.
Se	4 (0) 0,371 ± 0,10 0,237-0,513	4 (0) 0,576 ± 0,12 0,405-0,746	1 (0) N.R. 0,721
Ag	4 (4) N.R. N.R.	4 (2) 0,013 ± 0,006 0,007-0,020	1 (1) N.R. N.R.
Cd	4 (4) N.R. N.R.	4 (1) 0,045 ± 0,022 0,016-0,070	1 (0) N.R. 0,117
Hg	4 (4) N.R. N.R.	4 (4) N.R. N.R.	1 (1) N.R. N.R.
Pb	4 (4) N.R. N.R.	4 (1) 0,035 ± 0,01 0,023-0,047	1 (0) N.R. 0,008*

(^a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 29: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Saadi.

SAADI, n=4 (54, 58, 75, 76)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIPO CAMPIONI^(a)	TIPO CAMPIONI^(a)	TIPO CAMPIONI^(a)
	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)
Al	4 (4) N.R. N.R.	4 (4) N.R. N.R.	2 (2) N.R. N.R.
Cr	4 (0) 0,143 ± 0,03 0,105-0,182	4 (0) 0,144 ± 0,03 0,107-0,172	2 (0) 0,188 ± 0,023 0,165-0,211
Mn	4 (0) 0,151 ± 0,11 0,071-0,342	4 (0) 1,636 ± 0,26 1,391-2,040	2 (0) 0,323 ± 0,12 0,203-0,443
Fe	4 (0) 25,943 ± 9,94 18,46-42,90	4 (0) 38,543 ± 13,67 26,10-61,21	2 (0) 47,225 ± 1,34 45,89-48,56
Co	4 (4) N.R. N.R.	4 (0) 0,042 ± 0,015 0,023-0,064	2 (0) 0,008 ± 0,00 0,008
Cu	4 (0) 2,301 ± 1,75 1,010-5,312	4 (0) 18,865 ± 5,73 9,697-25,428	2 (0) 4,605 ± 0,745 3,860-5,350
Zn	4 (0) 45,72 ± 12,42 24,425-55,688	4 (0) 44,153 ± 18,87 25,186-75,554	2 (0) 21,25 ± 2,377 18,873-23,627
As	4 (4) N.R. N.R.	4 (3) N.R. 0,005*	2 (2) N.R. N.R.
Se	4 (0) 0,237 ± 0,07 0,138-0,332	4 (0) 0,571 ± 0,23 0,319-0,930	2 (0) 0,494 ± 0,055 0,439-0,549

Ag	4 (4) N.R. N.R.	4 (0) 0,015 ± 0,006 0,006-0,021	2 (2) N.R. N.R.
Cd	4 (4) N.R. N.R.	4 (0) 0,028 ± 0,012 0,007-0,038	2 (2) N.R. N.R.
Hg	4 (4) N.R. N.R.	4 (4) N.R. N.R.	2 (2) N.R. N.R.
Pb	4 (4) N.R. N.R.	4 (0) 0,083 ± 0,08 0,007-0,217	2 (2) N.R. N.R.

(^a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 30: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Salaymeh.

SALAYMEH, n=4			
(64, 83, 84, 142)			
Elemento	MUSCOLO	FEGATO	RENE
	TIPOLOGIA CAMPIONI(^a)	TIPOLOGIA CAMPIONI(^a)	TIPOLOGIA CAMPIONI(^a)
	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)	MEDIA ± D.S.^b RANGE (MIN-MAX)
Al	3 (2) N.R. 0,156*	4 (3) N.R. 1,039*	1 (1) N.R. N.R.
Cr	3 (0) 0,391 ± 0,30 0,154-0,819	4 (0) 0,177 ± 0,06 0,105-0,281	1 (0) N.R. 0,146*
Mn	3 (0) 0,124 ± 0,04 0,070-0,161	4 (0) 1,617 ± 0,28 1,224-2,001	1 (0) N.R. 0,711*

Fe	3 (0) 22,563 ± 4,62 16,62-27,88	4 (0) 37,758 ± 10,51 26,58-53,91	1 (0) N.R. 36,76*
Co	3 (3) N.R. N.R.	4 (0) 0,049 ± 0,014 0,026-0,062	1 (0) N.R. 0,005*
Cu	3 (0) 1,692 ± 0,84 0,526-2,473	4 (0) 58,765 ± 62,41 0,791-164,064	1 (0) N.R. 6,306*
Zn	3 (0) 53,769 ± 3,73 48,662-57,467	4 (0) 32,221 ± 10,31 19,434-47,384	1 (0) N.R. 19,943*
As	3 (2) N.R. 0,009*	4 (3) N.R. 0,008*	1 (1) N.R. N.R.
Se	3 (0) 0,294 ± 0,03 0,269-0,328	4 (0) 0,638 ± 0,28 0,357-1,056	1 (0) N.R. 0,349*
Ag	3 (3) N.R. N.R.	4 (2) 0,0065 ± 0,0005 0,006-0,007	1 (1) N.R. N.R.
Cd	3 (3) N.R. N.R.	4 (0) 0,029 ± 0,02 0,009-0,071	1 (0) N.R. 0,009*
Hg	3 (3) N.R. N.R.	4 (3) N.R. 0,017*	1 (1) N.R. N.R.
Pb	3 (2) N.R. 0,005*	4 (0) 0,017 ± 0,01 0,005-0,027	1 (1) N.R. N.R.

(^a) = il numero tra parentesi indica il numero di campioni il cui valore sia risultato inferiore al LOD (Limit of Detection, in italiano limite di rivelazione), qui pari a 0,005 mg/kg.

^b D.S. = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto un soggetto presenta un valore rilevabile, viene riportato nella riga del range.

Tabella 31: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Al Khalili.

AL KHALILI, n=2 (196, 197)						
ELEMENTO	MUSCOLO		FEGATO		RENE	
	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN.- MAX.)
Al	N.R.	0,020*	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cr	0,245±0,02	0,229-0,261	0,126±0,006	0,120-0,132	0,158±0,006	0,153-0,164
Mn	0,081±0,01	0,068-0,094	0,791±0,70	0,087-1,496	0,21±0,01	0,198-0,217
Fe	20,95±2,02	18,93-22,97	123,31±74,8	48,50- 198,12	46,06±1,76	44,30-47,82
Co	N.R.	N.R.	0,023±0,02	0,004-0,041	0,010±0,00	0,010
Ni	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cu	2,0575±0,82	1,236-2,879	13,54±12,31	1,219-25,83	5,152±0,18	4,972-5,332
Zn	30,244±0,79	29,449- 31,039	27,765±6,02	21,745- 33,784	22,374±0,43	21,948-22,8
As	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Se	0,229±0,005	0,225-0,234	0,487±0,06	0,429-0,545	0,482± 0,0005	0,481-0,482
Ag	N.R.	N.R.	N.R.	0,016*	N.R.	N.R.
Cd	N.R.	N.R.	N.R.	0,012*	N.R.	N.R.
Hg	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Pb	N.R.	0,005*	N.R.	0,006*	N.R.	N.R.

^a **D.S.** = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto due soggetti appartengono a questa categoria, quando uno dei due presenta un valore non rilevabile, viene riportato il risultato positivo dell'altro nella colonna del range.

Tabella 32: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Qaddoumi.

QADDOUMI, n=2 (68, 137)				
ELEMENTO	MUSCOLO		FEGATO	
	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)
Al	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cr	0,217±0,053	0,164-0,270	0,146±0,027	0,119-0,172
Mn	0,124±0,04	0,088-0,160	2,084±0,54	1,547-2,621
Fe	19,95±4,88	15,07-24,82	25,35±1,87	23,48-27,22
Co	N.R.	N.R.	0,035±0,01	0,025-0,045
Ni	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cu	1,68±0,54	1,139-2,220	23,01±3,147	19,863- 26,157
Zn	60,35±13,22	47,132- 73,566	33,15±4,91	28,239- 38,056
As	N.R.	N.R.	N.R.	0,005*
Se	0,223±0,003	0,219-0,226	0,427±0,1	0,331-0,522
Ag	N.R.	N.R.	0,008±0,00	0,008
Cd	N.R.	0,009*	0,037±0,02	0,017-0,058
Hg	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Pb	N.R.	N.R.	0,029±0,011	0,018-0,040

^a **D.S.** = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto due soggetti appartengono a questa categoria, quando uno dei due presenta un valore non rilevabile, viene riportato il risultato positivo dell'altro nella colonna del range.

Tabella 33: valori dei campioni di muscolo, fegato e rene per ciascun metallo, espressi in mg/kg, dei bovini provenienti dall'allevamento di Samara.

SAMARA, n=2				
(29, 30)				
ELEMENTO	MUSCOLO		FEGATO	
	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)	MEDIA ± D.S.^a	RANGE (MIN- MAX)
Al	N.R.	12,834*	N.R.	N.R.
Cr	0,28±0,11	0,169-0,392	0,164±0,03	0,137-0,190
Mn	0,328±0,034	0,294-0,362	1,389±0,182	1,207-1,571
Fe	31,585±0,08	31,50-31,67	47,68±0,65	47,03-48,33
Co	N.R.	N.R.	0,037±0,004	0,033-0,040
Ni	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Cu	3,749±2,82	0,933-6,565	14,415± 11,74	2,675- 26,155
Zn	51,273±1,38	49,895- 52,65	56,22±26,58	29,64- 82,803
As	N.R.	0,114*	N.R.	0,008*
Se	0,295±0,008	0,287-0,303	0,479±0,06	0,416-0,541
Ag	N.R.	N.R.	0,011±0,003	0,008-0,013
Cd	0,017±0,002	0,015-0,018	0,079±0,033	0,046-0,111
Hg	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.
Pb	0,0075± 0,0025	0,005-0,010	0,026±0,012	0,014-0,038

^a **D.S.** = deviazione standard (σ)

* = dato che soltanto due soggetti appartengono a questa categoria, quando uno dei due presenta un valore non rilevabile, viene riportato il risultato positivo dell'altro nella colonna del range.

DISCUSSIONE DEI RISULTATI

CADMIO

Il cadmio è un metallo pesante che si trova come contaminante nell'ambiente, le cui caratteristiche e i cui effetti tossici per l'uomo sono stati già descritti in precedenza. Dato che per la popolazione in generale la fonte principale di esposizione al cadmio è rappresentata dalla dieta, a livello europeo il Regolamento (CE) n. 1881/2006 e le sue successive modifiche stabiliscono le concentrazioni massime ammissibili del metallo in diverse tipologie di alimenti. Per quanto riguarda le matrici oggetto di questa tesi, il limite massimo di cadmio nella carne bovina è stabilito a 0,05 mg/kg di peso fresco, per il fegato della stessa specie a 0,5 mg/kg e per il rene a 1,0 mg/kg. Per valutare i rischi connessi all'assunzione del metallo con gli alimenti, la Commissione europea ha richiesto al CONTAM (Panel of Contaminant in Food Chain) dell'EFSA un'indagine sulla concentrazione del metallo in prodotti commercializzati nell'Unione europea; lo studio ha analizzato 140000 dati provenienti da 20 Stati membri e risalenti al periodo 2003-2007 (EFSA, 2009b). È così risultato che le maggiori concentrazioni di cadmio sono presenti nelle alghe, nel pesce e nei prodotti della pesca, nel cioccolato ed in altri cibi per diete particolari; è stata anche considerata, per il suo importante apporto nella dieta, la categoria "carne e prodotti a base di carne e frattaglie". Nel muscolo delle specie bovina, ovina e caprina la concentrazione media è di 0,009 mg/kg, con range 0,0005-0,18 mg/kg; il 51% dei risultati è al di sotto del Limite di Rivelazione (LOD, Limit of Detection), mentre la percentuale di aliquote che superano il livello massimo (LM) stabilito dalla normativa è il 3,6%. Per il fegato (categoria che comprende quello di bovino, pecora, maiale, pollo e cavallo), l'EFSA riporta come valore medio 0,116 mg/kg, con un massimo di 3,6 mg/kg e il 3,7% dei campioni sopra il limite massimo; in questo caso la percentuale di aliquote al di sotto del LOD è l'11%. Per quanto riguarda il rene delle stesse specie considerate per il fegato, il valore medio è di 0,2009 mg/kg, il valore massimo trovato è di 1,73 mg/kg e soltanto l'1% dei

campioni supera la soglia definita dalla normativa; anche in questo caso l'11% dei campioni è inferiore al LOD.

Prendendo come punto di partenza questi dati, si può fare un confronto con i risultati ottenuti dai campioni provenienti dalla Giordania. Nei 29 campioni di **muscolo** analizzati, 25 (l'86,2%) hanno valori inferiori a 0,005 mg/kg, cioè in essi il cadmio non è stato rilevato dall'ICP-MS perché presente in concentrazioni al di sotto del Limite di Rivelazione (LOD, Limit of Detection). I 4 campioni di muscolo positivi, cioè i numeri 29, 30, 137 e 212, presentano un valore medio di cadmio di 0,012 mg/kg, con un range da 0,005 mg/kg (appartenente al bovino 212) a 0,018 mg/kg (bovino 30). Analizzando meglio le caratteristiche dei soggetti positivi, si nota che i bovini 29, 30 e 137 hanno la stessa età, 18 mesi; i primi due hanno concentrazioni superiori alla media, rispettivamente 0,015 mg/kg e 0,018 mg/kg e appartengono allo stesso allevatore, Samara. In particolare il bovino 30, una delle uniche due femmine analizzate, presenta il valore di cadmio più alto nel fegato tra tutti i campioni, pari a 0,111 mg/kg; anche il numero 29 con 0,046 mg/kg, il numero 137 con 0,058 mg/kg presentano valori epatici superiori alla media d'organo (vedi in seguito).

Dei 30 campioni di **fegato**, soltanto 3, cioè il 10%, sono al di sotto del LOD; il valore medio epatico di cadmio è 0,032 mg/kg, con il picco di 0,111 mg/kg del numero 30 e il minimo di 0,007 mg/kg del numero 75. Negli altri campioni le concentrazioni sono inferiori agli 0,050 mg/kg, tranne nel numero 83 (0,071 mg/kg), nel numero 152 (0,070 mg/kg) e nel numero 137 (0,058 mg/kg).

Nei 13 campioni di **rene** giordani, 5 hanno valori minori del LOD, cioè il 38,5%. In questo organo le concentrazioni di cadmio sono maggiori rispetto alle altre matrici, perché è sede di accumulo del metallo: la media è 0,081 mg/kg, con range ampio, da 0,009 mg/kg (bovino numero 83) a 0,117 mg/kg (numero 67), ma valori elevati li presentano anche il numero 5 con 0,115 mg/kg, il numero 3 con 0,113 mg/kg e il numero 4 con 0,097 mg/kg. I bovini 3 e 4 provengono dallo stesso allevatore, Abu Saim, e, col numero 5, hanno la stessa età, 12 mesi.

Basandosi su questi valori, si può affermare che i risultati ottenuti dai campioni giordani non superano i livelli massimi stabiliti dalla normativa europea e che nel confronto con i dati EFSA, sia i valori medi sia i valori massimi sono inferiori ai

corrispondenti europei. Dai campioni giordani è possibile rilevare come le concentrazioni di cadmio siano maggiori nel fegato e nel rene rispetto al muscolo; tale dato è confermato anche da uno studio condotto in Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a) su 150 bovini allevati in diverse aree, sia rurali (definite non contaminate) sia in vicinanza di centri industriali (definite contaminate). Nelle aree contaminate del Belgio il 28% dei campioni di muscolo è inferiore al LOD (che in questo caso è pari a 0,002 mg/kg, più basso di quello del nostro studio), contro il 57-82% di quelle non contaminate. Per quanto riguarda il muscolo, le concentrazioni sono inferiori al limite europeo anche nelle aree contaminate, dove si trovano quelle maggiori (0,004 mg/kg contro gli 0,002 mg/kg di quelle rurali). Le quantità di cadmio aumentano nei campioni di fegato (0,191 mg/kg in aree non contaminate, 0,446 mg/kg in aree contaminate) e di rene (1,142 mg/kg se contaminata, 2,863 se non contaminata) e risultano sempre più elevate di quelle riscontrate nei campioni giordani. In totale, il 50% delle aliquote di rene e il 4 % delle aliquote di fegato provenienti da aree rurali supera i limiti europei, mentre nelle aree contaminate le percentuali salgono al 75% e al 25% rispettivamente. Da un altro studio basato sugli stessi dati (Waegeneers *et al.*, 2011) si evince che il bovino risulta essere un campione ottimale per monitorare la contaminazione da parte del cadmio dell'area in cui pascola. Infatti, esiste un modello dinamico che permette di trovare, in base alla quota di alimento ingerita dal soggetto giornalmente, una correlazione tra quantità di cadmio presente nel terreno, la sua concentrazione nelle piante e nei foraggi e il suo livello finale nei tessuti animali.

Il confronto con altri dati dalla letteratura è esplicito nella tabella 34. I risultati giordani risultano inferiori a quelli registrati in Arabia Saudita (Alturiqi and Albedair, 2012), Egitto (Abou-Arab, 2001), Marocco (Sedki *et al.*, 2003), Nigeria (Ihedioha and Okoye, 2012), Palestina (Swaileh *et al.*, 2009), Pakistan (Mariam *et al.*, 2004) e Slovacchia (Koréneková *et al.*, 2002); per fegato e rene, ma non per il muscolo, i valori sono più bassi di quelli riscontrati in Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a), Iraq (Al-Nahemi, 2011), Slovenia (Doganoc, 1996) e Svezia (Johrem *et al.*, 1991). I dati giordani sono invece superiori per tutte e tre le matrici a quelli registrati in Galizia (López-Alonso *et al.*, 2000) e per il muscolo a quelli condotti in Brasile (Batista *et al.*, 2012) e Romania (Ghita *et al.*, 2009).

Tabella 34: dati dalla letteratura sui livelli di cadmio in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
0,001	0,070	0,39	Svezia	1991	Johrem <i>et al.</i>
0,004	0,094	0,373	Slovenia	1996	Doganoc
0,0008 (a)	0,008 (a)	0,051 (a)	Galizia (Spagna)	2000	López- Alonso <i>et al.</i>
0,01 \pm 0,01 (b) 0,03 \pm 0,02 (c)	0,11 \pm 0,07 (b) 0,32 \pm 0,19 (c)	0,22 \pm 0,11 (b) 0,56 \pm 0,26 (c)	Egitto	2001	Abou-Arab
0,023-0,126 (d)	0,084-0,456 (d)	-	Slovacchia	2002	Koréneková <i>et al.</i>
0,6	5,1	10,3	Marocco	2003	Sedki <i>et al.</i>
0,33 \pm 0,05	0,42 \pm 0,10	0,909 \pm 0,19	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
0,005-0,006 (e)	-	-	Romania	2009	Ghita <i>et al.</i>
0,48	0,57	0,55	Palestina	2009	Swaileh <i>et al.</i>
0,002 \pm 0,002 (f) 0,004 \pm 0,004 (g)	0,191 \pm 0,136 (f) 0,446 \pm 0,473 (g)	1,142 \pm 0,922 (f) 2,862 \pm 3,159 (g)	Belgio	2009a	Waegeneers <i>et al.</i>
0,009	0,059	0,098	Iraq	2011	Al-Nahemi
1,56-2,02 (h)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
0,0014 \pm 0,0015	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
0,35 \pm 0,27	0,24 \pm 0,26	0,44 \pm 0,27	Nigeria	2012	Ihedioha and Okoye
0,012 \pm 0,006	0,032 \pm 0,02	0,081 \pm 0,049	Giordania	2013	questo studio

(a) = lo studio divide i risultati tra bovini da carne per sesso; si riporta la media dei maschi.

- (b) = bovini allevati in aree rurali;
- (c) = bovini allevati in aree industriali
- (d) = si riporta il range delle medie registrate in tre diverse regioni del Paese.
- (e) = si riporta il range delle medie registrate in tre diversi tagli di carne.
- (f) = bovini provenienti da aree non contaminate;
- (g) = bovini provenienti da aree contaminate; si rimanda al testo per la descrizione dello studio effettuato.
- (h) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

È interessante confrontare i campioni provenienti dalla Giordania anche in base all'età al momento della macellazione. Nel muscolo, il cadmio è stato rilevato soltanto in 3 soggetti di 18 mesi, con una media di 0,014 mg/kg. Nei campioni di fegato si può notare come la sua concentrazione aumenti all'aumentare dell'età: dagli 0,0115 mg/kg di media nei soggetti di 8 mesi, agli 0,032 mg/kg nei capi di 12 mesi, agli 0,036 mg/kg nei soggetti di 18 fino allo 0,048 mg/kg dell'unico soggetto di 30 mesi. Anche nel rene la quantità segnalata aumenta dagli 0,027 mg/kg degli 8 mesi d'età ai 0,074 mg/kg dei 12 fino agli 0,124 mg/kg dei 18 mesi. I dati trovati sono in linea con altri studi che riportano la presenza di una correlazione tra l'età e l'accumulo di metalli pesanti (cadmio, piombo, mercurio e arsenico) nei muscoli e negli organi interni degli animali. In Polonia (Rudy, 2009) nel muscolo di bovini di età compresa tra 18 e 24 mesi la concentrazione di cadmio è 0,009 mg/kg, per aumentare a 0,013 mg/kg nei soggetti dai 24 mesi ai 6 anni; lo studio comprende anche soggetti anziani, oltre i 12 anni di età, in cui la quantità di metallo sale a 0,021 mg/kg. Discorso analogo per il fegato: da un valore di 0,123 mg/kg in animali di 18-24 mesi ad un valore di 0,141 mg/kg in soggetti di 2-6 anni fino a raddoppiare col valore di 0,278 mg/kg oltre i 12 anni di età.

In Belgio, Waegeneers e colleghi (2009b), basandosi sui dati raccolti dallo stesso autore e descritti in precedenza, hanno investigato la relazione tra l'età e la concentrazione di cadmio. Mentre nel muscolo non è stata riscontrata alcuna correlazione positiva, nel rene questa è evidente, tanto che l'autore stabilisce a 4 anni e 10 mesi l'età soglia oltre la quale la concentrazione renale di cadmio supera

il livello massimo stabilito a livello europeo; a 30 mesi, il 10% dei soggetti supera la soglia di 1,0 mg/kg, mentre a 24 mesi la percentuale scende sotto il 5% in aree non inquinate. L'autore sottolinea che in soggetti allevati vicino ad industrie metallurgiche il 9-30% dei bovini macellati prima dei 12 mesi presentano concentrazioni superiori ai limiti europei.

Un confronto dei campioni giordani per allevamento (indicato col nome dell'allevatore) indica che, per la matrice fegato, la media è inferiore a 0,030 mg/kg, eccetto nei bovini di Alawneh (0,045 mg/kg), Qadduomi (0,037 mg/kg) e Samara (0,079 mg/kg); per il rene, i capi di Abu Saim presentano la media maggiore (0,082 mg/kg).

PIOMBO

Negli ultimi decenni si è registrata una diminuzione dei livelli di piombo nell'ambiente soprattutto grazie all'emanazione, in molti Paesi, di leggi volte a ridurre le emissioni. Anche negli alimenti la concentrazione di questo metallo pesante ha subito una riduzione e, ad oggi, le frattaglie e i molluschi sono i prodotti che ne contengono maggiori quantità (Andrée et al., 2010; EFSA, 2010). Tutto questo comporta notevoli vantaggi, soprattutto per quanto riguarda la salute dell'uomo, essendo il piombo un metallo molto tossico, come descritto in precedenza. Per quanto riguarda la sicurezza degli alimenti, a livello europeo il Regolamento (CE) n. 1881/2006 e le sue modifiche fissano il livello massimo (LM) di piombo nella carne a 0,10 mg/kg e nelle frattaglie a 0,50 mg/kg.

L'EFSA ha condotto uno studio sulla concentrazione di piombo nella dieta per gli anni 2003-2008, confrontando quasi 140000 campioni provenienti da 14 Stati Membri e dalla Norvegia, di cui il 23% erano aliquote di carne e il 20% di prodotti a base di carne, comprese le frattaglie (EFSA, 2010). Tale analisi suddivide gli alimenti in categorie: in quella denominata "carne, prodotti a base di carne e frattaglie" si può vedere che la concentrazione media di piombo nel muscolo bovino, ovino e caprino è di 0,0131-0,030 mg/kg di peso fresco, con valore massimo di 0,80 mg/kg e con il 77,1% dei campioni al di sotto del LOD.

Nei campioni di fegato di ruminanti, maiale, pollo e cavallo, di cui il 64% è inferiore al LOD, la media è di 0,0535-0,077 mg/kg, fino ad un picco di 197 mg/kg. Nel rene delle specie sopra citate, il 51,5% delle aliquote sono al di sotto del LOD, il valore medio è 0,131 mg/kg e quello massimo 289 mg/kg. Si può concludere che, pur essendo la media dei campioni di rene e di fegato inferiore al limite massimo della normativa, alcuni casi superano anche di 300-500 volte tale valore. L'EFSA segnala che i campioni che superano la concentrazione di 1,0 mg/kg di piombo sono soprattutto la carne e gli organi di selvaggina (valore massimo segnalato in un cinghiale di 867 mg/kg), le alghe e le frattaglie delle specie domestiche.

Questo studio si presta a un confronto coi dati ottenuti dai campioni provenienti dalla Giordania. Nel *muscolo*, dea 29 campioni analizzati 24 (l'82,8%) sono risultati al di sotto del LOD, mentre i 5 campioni positivi (i numeri 29,30, 142, 151 e 197) presentano una media di 0,006 mg/kg, con range tra 0,005 mg/kg (29, 142 e 197) e 0,010 mg/kg (30). Il numero 30 è una femmina di 18 mesi di età come il numero 29, il 142 e il 151.

Nei campioni di *fegato*, soltanto 2 non sono rilevabili, cioè il 6,7%; il valore medio è di 0,029 mg/kg, con range compreso tra lo 0,006 mg/kg del numero 197 e lo 0,217 mg/kg del numero 54, valore che si discosta notevolmente dalla media, pur non superando il limite massimo stabilito dalla normativa. Il bovino 54 appartiene all'allevamento di Saadi (media di 0,083 mg/kg) insieme al numero 58 (0,040 mg/kg), al 75 (0,007 mg/kg) e al 76 (0,067 mg/kg, la seconda concentrazione epatica più alta); in tutti questi casi, però, né il valore muscolare di piombo né quello renale sono rivelabili. Tutti gli altri campioni epatici contengono meno di 0,050 mg/kg di piombo.

Dei 13 campioni di *rene*, in 7 il piombo è presente in concentrazioni rivelabili, mentre il 46% è al di sotto del LOD. La concentrazione media di piombo è risultata 0,024 mg/kg, con il valore massimo di 0,041 mg/kg del numero 5 (che presenta una concentrazione renale abbastanza alta anche di cadmio) e il valore minimo di 0,008 mg/kg del numero 67. In questo caso, a parte il numero 93, tutti gli altri presentano concentrazioni maggiori di 0,020 mg/kg.

In base a questi dati, si può affermare che i risultati ottenuti non superano in alcun

caso il limite stabilito a livello europeo e sono tutti al di sotto dei corrispondenti valori ritrovati dall'EFSA. Come già visto in precedenza per il cadmio, anche per il piombo le concentrazioni sono maggiori negli organi interni rispetto al muscolo; quest'affermazione è confermata anche dalla letteratura, come si può osservare nella tabella 35. I dati giordani sono in linea con quelli registrati in Galizia (López-Alonso *et al.*, 2000); i valori trovati sono però inferiori, anche di molto, rispetto a quelli registrati in Egitto (Abou-Arab, 2001), Iraq (Al-Nahemi, 2011), Marocco (Sedki *et al.*, 2003), Nigeria (Ihedioha and Okoye, 2012), Palestina (Swaileh *et al.*, 2009), Pakistan (Mariam *et al.*, 2004) e Slovacchia (Koréneková *et al.*, 2002). Per la matrice muscolo, i risultati sono più bassi di quelli segnalati in Arabia Saudita (Alturiqi and Albedair, 2012), Brasile (Batista *et al.*, 2012) e Romania (Ghita *et al.*, 2009), mentre i valori per fegato e rene sono inferiori a quelli registrati in Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a) e Svezia (Johrem *et al.*, 1991). In Giordania sono stati trovati valori medi superiori in tutte le matrici alla Slovenia (Doganoc, 1996) e nel muscolo rispetto a Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a) e Svezia (Johrem *et al.*, 1991).

Tabella 35: dati dalla letteratura sui livelli di piombo in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
<0,005	0,047	0,097	Svezia	1991	Johrem <i>et al.</i>
0,005	0,10	0,14	Slovenia	1996	Doganoc
0,0064 (a)	0,035 (a)	0,039 (a)	Galizia (Spagna)	2000	López- Alonso <i>et al.</i>
0,06 \pm 0,03 (b) 0,09 \pm 0,04 (c)	0,12 \pm 0,05 (b) 0,57 \pm 0,24 (c)	0,22 \pm 0,08 (b) 0,716 \pm 0,3 (c)	Egitto	2001	Abou-Arab
0,386-0,671 (d)	0,544-1,072 (d)	-	Slovacchia	2002	Koréneková <i>et al.</i>
0,6	5,1	10,3	Marocco	2003	Sedki <i>et al.</i>
2,19 \pm 0,28	2,18 \pm 0,38	2,02 \pm 0,44	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
0,018-0,020 (e)	-	-	Romania	2009	Ghita <i>et al.</i>
0,51	3,28	4,7	Palestina	2009	Swaileh <i>et al.</i>
0,003 \pm 0,003 (f) 0,004 \pm 0,003 (g)	0,082 \pm 0,126 (f) 0,194 \pm 0,181 (g)	0,212 \pm 0,209 (f) 0,373 \pm 0,318 (g)	Belgio	2009a	Waegeneers <i>et al.</i>
0,071	0,472	0,398	Iraq	2011	Al-Nahemi
5,85-7,93 (h)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
0,0093 \pm 0,008	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
0,09 \pm 0,16	0,26 \pm 0,25	0,13 \pm 0,07	Nigeria	2012	Ihedioha and Okoye
0,006 \pm 0,002	0,029 \pm 0,04	0,024 \pm 0,011	Giordania	2013	questo studio

(a) = lo studio divide i risultati tra bovini da carne per sesso; si riporta la media dei maschi.

(b) = bovini allevati in aree rurali;

- (c) = bovini allevati in aree industriali.
- (d) = si riporta il range delle medie registrate in tre regioni del Paese.
- (e) = si riporta il range delle medie registrate in tre diversi tagli di carne.
- (f) = bovini provenienti da aree non contaminate;
- (g) = bovini provenienti da aree contaminate.
- (h) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

Le concentrazioni di piombo dei campioni giordani possono essere confrontate tra loro anche in base all'età dei soggetti. Mentre per il muscolo non è possibile fare un confronto, poiché solo i soggetti di 18 mesi presentano dei valori rilevabili e una media di 0,007 mg/kg, per la matrice fegato si può osservare come da 0,021-0,025 mg/kg, media rispettivamente dei soggetti di 12 mesi e di 8 mesi, si passi a 0,040 a 18 mesi. Nei campioni di rene a disposizione questo trend non si ripete, poiché a 12 mesi la concentrazione è di 0,027 mg/kg, ma a 18 mesi è di 0,016 mg/kg.

Secondo alcuni studi dovrebbe esserci una correlazione positiva tra l'età degli animali e l'accumulo di piombo in muscolo e organi interni, ma nel nostro caso non è così chiara, forse per il numero ridotto di campioni. Anche in Polonia (Rudy, 2009) non c'è molta differenza tra la concentrazione media nel muscolo di bovini di età compresa tra 18 e 24 mesi, pari a 0,051 mg/kg, e quella dei soggetti di 2-6 anni, pari a 0,054 mg/kg; superiore è invece il valore medio dei soggetti sopra i 12 anni, pari a 0,075 mg/kg. Discorso analogo per il fegato, dove da un valore di 0,125 mg/kg in animali di 18-24 mesi si passa ad un valore di 0,129 mg/kg in soggetti di 2-6 anni e a 0,278 mg/kg in bovini con più di 12 anni. López-Alonso e colleghi (2000) dimostrano che la concentrazione del piombo nei bovini spagnoli della Galizia è significativamente maggiore nel fegato e nel rene rispetto al muscolo. Dato che in questo studio, che comprende sia bovini da latte sia bovini da carne, le vacche presentano concentrazioni maggiori rispetto alle femmine da carne, gli autori affermano che c'è una correlazione positiva tra età

ed accumulo di piombo.

Per quanto riguarda i nostri campioni, il confronto tra i diversi allevamenti evidenzia che la media per la matrice fegato di 0,083 mg/kg dell'allevatore Saadi è la più alta e maggiore rispetto alla media totale dell'organo. Anche l'allevamento di Allawneh presenta, per la stessa matrice, una concentrazione di 0,035 mg/kg, superiore alla media; gli altri allevamenti presentano invece valori inferiori a 0,029 mg/kg. Questo potrebbe essere dovuto alla diversa localizzazione degli allevamenti e al grado di contaminazione da parte del piombo delle aree geografiche di provenienza.

MERCURIO

Il mercurio è un metallo pesante e tossico che, come già descritto in precedenza, si accumula lungo la catena alimentare e la cui fonte principale di esposizione per l'uomo è rappresentata dal consumo di pesce. Nella carne e negli altri alimenti di origine animale solitamente le sue concentrazioni sono minime, tanto che a livello europeo il Regolamento (CE) n. 1881/2006 stabilisce i tenori massimi di mercurio soltanto nei prodotti della pesca.

L'EFSA ha condotto un'analisi di quasi 60000 dati ricevuti da 20 Paesi, concludendo che, a parte il pesce, la concentrazione di mercurio negli alimenti è bassa, nel range di 0,0001-0,050 mg/kg, con l'80% dei campioni al di sotto del LOD (EFSA, 2012a).

I campioni provenienti dalla Giordania seguono questo trend, poiché per il **muscolo** tutti i 29 campioni sono risultati al di sotto del LOD, per il fegato 28 su 30 e per il rene 12 su 13. Per la matrice **fegato** solo il bovino numero 3 e il numero 83 sono positivi, con valori di 0,022 mg/kg e 0,017 mg/kg rispettivamente; l'unica loro caratteristica in comune è l'età al momento della macellazione, pari a 12 mesi. Il bovino numero 3 presenta anche la concentrazione più alta riscontrata nel **rene**, cioè 0,111 mg/kg. Anche se il valore medio per la matrice fegato potrebbe non essere significativo, così come l'unico campione di

rene, è interessante confrontare i dati trovati con la letteratura (tabella 36). Il fatto che tutti i campioni di muscolo siano inferiori a 0,005 mg/kg è in linea coi dati trovati in Svezia (Johrem *et al.*, 1991) e Spagna (Blanco-Penedo *et al.*, 2010; López-Alonso *et al.*, 2003). I dati raccolti in Pakistan (Mariam *et al.*, 2004) sono ancora una volta di gran lunga superiori alla media internazionale.

Uno studio condotto da López-Alonso e colleghi (2003) confronta le concentrazioni di mercurio in bovini allevati in 2 regioni del Nord-Ovest della Spagna, la Galizia, più rurale, e le Asturie, più industrializzate. Mentre i campioni di muscolo e fegato per l'80-96% hanno valori al di sotto del LOD, il rene risulta essere l'unico tessuto che ne contiene una quota rivelabile nel 62-87% dei campioni. Lo studio dimostra che le concentrazioni renali di metallo sono più alte in Galizia che nelle Asturie, al contrario di ciò che si ci potesse aspettare da un rapporto tra quantità di mercurio e grado di industrializzazione dell'area. Altra caratteristica del mercurio, il suo accumulo non è correlato con l'età nei bovini, probabilmente perché, avendo un'emivita di 40 giorni, anche se il soggetto ingerisce cronicamente una piccola quantità di metallo, esso viene eliminato prima di riuscire ad accumularsi.

Tabella 36: dati dalla letteratura sui livelli di mercurio in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
-	0,07-0,25 (a)	0,07-0,08 (a)	Canada	1985	Konsrud <i>et al.</i>
0,005	0,006	0,010	Svezia	1991	Johrem <i>et al.</i>
0,00043 (b) 0,00039 (c)	0,00085 (b) 0,00077 (c)	0,0122 (b) 0,0034 (c)	NW Spagna	2003	López-Alonso <i>et al.</i>
62,39 \pm 23,76	31,47 \pm 12,24	50,65 \pm 13,42	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
0,001 (d)	-	-	Galizia (Spagna)	2010	Blanco-Penedo <i>et al.</i>
0,032-0,087 (e)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
0,0119 \pm 0,010	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
<0,005	0,019 \pm 0,003	0,111 (f)	Giordania	2013	questo studio

(a) = range dei valori positivi trovati.

(b) = media in Galizia

(c) = media nelle Asturie

(d) = studio condotto in aziende intensive, tradizionali e biologiche di diversi distretti della Galizia; si riporta il range dei valori medi trovati.

(e) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

(f) = unico valore rivelabile

ARSENICO

L'arsenico è un metalloide tossico per l'uomo e per gli animali, che lo assumono principalmente attraverso la dieta; gli alimenti che lo contengono in maggiori concentrazioni sono i prodotti della pesca, mentre la carne e le frattaglie solitamente ne contengono di meno. Come detto in precedenza, è opportuno precisare che quando vengono effettuate delle analisi viene quantificato l'arsenico presente senza distinzione tra la forma inorganica (l'unica effettivamente tossica) e quella organica; per questo motivo l'EFSA preferisce indicare il valore ottenuto con il termine di arsenico totale (EFSA, 2009a).

Nella normativa europea l'arsenico è considerato un contaminante, ma non sono stabiliti limiti massimi della sua concentrazione nei diversi alimenti. Nel 2008 l'EFSA ha condotto uno studio più di 100000 campioni provenienti da 14 Stati Membri e dalla Norvegia per valutare la presenza dell'arsenico totale in diverse categorie di alimenti e i potenziali pericoli per la salute ad essa connessi (EFSA, 2009a). Nella carne bovina, ovina e caprina il 77% dei campioni è risultata al di sotto del limite di rivelazione del metodo, mentre i rimanenti presentano una media di 0,0039-0,0137 mg/kg e un valore massimo di 0,2 mg/kg. Per la matrice fegato, che comprende quello di bovini, pecore, maiali, polli e cavalli, l'80% dei campioni è inferiore al LOD, con una media di 0,0036-0,0129 mg/kg e un valore massimo di 0,4 mg/kg. Nel rene delle stesse specie i campioni al di sotto del LOD sono il 76%, la media è di 0,006-0,0177 mg/kg e il picco massimo è di 0,963 mg/kg.

Nei campioni di *muscolo* prelevati in Giordania, l'89% (26 su 29) è al di sotto del LOD e la concentrazione media dei tre campioni positivi (i bovini numero 1, 30 e 84) è 0,043 mg/kg. Quest'ultima è maggiore di quella segnalata dall'EFSA: il numero 30, femmina di 18 mesi che, sempre per la matrice muscolo, presenta concentrazioni di cadmio e piombo al di sopra della media, ha il valore di arsenico più alto, pari a 0,114 mg/kg.

L'80% dei campioni di *fegato* giordani presenta valori inferiori al LOD, mentre la concentrazione media è di 0,007 mg/kg, con un range ridotto, tra 0,005 mg/kg e

0,009 mg/kg. Tale valore è in linea con quello riscontrato dall'EFSA, tenendo presente che quest'ultima considera nella stessa categoria anche il fegato di altre specie domestiche.

Nei 3 campioni di *rene* positivi la media è di 0,013 mg/kg e il valore massimo di 0,026 mg/kg appartiene al numero 4. La media giordana in questo caso è vicina al limite superiore della media europea, ma non la supera; il valore massimo riscontrato è comunque molto inferiore a quello segnalato dall'EFSA.

Nei campioni provenienti dalla Giordania, la concentrazione di arsenico nel muscolo supera quella del cadmio e del piombo, mentre una tendenza opposta si può osservare per fegato e rene; tale dato è confermato anche da Waegeneers e colleghi (2009a). Un'alta percentuale di campioni di muscolo al di sotto del LOD è registrata in altri studi (Blanco-Penedo, 2010; López-Alonso *et al.*, 2000; Waegeneers *et al.*, 2009a). Dai risultati giordani si vede come la concentrazione di arsenico nel muscolo sia molto più elevata rispetto agli organi, mentre in altri studi si afferma che il livello di contaminazione di fegato e rene è maggiore (López-Alonso *et al.*, 2000; Waegeneers *et al.*, 2009a).

I livelli di arsenico nei campioni di muscolo giordani sono maggiori rispetto a tutti quelli trovati in letteratura (tabella 37), ad eccezione di quelli registrati in Pakistan (Mariam *et al.*, 2004), dove le alte concentrazioni in tutte le matrici sono dovute, secondo l'autore, all'elevata contaminazione ambientale. I valori di arsenico nel fegato e nel rene giordani sono in linea con quelli riscontrati in Spagna (López-Alonso *et al.*, 2000) e Svezia (Johrem *et al.*, 1991), mentre sono inferiori a quelli canadesi (Konsrud *et al.*, 1985) e belgi (Waegeneers *et al.*, 2009a).

Tabella 37: dati dalla letteratura sui livelli di arsenico in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
-	0,07-0,15 (a)	0,07-0,11 (a)	Canada	1985	Konsrud <i>et al.</i>
<0,015	<0,015	<0,015	Svezia	1991	Johrem <i>et al.</i>
0,004 (b)	0,009 (b)	0,0097 (b)	Galizia (Spagna)	2000	López-Alonso <i>et al.</i>
46,46 \pm 3,41	52,44 \pm 5,22	46,99 \pm 6,76	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
0,023 \pm 0,024 (c)	0,017 \pm 0,011 (c)	0,043 \pm 0,023 (c)	Belgio	2009a	Waegeneers <i>et al.</i>
0,017 \pm 0,009 (d)	0,037 \pm 0,025 (d)	0,093 \pm 0,078 (d)			
0,0068-0,0069 (e)	-	-			
0,021 \pm 0,016	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
0,043 \pm 0,06	0,007 \pm 0,001	0,013 \pm 0,01	Giordania	2013	questo studio

(a) = range dei valori positivi trovati.

(b) = lo studio divide i risultati tra bovini da carne per sesso; si riporta la media dei maschi.

(c) = bovini provenienti da aree non contaminate;

(d) = bovini provenienti da aree contaminate.

(e) = studio condotto in aziende intensive, tradizionali e biologiche di diversi distretti della Galizia; si riporta il range dei valori medi trovati.

In base ai diversi gruppi di età dei bovini giordani, a causa del numero limitato di campioni positivi non è possibile fare un confronto per le matrici muscolo e rene, mentre per il fegato le concentrazioni a 12 mesi e a 18 mesi sono molto simili, rispettivamente 0,008 mg/kg e 0,006 mg/kg. Per l'arsenico, comunque, non è dimostrata la presenza di una correlazione tra età dell'animale e il suo accumulo negli organi (López-Alonso *et al.*, 2000). Per il numero limitato di campioni positivi, non è possibile neppure fare un confronto delle diverse concentrazioni di arsenico secondo allevamento.

ALLUMINIO

L'alluminio è un metallo che l'uomo assume quotidianamente in basse concentrazioni attraverso la dieta; come già descritto in precedenza, i meccanismi attraverso cui esplica la sua tossicità non sono ancora stati del tutto chiariti, così come gli effetti negativi che ha sulla salute umana. Tra gli alimenti che presentano le maggiori concentrazioni di alluminio non è compresa la carne; dati dell'EFSA evidenziano un range di 5-10 mg di alluminio per kg di peso fresco soltanto nelle salsicce e nelle frattaglie, senza specificare la specie di provenienza (EFSA, 2008a).

Dei campioni di *muscolo* giordani, il 79% (23 su 29 totali) è al di sotto del limite di rivelazione; il numero 196 presenta la concentrazione più bassa, 0,020 mg/kg, gli altri valori sono compresi tra 0,156 mg/kg (numero 84) e 0,356 (numero 151), ma la quota maggiore è di 12,834 mg/kg del bovino numero 30, che si discosta in maniera evidente dalla media di 2,303 mg/kg. Quest'ultimo soggetto è una femmina di 18 mesi già citata per le concentrazioni elevate di altri metalli pesanti, quali quella muscolare ed epatica di arsenico e quella di cadmio nel fegato. Per tutti i campioni positivi, eccetto il numero 84, i valori epatici di alluminio sono inferiori al LOD. Per la matrice *fegato*, soltanto 2 campioni presentano concentrazioni rivelabili di metallo, il numero 212 (0,168 mg/kg) e il numero 84 (1,039 mg/kg). Per il *rene* nessun campione presenta valori superiori al LOD.

Dividendo i risultati in base all'età, i bovini interessati hanno tutti 12 o 18 mesi; visto il ridotto numero di risultati positivi, non è possibile fare un confronto adeguato in base all'allevamento di provenienza.

In letteratura, pochi studi riferiscono la concentrazione di alluminio nei tessuti di bovino: in Svezia (Johrem *et al.*, 1989) il livello medio (su 5 campioni) nel muscolo è di 0,050 mg/kg, nel fegato di 0,068 (con valore massimo di 0,163 mg/kg) e nel rene di 0,063 mg/kg (con valore massimo 0,112 mg/kg). Negli Stati Uniti la concentrazione media riportata nella carne di manzo è di 0,200 mg/kg (Greger *et al.*, 1985), in linea con la media giordana se si esclude il risultato più alto.

Un altro studio (Valdivia *et al.*, 1978) conclude che la concentrazione di alluminio in tutti i tessuti tende ad aumentare quando cresce la sua assunzione con la dieta, ma senza seguire un trend statisticamente significativo. I livelli di alluminio trovati dall'autore nei tessuti sono maggiori nel fegato rispetto al rene e al muscolo; nei campioni provenienti dalla Giordania questa affermazione non trova invece riscontro.

RAME

Il rame è un microelemento essenziale per gli organismi viventi, che devono assumerlo attraverso la dieta; se ingerito in dosi eccessive, però, risulta tossico. È importante sottolineare che le frattaglie (in particolare fegato e rene) sono tra gli alimenti che ne contengono in maggiori concentrazioni.

In tutte le matrici provenienti dalla Giordania è presente una concentrazione rivelabile di rame a causa della sua essenzialità; nei campioni di *muscolo*, il valore medio è di 2,889 mg/kg, con quote che oscillano da 0,526 mg/kg a 6,759 mg/kg. Nei campioni di *fegato* la concentrazione media è maggiore, 29,142 mg/kg, con un range molto ampio, da 0,791 mg/kg del bovino numero 64 a 164,064 mg/kg del numero 142. Anche per la matrice *rene* il range è ampio, da 3,860 mg/kg a 57,513 mg/kg.

In generale, i ruminanti hanno un'elevata capacità di accumulare il rame nel fegato, come si può osservare anche nei dati giordani, dove la concentrazione di metallo in quest'organo è nettamente superiore alle altre matrici. Essendo un elemento essenziale, è difficile definire dei limiti al di sotto dei quali parlare di carenza e sopra i quali parlare di intossicazione. Puls (1994) definisce una deficienza di rame lieve quando la concentrazione epatica di metallo è inferiore a 10 mg/kg, grave quando è inferiore a 5 mg/kg; López-Alonso e colleghi (2000) riferiscono in uno studio, livelli minori di 1,5 mg/kg. Nei campioni di fegato giordani, il 26% presenta valori inferiori a 10 mg/kg e soltanto 2 campioni sono al di sotto di 1,5 mg/kg.

Anche definire un livello massimo è difficile: l'induzione sperimentale di un'intossicazione cronica da rame nei bovini ha dimostrato che i segni clinici

compaiono per concentrazioni epatiche di 69-194 mg/kg (Gummow, 1996). Nel nostro caso, soltanto due bovini presentano concentrazioni così elevate, il numero 152 (73,357 mg/kg) e il numero 142 (164,064 mg/kg).

Nel rene, i livelli di rame sono elevati soltanto in bovini che ingeriscono una dose ingente di metallo, ma l'organo non è un indicatore adeguato di accumulo, poiché alte concentrazioni a questo livello non corrispondono ad alti valori nel fegato (López-Alonso *et al.*, 2000). Anche nel nostro caso, infatti, il bovino 93, che presenta 57,513 mg/kg nel rene, ha soltanto 4,579 mg/kg nel fegato. Il limite superiore per la concentrazione renale normale di rame è 15 mg/kg (López-Alonso *et al.*, 2000); soltanto 2 campioni giordani superano tale soglia, il numero 93 e il numero 67 (15,581 mg/kg).

I valori medi d'organo trovati in Giordania (tabella 38) sono in linea, per quanto riguarda muscolo e rene, con quelli palestinesi (Swaileh *et al.*, 2009) e soltanto per la matrice muscolo con quelli egiziani (Abou-Arab, 2001). La concentrazione media epatica di rame riscontrata in Giordania risulta inferiore a tutte quelle trovate in letteratura; soltanto in Canada (Konsrud *et al.*, 1985) la media è leggermente inferiore. Anche per la matrice muscolo, il valore medio è basso rispetto a quello trovato in Arabia Saudita (Alturiqi and Albedair, 2012), Brasile (Batista *et al.*, 2012), Marocco (Sedki *et al.*, 2003) e Slovacchia (Koréneková *et al.*, 2002); è invece superiore ai dati spagnoli (López-Alonso *et al.*, 2000), svedesi (Johrem *et al.*, 1989) e belgi (Waegeneers *et al.*, 2009a). Il valore medio renale è invece maggiore, anche di 2 volte, rispetto a quelli riportati dagli altri studi; soltanto in Marocco le concentrazioni sono superiori.

Tabella 38: dati dalla letteratura sui livelli di rame in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
-	27,8 \pm 26,7	5,4 \pm 2,5	Canada	1985	Konsrud <i>et al.</i>
-	-	3,7	Olanda	1989	Ellen <i>et al.</i>
0,87 \pm 0,12	39,0 \pm 27	3,7 \pm 0,59	Svezia	1989	Johrem <i>et al.</i>
0,637 (a)	50,0 (a)	4,27 (a)	Galizia (Spagna)	2000	López- Alonso <i>et al.</i>
2,8 \pm 1,1 (b) 3,1 \pm 1,2 (c)	86,4 \pm 24,3 (b) 87,4 \pm 23,2 (c)	3,2 \pm 1,1 (b) 4,0 \pm 1,5 (c)	Egitto	2001	Abou-Arab
4,290-6,214 (d)	27,780-94,0 (d)	-	Slovacchia	2002	Koréneková <i>et al.</i>
4,4	112	33,2	Marocco	2003	Sedki <i>et al.</i>
81,51 \pm 15,02	93,24 \pm 15,89	5,42 \pm 2,01	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
2,71	217,90	9,97	Palestina	2009	Swaileh <i>et al.</i>
1,6 \pm 0,5 (e) 2,2 \pm 0,5 (f)	80,1 \pm 66,7 (e) 92,7 \pm 71,8 (f)	4,97 \pm 1,67 (e) 5,31 \pm 1,26 (f)	Belgio	2009a	Waegeneers <i>et al.</i>
9,59-13,10 (g)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
4,5 \pm 1,7	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
2,889 \pm 1,98	29,142 \pm 31,3	10,22 \pm 14,22	Giordania	2013	questo studio

- (a) = lo studio divide i risultati tra bovini da carne per sesso; si riporta la media dei maschi.
 (b) = bovini allevati in aree rurali;
 (c) = bovini allevati in aree industriali.
 (d) = si riporta il range delle medie registrate in tre regioni del Paese.
 (e) = bovini provenienti da aree non contaminate;
 (f) = bovini provenienti da aree contaminate.
 (g) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

Nei campioni provenienti dalla Giordania non sembra esserci una correlazione tra l'accumulo di rame nei tessuti e l'età del soggetto; lo stesso riscontro è stato riportato da López-Alonso *et al.* (2000). Proprio in questo studio si è visto che la concentrazione di rame è addirittura minore nel fegato delle vacche rispetto alle manze, come si evince anche dai dati giordani, dove i soggetti di 24 mesi (numero 64) e di 30 mesi (numero 46) presentano valori, sia nel muscolo sia nel fegato, inferiori a 1,3 mg/kg. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che esiste una correlazione di tipo antagonistico tra cadmio, rame e zinco negli animali, poiché i tre metalli competono per gli stessi siti di legame della metallotioneina, che ne permette l'immagazzinamento nel fegato: l'accumulo epatico e renale di cadmio dei soggetti più anziani può causare l'allontanamento del rame da questi organi, dove la metallotioneina è presente in maggiori concentrazioni (López-Alonso *et al.*, 2000). Tale rapporto Cd/Cu è stato segnalato anche in Marocco (Sedki *et al.*, 2003) e in Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a), dove si è anche ipotizzato che il cadmio deprima i livelli sierici di ceruloplasmina, la proteina che trasporta il rame, predisponendo alla carenza dello stesso. Nei campioni giordani, la correlazione negativa tra cadmio e rame epatico è presente, per esempio, nel bovino 30, dove a 0,111 mg/kg di Cd corrispondono 2,675 mg/kg di rame, ma non nel numero 83, dove a 0,071 mg/kg di Cd (seconda concentrazione più alta) corrisponde un valore di 37,565 mg/kg di Cu, al di sopra della media. Per quanto riguarda gli allevamenti giordani, i bovini di Salaymeh presentano un valore epatico medio di 58,765 mg/kg, il doppio della media d'organo; bisogna comunque precisare che a questo allevatore appartiene il bovino numero 142, che ha il valore massimo assoluto di rame nel fegato. L'allevatore Abu Saim presenta capi con concentrazioni medie elevate sia nel muscolo (3,038 mg/kg), sia nel rene (18,053 mg/kg) rispetto alle medie d'organo.

FERRO

Il ferro è un elemento essenziale per tutti gli organismi viventi e gli alimenti che ne sono per eccellenza ricchi sono la carne rossa e le frattaglie in genere. È difficile definire un range di riferimento per le concentrazioni di ferro negli organi animali; a questo proposito è interessante uno studio condotto in Cile (Valenzuela *et al.*, 2009), dove in due vitelli maschi di razza Holstein di 4 mesi è stato iniettato in vena l'isotopo ^{55}Fe per 2 mesi. Gli animali sono stati poi sacrificati e si è valutata la concentrazione di metallo in 12 diversi tagli di carne e negli organi interni. Il range ottenuto per il muscolo varia da 10 mg/kg a 20 mg/kg, di cui il 65% è ferro eme, la sua forma più disponibile per l'uomo, che a questo livello si trova nella mioglobina. Tra gli organi, la milza e il polmone contengono le concentrazioni più elevate di ferro eme, rispettivamente il 72,8% e il 53,8% del metallo totale, poiché la prima è sede di emolisi, il secondo è ricco di vasi. Il fegato è l'organo che presenta la maggiore concentrazione di ferro totale, 60 mg/kg in media, seguito dal rene con 30 mg/kg; in essi il metallo si trova principalmente legato alla ferritina (soltanto il 13,6% è ferro eme), tramite la quale viene immagazzinato.

Nei campioni di **muscolo** provenienti dalla Giordania, il valore medio di ferro totale risulta superiore ai dati riportati in precedenza, 25,887 mg/kg, con un range tra 10,56 mg/kg (bovino numero 152) e 49,27 mg/kg (numero 92). La media per la matrice **fegato** è 43,016 mg/kg, minore di quella segnalata precedentemente, con un picco di 198,12 mg/kg nel bovino 196. Quest'ultimo, a fronte di un livello muscolare inferiore alla media (22,97 mg/kg), presenta invece un livello renale di 47,82 mg/kg, superiore ad essa; nei campioni di **rene**, infatti, la media è di 41,214 mg/kg, valore molto vicino a quello epatico e superiore a quello segnalato da Valenzuela e colleghi. Per questa matrice il range va da 23,22 mg/kg (bovino numero 67) a 51,08 mg/kg (numero 212).

Rispetto ad altri valori riportati in letteratura (tabella 39), i livelli di ferro trovati in Giordania sono più bassi di quelli riscontrati in Arabia Saudita (Alturiqi and Albedair, 2012), Brasile (Batista *et al.*, 2012), Egitto (Abou-Arab, 2001) e

Slovacchia (Koréneková *et al.*,2002); risultano maggiori soltanto a quelli descritti in Cile (Olivares *et al.*, 2004; Valenzuela *et al.*, 2009).

Tabella 39: dati dalla letteratura sui livelli di ferro in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANN O	STUDIO
66,3 \pm 24,1 (a) 76,4 \pm 22,6 (b)	116,4 \pm 41,2(a) 114,1 \pm 36 (b)	56,4 \pm 13,1 (a) 68,1 \pm 24,1 (b)	Egitto	2001	Abou-Arab
49,133-51,80 (c)	125,226- 146,825 (c)	-	Slovacchi a	2002	Korénekóv á <i>et al.</i>
10-16 (d)	-	-	Cile	2004	Olivares <i>et al.</i>
68,72-153,89 (e)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
72,00 \pm 33,0	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
25,887 \pm 11,1 9	43,016 \pm 31,5 6	41,214 \pm 7,1 2	Giordania	2013	questo studio

(g) = bovini allevati in aree rurali;

(h) = bovini allevati in aree industriali.

(i) = si riporta il range delle medie registrate in tre diverse regioni del Paese.

(j) = si riporta il range delle medie registrate in diversi tagli di carne.

(k) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

In questo studio non è dimostrabile la presenza di una correlazione tra età e bioaccumulo di ferro nell'organismo, poiché le concentrazioni medie delle diverse matrici sono simili anche in gruppi di età diverse. Per esempio, nel fegato la media più alta appartiene alla categoria di 8 mesi di età, con 56,735 mg/kg, e a quella di 24 mesi, con 53,91 mg/kg, mentre nelle altre oscilla tra 29,11 mg/kg (a 30 mesi) e 47,474 mg/kg (a 12 mesi). Anche nella divisione secondo allevamento non sono da segnalare differenze significative tra le medie calcolate, eccetto per i campioni di fegato di Al Khalili, a cui appartengono sia il numero 196 (198,12 mg/kg) che il 197 (48,50 mg/kg), per una media di 123,31 mg/kg, decisamente più alta di quella totale; questi soggetti presentano anche una media renale (46,06 mg/kg) superiore a quella d'organo.

ZINCO

Lo zinco è un microelemento essenziale, secondo per abbondanza nel corpo umano, che gli esseri viventi devono assumere dall'esterno. Tra gli alimenti, la carne contiene concentrazioni abbastanza elevate di zinco, rappresentandone una fonte importante nella dieta: infatti, al contrario di altri metalli, il muscolo è sede di accumulo di questo metallo, presentando concentrazioni molto simili a quelle epatiche e superiori rispetto a quelle renali (López-Alonso *et al.*, 2000). Questo trend è visibile anche nei campioni prelevati in Giordania, come descritto in seguito.

Per la matrice **muscolo** la media riscontrata è 44,323 mg/kg, con range da 22,129 mg/kg (bovino numero 92) a 73,566 mg/kg (bovino numero 137). Alturiqi and Albedair (2012) riportano che la concentrazione normale di zinco nella carne è di 35-45 mg/kg; la media dei campioni giordani rientra in questo range, ma il 58% di essi lo supera e il 31% è invece inferiore ad esso.

Nei campioni di **fegato** della Giordania la media è di 35,347 mg/kg, con valori che vanno da 19,434 mg/kg a 82,803 mg/kg, mentre nel **rene** scende a 22,703 mg/kg,

con concentrazione massima di 36,594 mg/kg.

Si comincia a parlare di intossicazione da zinco quando la sua concentrazione nel fegato di bovino è di 600 mg/kg e nel muscolo di 135-175 mg/kg (López-Alonso *et al.*, 2000); i campioni giordani sono tutti abbondantemente al di sotto di tale limite. Basse concentrazioni di zinco nei campioni (il livello minimo del suo range normale non viene però riportato in bibliografia) possono essere attribuite a bassi livelli dello stesso nel terreno, con conseguente minore sua concentrazione nei cereali e nel foraggio ingeriti dagli animali. Tale situazione, senza le opportune integrazioni dell'alimento, predispone i bovini alla carenza (Mariam *et al.*, 2004). Nella tabella 40 sono riportati alcuni confronti con la letteratura: le concentrazioni dei campioni giordani sono in linea, per quanto riguarda il muscolo, coi dati spagnoli (López-Alonso *et al.*, 2000) e con quelli belgi registrati sia in aree rurali che industrializzate (Waegeneers *et al.*, 2009a). Lo studio condotto in Slovacchia (Koréneková *et al.*, 2002) fornisce un range molto ampio, poiché in una regione i valori trovati sono risultati nettamente superiori rispetto alle altre due zone del Paese; comunque, i dati sono simili al range riscontrato in Giordania per il fegato e superiori per il muscolo. Tutte le medie giordane sono superiori a quelle trovate nelle aree rurali d'Egitto, ma inferiori a quelle delle aree urbane (Abou-Arab, 2001), oltre che a quelle trovate in Marocco (Sedki *et al.*, 2003), Pakistan (Mariam *et al.*, 2004) e Svezia (Johrem *et al.*, 1989). Per la matrice muscolo, i livelli giordani sono minori di quelli riscontrati in Arabia Saudita (Alturiqi and Albedair, 2012) e Brasile (Batista *et al.*, 2012); per il fegato, sono più bassi di quelli trovati in Belgio (Waegeneers *et al.*, 2009a), Canada (Konsrud *et al.*, 1985) e Galizia (López-Alonso *et al.*, 2000). Le medie del rene sono in linea con quelle delle aree contaminate del Belgio, ma maggiori di quelle canadesi, spagnole e olandesi (Ellen *et al.*, 1989).

Tabella 40: dati dalla letteratura sui livelli di zinco in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
-	45,1 \pm 16,7	21,9 \pm 6,8	Canada	1985	Konsrud <i>et al.</i>
-	-	17,9	Olanda	1989	Ellen <i>et al.</i>
49,0 \pm 18	40,0 \pm 8,5	16,0 \pm 1,5	Svezia	1989	Johrem <i>et al.</i>
46,6 (a)	45,9 (a)	14,0 (a)	Galizia (Spagna)	2000	López- Alonso <i>et al.</i>
34,8 \pm 15,6 (b) 63,3 \pm 26,4 (c)	22,3 \pm 11,1 (b) 49,4 \pm 18,2 (c)	20,4 \pm 5,9 (b) 41,6 \pm 17,1 (c)	Egitto	2001	Abou-Arab
23,712-81,18 (d)	36,992- 79,946 (d)	-	Slovacchia	2002	Koréneková <i>et al.</i>
123	126	89	Marocco	2003	Sedki <i>et al.</i>
66,26 \pm 7,63	58,49 \pm 7,01	46,18 \pm 10,69	Pakistan	2004	Mariam <i>et al.</i>
43,3 \pm 9,3 (e) 41,2 \pm 6,6 (f)	40,3 \pm 22,2 (e) 53,9 \pm 68,4 (f)	18,3 \pm 5,8 (e) 22,0 \pm 5,7 (f)	Belgio	2009a	Waegeneers <i>et al.</i>
36,99-78,15 (g)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
210 \pm 86	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
44,323 \pm 14,3	35,347 \pm 14,4	22,703 \pm 4,87	Giordania	2013	questo studio

(a) = lo studio divide i risultati tra bovini da carne per sesso; si riporta la media dei maschi.

(b) = bovini allevati in aree rurali;

(c) = bovini allevati in aree industriali.

(d) = si riporta il range delle medie registrate in tre regioni del Paese.

(e) = bovini provenienti da aree non contaminate;

(f) = bovini provenienti da aree contaminate.

(g) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

Analizzando le medie giordane in base all'età dei soggetti, si vede un aumento lineare nelle concentrazioni di zinco nel muscolo (da 34,24 mg/kg degli 8 mesi a 42,936 mg/kg dei 12, da 45,938 mg/kg dei 18 a 55,178 mg/kg dei 24 mesi) e nel fegato (da 22,893 mg/kg a 8 mesi a 40,389 mg/kg a 18 mesi), ma non nel rene. López-Alonso e colleghi (2000) riferiscono invece una correlazione positiva tra età e accumulo di zinco in fegato, rene e muscolo.

Per quanto riguarda gli allevamenti, le concentrazioni medie rispecchiano quelle d'organo eccetto in quello di Al Khalili, dove sono inferiori, in quello di Samara, dove sono superiori per muscolo e fegato, e in quello di Qaddoumi, dove la media è maggiore per il muscolo.

Lo studio belga (Waegeneers *et al.*, 2009a) riporta una correlazione positiva tra i livelli di cadmio e di zinco in fegato e rene, dove entrambi si trovano legati dalla metallothioneina presente; all'aumentare della concentrazione di cadmio, aumenta anche quella di zinco. L'autore trova una correlazione analoga tra piombo, cadmio e zinco a livello renale. In base ai dati a disposizione, non è stato possibile trovare tale riscontro nei campioni giordani.

CROMO

Il cromo è un metallo è essenziale per l'uomo che, come già detto in precedenza, deve assumerne 50-200 µg al giorno. Gli alimenti che contengono le maggiori quantità di cromo sono di origine vegetale, anche se ad esse possono contribuire gli eventuali processi di lavorazione, trasformazione e arricchimento subiti dalla materia prima. Dati inglesi (già riportati in precedenza) segnalano invece che la maggiore concentrazione di cromo si trova nei prodotti a base di carne ed è pari a 0,230 mg/kg (EVM, 2003).

Nei campioni di **muscolo** provenienti dalla Giordania, la concentrazione media di cromo è pari a 0,213 mg/kg, con un range variabile da 0,105 mg/kg (bovino numero 75) a 0,819 mg/kg (numero 84); quest'ultimo campione supera notevolmente la media, in quanto gli altri presentano tutti valori inferiori a 0,4 mg/kg. Nei campioni di **fegato** la concentrazione media è minore, 0,155 mg/kg, con un range meno ampio del precedente, da 0,075 mg/kg (bovino numero 61) a 0,286 mg/kg (bovino numero 152). Per la matrice **rene** il valore medio di cromo è simile al fegato, 0,159 mg/kg, con un range di 0,134-0,211 mg/kg (rispettivamente dei bovini 116 e 58). In Olanda (Ellen *et al.*, 1989) il valore massimo di cromo segnalato nel rene è maggiore, pari a 1,04 mg/kg; l'autore in questo caso non esclude la contaminazione del campione durante la sua processazione.

Le concentrazioni rilevate nei campioni giordani sono inferiori a quelle registrate in Palestina (Swaileh *et al.*, 2009) in muscolo (0,70 mg/kg), fegato (3,62 mg/kg) e rene (1,33 mg/kg); sono invece superiori a quelle trovate in Svezia, dove i livelli per le matrici muscolo e rene sono sempre inferiori a 0,010 mg/kg, il limite di rivelazione del metodo, e per il fegato sono molto vicini al LOD, in media $0,012 \pm 0,025$ (Jorhem *et al.*, 1989). Anche in un altro studio circa il 50% dei campioni di rene risulta al di sotto del limite di rivelazione del metodo, pari a 0,010 mg/kg (Ellen *et al.*, 1989). Valutando le medie delle differenti classi di età dei bovini giordani, non sembra esserci alcuna correlazione tra esse e la concentrazione di cromo, poiché presentano valori molto simili tra loro ed in linea

con quelli medi d'organo. Anche tra i diversi allevamenti le concentrazioni sono simili; le uniche medie che si discostano sono quelle della matrice muscolo, in eccesso per l'allevatore Salaymeh (0,391 mg/kg, ma a lui appartiene il bovino 84) e in difetto per Saadi (0,143 mg/kg).

MANGANESE

Il manganese è un metallo essenziale per gli organismi viventi, la cui dose giornaliera raccomandata per l'uomo è di 2-5 mg; se assunto in dosi eccessive comporta degli effetti nocivi sulla salute, già descritti in precedenza.

Nei 29 campioni di **muscolo** giordani, la concentrazione media di manganese è 0,183 mg/kg, con range da 0,049 mg/kg (bovino numero 152) a 0,362 mg/kg (bovino numero 30). È interessante notare come il muscolo del bovino 152 presenti valori al di sotto della media anche per ferro, rame, zinco e selenio, mentre le sue concentrazioni di elementi non essenziali siano sempre al di sotto del LOD; la femmina numero 30 presenta invece valori superiori alla media anche per alluminio, cromo, ferro, zinco, arsenico, cadmio e piombo.

Nei campioni di **fegato** la concentrazione media è di 1,47 mg/kg, con range compreso tra 0,087 mg/kg (bovino numero 196) e 2,621 mg/kg (numero 137). Per la matrice **rene** il valore medio è 0,692 mg/kg, con range di 0,198-1,580 mg/kg.

Questi dati confermano che la carne e le frattaglie non rappresentano la fonte principale di manganese per l'uomo; infatti, rispetto al fegato, che è la matrice che ha la maggiore concentrazione, i cereali e le noci ne contengono dai 10 ai 20 mg/kg (EFSA, 2006).

Come si può vedere nella tabella 41, i risultati riscontrati in Giordania sono inferiori rispetto a quelli di altri studi, eccetto per la matrice muscolo, per la quale sono in linea con quelli brasiliani (Batista *et al.*, 2012) e superiori a quelli svedesi (Johrem *et al.*, 1989).

Tabella 41: dati dalla letteratura sui livelli di manganese in muscolo, fegato e rene di bovini provenienti da vari Paesi. Sono riportate le concentrazioni medie in mg/kg per ciascun campione \pm la deviazione standard quando segnalata.

MUSCOLO	FEGATO	RENE	PAESE	ANNO	STUDIO
-	-	1,03	Olanda	1989	Ellen <i>et al.</i>
0,093 \pm 0,044	3,2 \pm 0,67	1,1 \pm 0,24	Svezia	1989	Johrem <i>et al.</i>
1,1 \pm 0,8 (a) 1,4 \pm 1,0 (b)	4,8 \pm 2,1 (a) 4,3 \pm 1,0 (b)	2,3 \pm 1,1 (a) 3,4 \pm 1,7 (b)	Egitto	2001	Abou-Arab
1,01-16,32 (c)	-	-	Arabia Saudita	2012	Alturiqi and Albedair
0,228 \pm 0,17	-	-	Brasile	2012	Batista <i>et al.</i>
0,183 \pm 0,11	1,47 \pm 0,53	0,692 \pm 0,44	Giordania	2013	questo studio

(a) = bovini allevati in aree rurali;

(b) = bovini allevati in aree industriali.

(c) = lo studio riguarda i vitelli e riporta le medie dei risultati a seconda dell'area geografica (Nord, Est, Centro e Sud); qui si è deciso di segnalare il range delle medie.

Il manganese, essendo un elemento essenziale, non tende ad accumularsi nei tessuti animali, tanto che in base alle classi di età dei bovini analizzati non si notano differenze significative nella sua concentrazione, eccetto nel soggetto di 30 mesi (numero 46). Quest'ultimo, infatti, presenta valori sotto la media sia nel muscolo che nel fegato per Cr, Cu, Fe, Mn e sotto il LOD per tutti i metalli pesanti, pur essendo il bovino con l'età maggiore. Il numero 46 appartiene all'allevamento di Alawneh con il bovino numero 152 (di cui abbiamo già descritto le caratteristiche), col numero 1 e col numero 46; questi ultimi presentano concentrazioni muscolari ed epatiche al di sotto della media d'organo per la maggior parte degli elementi essenziali quali Co, Cr, Cu, Fe e Mn non rivelabili o basse per quelli non essenziali quali As, Cd e Hg. Si conclude che per tali metalli le concentrazioni medie di questo allevamento sono inferiori rispetto agli altri; bisognerebbe valutare le caratteristiche del suolo e dell'alimento loro fornito per giustificare questa tendenza.

Tra gli altri allevamenti giordani, quello di Qaddoumi presenta una concentrazione media epatica di manganese superiore alla media (2,084 mg/kg) e quello di Abu Saim una quota renale superiore alla media (0,814 mg/kg).

SELENIO

Il selenio è un elemento essenziale di cui la carne rappresenta un'importante fonte per l'uomo, fornendo il 36% della dose giornaliera raccomandata (FDA, 1982).

Dato che la carenza di selenio causa patologie debilitanti negli animali, negli allevamenti viene aggiunto sotto forma di additivo nei mangimi, così che le concentrazioni tissutali dei bovini trattati tendono ad essere più elevate. Negli ultimi anni tuttavia, soprattutto in Europa, la comparsa di aziende biologiche, dove agli animali non vengono dati tali supplementi alla dieta, ha comportato una diminuzione di queste concentrazioni; di conseguenza, la quantità di elemento nei loro tessuti dipende dalla quota che si trova naturalmente nei mangimi e nei terreni dove le piante vengono coltivate (Ghita *et al.*, 2009).

Essendo un elemento essenziale, tutti i campioni provenienti dalla Giordania presentano una concentrazione rivelabile di selenio. Per la matrice **muscolo**, il valore medio è di 0,320 mg/kg, con un range di 0,138-1,096 mg/kg. Nei campioni di **fegato**, la concentrazione media è di 0,6281 mg/kg, con un valore massimo di 4,001 mg/kg del numero 4, l'unico superiore a 1,1 mg/kg. Nel **rene** la media è di 1,16 mg/kg, con range da 0,349 mg/kg a 2,672 mg/kg. Le concentrazioni più alte per tutte le matrici appartengono al bovino numero 4 che, soprattutto per fegato e muscolo, si discosta molto dal valore medio d'organo. Nei nostri campioni, quindi, i livelli medi di selenio sono più alti nel rene, seguito dal fegato e dal muscolo; tale ordine decrescente è in linea con quello riportato da Ullrey (1987).

La concentrazione media nella carne risulta essere inferiore a quella di 0,009-0,011 mg/kg riscontrata in Romania (Ghita *et al.*, 2009) e in linea con quella registrata in Brasile di 0,257 mg/kg, con un range di 0,042-1,076 mg/kg (Batista

et al., 2012). Il valore giordano per il muscolo è superiore a quello svedese (0,030 mg/kg), così come per il fegato (0,10 mg/kg, con valore massimo di 0,16 mg/kg) e per il rene (0,86 mg/kg, picco di 1,3 mg/kg); l'autore però precisa che in Scandinavia i livelli di selenio nel suolo sono tipicamente bassi, tanto che agli animali deve essere fornito come supplemento nel mangime (Johrem *et al.*, 1991). I valori giordani per fegato e rene sono maggiori anche a quelli canadesi, rispettivamente pari a 0,26 mg/kg e 0,77 mg/kg (Konsrud *et al.*, 1985).

Negli USA, l'ATSDR segnala come valore medio per il muscolo 0,251-0,256 (massimo 0,439 mg/kg) e per il fegato 0,650 mg/kg; in questo caso il confronto non è attuabile, poiché nella stessa matrice sono compresi sia campioni analizzati tal quali sia dopo cottura, processo che fa evaporare parte dell'acqua, concentrando così gli elementi presenti (ATSDR, 2003).

Nei campioni giordani, non sono visibili differenze significative in base all'età. Tra i diversi allevamenti, l'unico che si discosta dalla media è quello di Abu Saim, sia per il muscolo (0,432 mg/kg), sia per il fegato (1,015 mg/kg), sia per il rene (1,365 mg/kg); bisogna comunque ricordare che a questo allevatore appartiene il bovino numero 4.

COBALTO

Il cobalto è un elemento essenziale in quanto entra nella composizione della cobalamina o vitamina B₁₂, di cui l'uomo ha bisogno per una dose giornaliera pari a 1 µg. Il cobalto è presente in basse concentrazioni negli alimenti; la carne rossa e il fegato rappresentano, insieme ad altri prodotti di origine animale, delle importanti fonti di assunzione per la popolazione.

In tutti i campioni di *muscolo* prelevati in Giordania la concentrazione di cobalto è al di sotto del LOD; i dati sono comunque in linea con quelli registrati in Spagna (Blanco-Penedo *et al.*, 2010), dove la media per bovini di aziende diverse è sempre inferiore a 0,005 mg/kg, e con quelli trovati in Svezia (Johrem *et al.*, 1989), dove si segnala una media di 0,001 mg/kg. In Brasile (Batista *et al.*, 2012) la concentrazione nel muscolo è maggiore, 0,0168±0,0156 mg/kg, con range da 0,001 mg/kg a 0,068 mg/kg.

Nei campioni di *fegato* giordani la media d'organo (escluso il numero 196 che si trova sotto al LOD) è 0,039 mg/kg, con un range da 0,005 mg/kg del numero 93 a 0,064 mg/kg del numero 54. È interessante sottolineare che il bovino 54 presenta valori epatici superiori alla media per tutti gli elementi essenziali eccetto il rame, oltre a valori elevati per cadmio e piombo; al contrario, i bovini 93 e 196 presentano valori inferiori alla media per tutti i gli elementi essenziali eccetto il ferro e non rivelabili per i metalli non essenziali. Nella matrice *rene*, invece, il numero 93 presenta la concentrazione maggiore di cobalto tra tutti i campioni, 0,038 mg/kg, più del doppio della media di 0,016 mg/kg.

I dati giordani indicano che è il fegato l'organo con le maggiori concentrazioni di cobalto, seguito dal rene e dal muscolo; ciò trova conferma in uno studio svedese (Johrem *et al.*, 1989), dove la media epatica è di 0,043 mg/kg, con valore massimo di 0,074 mg/kg, a fronte di quella renale di 0,008 mg/kg (che, secondo l'autore, è inferiore rispetto alle previsioni) e di quella muscolare di 0,001 mg/kg. Dato che nessuno studio segnala un range di riferimento per definire adeguata o meno la concentrazione muscolare di cobalto, si può ipotizzare che quando l'apporto dell'elemento con la dieta è appropriato i soggetti presenteranno valori

maggiori in muscolo, fegato e rene; al contrario, quando i livelli di metallo sono bassi nella dieta, il bovino interessato presenterà concentrazioni inferiori nei suoi tessuti (Blanco-Penedo *et al.*, 2010).

I valori medi di cobalto delle diverse categorie d'età dei campioni giordani non sono molto diversi rispetto a quelli d'organo; si sottolinea soltanto che la media epatica è maggiore nel soggetto di 24 mesi (0,054 mg/kg) e in quello di 30 mesi (0,045 mg/kg), ma non è correlata ad un bioaccumulo di metallo.

Per quanto riguarda i diversi allevamenti giordani, rispetto alla media d'organo quello di Saadi presenta valori superiori per il fegato (0,042 mg/kg) ma inferiori per il rene (0,008 mg/kg), quello di Salaymeh un livello epatico più alto (0,049 mg/kg) e quello di Al Khalili presenta quote più basse sia per il fegato (0,023 mg/kg) sia per il rene (0,010 mg/kg).

ARGENTO

L'argento è un metallo non essenziale per gli organismi viventi che può risultare tossico per l'uomo, anche se, come detto in precedenza, i suoi effetti nocivi non sono del tutto conosciuti. La maggiore fonte di contaminazione per la popolazione è rappresentata dagli alimenti; in particolare la carne, il pesce e il pollo contengono, in media, 0,015 mg/kg di argento (Cunningham and Stroube, 1987).

Dato che questo metallo ha la tendenza, una volta ingerito, ad accumularsi nel fegato e nel rene più che in altri organi, in essi si registreranno le maggiori concentrazioni (ATSDR, 1990). Nei campioni giordani analizzati, infatti, mentre nel *muscolo* il suo valore è sempre al di sotto del LOD, nel *fegato* la concentrazione media è di 0,0116 mg/kg; anche in questo organo, però, il 66% dei campioni presenta una quantità di argento al di sotto del limite di rivelazione. Il valore epatico massimo è 0,036 mg/kg (bovino numero 116), seguito da 0,021 mg/kg (numero 5) e 0,020 mg/kg (numero 152). Soltanto un campione di *rene*, appartenente al bovino 93, presenta una concentrazione di argento superiore a 0,005 mg/kg, pari a 0,010 mg/kg. È interessante sottolineare che questo stesso campione renale presenta i maggiori valori di manganese, cobalto, rame e zinco.

Le concentrazioni medie epatiche nelle diverse categorie di età dei bovini giordani sono molto simili. Alcune differenze si possono notare, invece, tra gli allevamenti: in quelli di Abu Said e di Salaymeh la media di 0,007 mg/kg è inferiore a quella d'organo, mentre in quelli di Alawneh e di Saadi le medie, rispettivamente di 0,013 mg/kg e di 0,015 mg/kg, sono superiori a quella epatica totale.

L'unico riscontro in letteratura sulle concentrazioni di argento nei bovini è uno studio (Roggeman *et al.*, 2014) condotto su vacche sia da latte (razza Holstein) sia da carne (razza Galloway), con più di 5 anni di età e macellate in Belgio. Pur non riportando i livelli di argento trovati, l'autore afferma che le maggiori concentrazioni di metallo si riscontrano nel fegato e che le vacche provenienti da aree più inquinate ne contengono livelli maggiori di quelle allevate in zone rurali.

CONSIDERAZIONI FINALI

La presenza di metalli non essenziali come contaminanti negli alimenti destinati al consumo umano, in particolare nella carne e negli organi bovini, rappresenta un problema nell'ambito della tutela della salute pubblica. Al contrario, dato che tali prodotti sono anche fonte di numerosi elementi essenziali, la loro capacità di soddisfare i fabbisogni giornalieri dell'uomo è molto importante, soprattutto in quei Paesi in cui il consumo pro capite di carne sta gradualmente aumentando.

Lo scopo di questo studio è stato valutare la concentrazione di 13 elementi chimici, sia essenziali sia non essenziali, in differenti campioni di muscolo, fegato e rene, tutte matrici potenzialmente edibili, di bovini allevati e macellati in Giordania, in modo da valutare la sicurezza del loro consumo da parte dell'uomo.

Confrontando le concentrazioni medie dei diversi metalli nei tre tipi di matrice risulta che lo zinco, il cromo, l'alluminio e l'arsenico tendono ad accumularsi maggiormente nel muscolo, il mercurio, il piombo, il rame, il ferro, il manganese, il cobalto e l'argento nel fegato e il cadmio e il selenio nel rene.

In questo studio nessun campione supera i livelli massimi stabiliti dalla normativa

europea per quanto riguarda cadmio e piombo, presentando concentrazioni per questi due elementi inferiori rispetto ai dati raccolti dall'EFSA. Dato che la legislazione europea per i metalli ricercati riguarda solo questi due elementi, è interessante confrontare i risultati medi degli altri metalli nelle matrici dove sono presenti alle maggiori concentrazioni con i corrispondenti livelli minimi di rischio (MRLs, Minimum Risk Levels), calcolati dall'ATSDR su un'esposizione di tipo orale cronica (ATSDR, 2012). Per l'arsenico l'MRL per l'uomo è definito per l'ingestione di 0,0003 mg/kg di peso corporeo al giorno, cioè di 0,021 mg per un individuo di 70 kg; in base alla concentrazione media giordana di 0,043 mg/kg per il muscolo, una persona ne può ingerire 480 g al giorno senza manifestare effetti tossici. Per l'alluminio l'MRL è di 1 g/kg/giorno, pari a 70 g per una persona di 70 kg, che dovrebbero ingerire 30,39 kg al giorno di carne giordana per superare tale limite. Per il cromo l'MRL è di 0,0009 mg/kg/giorno, 0,063 mg per 70 kg; dato che la concentrazione massima nei campioni giordani è a livello muscolare, un uomo potrebbe mangiare 290 g di carne senza oltrepassare il limite. Per il rame, l'MRL è stabilito a 0,01 mg/kg/giorno, quindi una persona dovrebbe mangiare più di 240 g di muscolo e di 24 g di fegato per ingerire una dose tossica. Dato che la media di consumo giornaliero di fragole, in Europa, è di 2-13 g (EFSA, 2009b), la concentrazione media d'organo non rappresenta un pericolo; soltanto il fegato del bovino 142, con una concentrazione di 164,064 mg/kg, fa scendere a 4 g la sua quantità che può essere ingerita senza effetti negativi. L'MRL dello zinco è pari a 0,3 mg/kg/giorno, quello del selenio è di 0,005 mg/kg/giorno, quindi una persona di 70 kg dovrebbe mangiare, rispettivamente, 470 g e 1,09 kg di carne per superare il loro limite di sicurezza. Infine, per il cobalto l'MRL è di 0,01 mg/kg/giorno, corrispondente all'assunzione di 17 kg di fegato; neppure per questo metallo si presenta alcun problema.

Gli elementi essenziali non compresi nell'elenco precedente, cioè ferro e manganese, nei campioni giordani presentano concentrazioni medie per lo più inferiori rispetto a quelle trovate in letteratura; essendo la carne rossa e le fragole fonti molto importanti di ferro per l'uomo, i suoi bassi livelli medi presenti dovrebbero essere maggiormente indagati.

Per gli ultimi due metalli non essenziali, mercurio e argento, le concentrazioni nei

campioni analizzati sono per la maggior parte non rivelabili e, qualora quantificabili, sono comunque basse.

In conclusione, si può affermare che i campioni di bovini giordani sono sicuri per quanto riguarda gli elementi non essenziali; per quelli essenziali, invece, singoli casi presentano concentrazioni rispetto alla media o inferiori (predisponendo i consumatori ad una possibile carenza) o troppo alte (predisponendoli a tossicità).

NEONICOTINOIDI

Introduzione

Negli ultimi 70 anni, i pesticidi sono diventati parte integrante della moderna agricoltura. Per quanto essi vengano applicati secondo le norme stabilite a livello nazionale o europeo, inevitabilmente i loro residui finiscono nei piatti dei consumatori, sia direttamente, perchè presenti in frutta o verdura, sia indirettamente, attraverso le carni e i prodotti di origine animale. Per garantire la sicurezza dei consumatori, esistono leggi che regolamentano la commercializzazione e l'uso dei prodotti fitosanitari, e che fissano i livelli massimi che possono essere presenti negli alimenti.

I neonicotinoidi sono insetticidi sistemici neurotossici, che agiscono per via orale e per contatto. Sono utilizzati in agricoltura per combattere insetti fitofagi e fitomizi appartenenti agli ordini degli Omotteri, Lepidotteri, Coleotteri e Tisanotteri. Alcuni di essi, sono anche utilizzati in campo veterinario come antiparassitari, poiché efficaci contro le pulci, ed in ambito domestico, per combattere infestazioni da scarafaggi o termiti.

La loro comparsa nel mondo agricolo è relativamente recente, il primo neonicotinoide, l'imidacloprid, è stato lanciato sul mercato nel 1991. La loro carriera ventennale si è contraddistinta per l'enorme successo ottenuto, basti pensare che tuttora sono tra i pesticidi più venduti al mondo. Considerati tra i possibili responsabili del declino di api da miele iniziato sette anni fa in molti Paesi dell'emisfero nord del mondo, oggi, dopo lunghe battaglie, che hanno visto protagonisti diversi Stati europei, apicoltori, case produttrici di pesticidi ed opinione pubblica, è stato approvato a livello europeo il divieto, seppur temporaneo, di utilizzo di tre neonicotinoidi: imidacloprid, clothianidin e thiamethoxam, che è entrata in vigore dal 1 dicembre 2013.

Il latte è una possibile via d'esposizione dell'uomo ai neonicotinoidi poichè è un alimento consumato abitualmente da molti sia come bevanda, sia come ingrediente base dei prodotti lattiero caseari. Animali alimentati con erba fresca o foraggi trattati, possono produrre latte contenente tracce di questi composti.

Il presente lavoro, realizzato in collaborazione con la *Jordan University of Science*

and Technology di Irbid, verte sull'analisi di campioni di latte ovino e bovino prelevati in Giordania ed ha la finalità di valutare presenza e livelli di quattro neonicotinoidi: imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam e thiacloprid.

INSETTICIDI NEONICOTINOIDI

Storia e classificazione

I neonicotinoidi sono composti ad azione insetticida, utili per combattere insetti ed altri artropodi dannosi, sia in campo agricolo sia in ambito domestico. Attualmente, sono tra i pesticidi più utilizzati in agricoltura. A livello mondiale, la loro vendita comporta un fatturato di circa un bilione di dollari l'anno, pari a l'11-15% dell'intero mercato dei pesticidi (Tomizawa and Casida, 2005). Il loro successo è legato all'ampio spettro d'azione, alla capacità di diffusione sistemica e translaminare, alla marcata attività residua e al meccanismo d'azione.

La storia dei neonicotinoidi inizia nel 1970, anno in cui la Shell Chemical Company intraprende una ricerca volta alla sintesi di nuovi insetticidi. Inizialmente, l'attenzione è puntata sul composto 2-dibromonitrometil-3-metilpiridina, sul quale vengono effettuati vari test da cui emerge che la molecola è dotata di una blanda azione insetticida. Vengono, quindi, apportate delle modifiche alla struttura della 2-dibromonitrometil-3-metilpiridina e nasce la nitiazina, un nitrometilene eterociclico con buona attività insetticida ma fotosensibile, caratteristica che non lo rende utilizzabile in agricoltura. A partire dal 1979, chimici della Nihon Bayer Agrochem lavorano alla modifica della struttura della nitiazina. Il primo tentativo di modifica non porta a risultati soddisfacenti: l'introduzione del gruppo cloropiridinilmetilico conferisce al composto una spiccata attività insetticida, ma è fotosensibile. È nel 1985 che, finalmente, viene sintetizzato il primo neonicotinode: l'imidacloprid, grazie alla sostituzione del nitrometilene con la nitroguanidina, la quale conferisce al composto fotostabilità. Si tratta di una molecola dotata di un eccellente potere insetticida e, nello stesso tempo, di fotostabilità, caratteristica che ne permette l'utilizzo in agricoltura.

Al precursore imidacloprid seguono acetamiprid, nitenpyram e thiacloprid, accomunati dalla presenza del gruppo eterociclico 6-cloro-3-piridilmetile nella loro molecola. Essi rappresentano i neonicotinoidi di prima generazione, anche detti pesticidi cloronicotinili perchè dotati di un gruppo cloropiridile (Tomizawa and Casida, 2005). Sono poi sintetizzati i neonicotinoidi di seconda generazione, clothianidin e il thiamethoxam, ottenuti per sostituzione del gruppo cloropiridile con il gruppo clorotiazolico. Sono anche detti pesticidi tianicotinili, per la presenza nella loro struttura del gruppo clorotiazolico (Sheets, 2001). Il dinotefuran è il neonicotinoide più di recente sintetizzato, unico rappresentante della terza generazione. Si caratterizza per la presenza di un gruppo tetraidrofuranico nella molecola.

I neonicotinoidi, oltre a poter essere classificati per generazione, possono anche essere distinti sulla base del farmacoforo posseduto. Il farmacoforo è l'unità strutturale della molecola responsabile dell'attività biologica e permette di suddividere i neonicotinoidi in tre gruppi: quello delle N-nitroguanidine, a cui appartengono imidacloprid, clothianidin, thiamethoxam e dinotefuran, quello delle N-cianoammidine, di cui fanno parte acetamiprid e thiacloprid, e quello dei nitrometileni, di cui il nitenpyran è l'unico rappresentante (Elbert *et al.*, 2008).

La denominazione generica di *neonicotinoidi* sta a sottolineare che essi sono innovativi, per ciò che riguarda il meccanismo d'azione e le caratteristiche strutturali, rispetto alla nicotina e ai composti ad essa correlati, i nicotinoidi. Rispetto a quest'ultimi, mostrano una maggiore efficacia come insetticidi ed una minor tossicità nei confronti dei mammiferi (Matsuda *et al.*, 2009; Elbert *et al.*, 2008). I composti attualmente in uso sono sette e di questi l'imidacloprid, è stato il primo ad essere immesso sul mercato, nel 1991, seguito poi, nei 10 anni successivi, da acetamiprid, nitenpyram, thiamethoxam, thiacloprid, clothianidin e dinotefuran (Elbert *et al.*, 2008).

Meccanismo d'azione

I neonicotinoidi sono pesticidi neurotossici, che agiscono come agonisti a livello dei recettori nicotinici dell'acetilcolina (nAChRs).

Per *agonista* si intende una sostanza che ha affinità ed esercita stimolazione nei confronti di una attività fisiologica a livello di recettori cellulari normalmente stimolati da sostanze naturali.

Siti target dei neonicotinoidi sono i recettori nicotinici, che rappresentano degli specifici siti biochimici dell'organismo con i quali gli insetticidi interagiscono per creare effetti tossici. Appartengono alla famiglia dei recettori-canale cationici e sono situati a livello di membrana post-sinaptica delle sinapsi colinergiche, in vertebrati ed invertebrati (Erdmanis *et al.*, 2012). A livello di sinapsi colinergiche sono presenti due tipi di recettori: nicotinici e muscarinici. La differenziazione tra i due tipi recettoriali si basa sulla sensibilità verso sostanze esogene come la nicotina e la muscarina, differenza da cui deriva la loro denominazione. Infatti, i recettori colinergici muscarinici sono, attivati, oltre che dall'acetilcolina, dalla muscarina. La muscarina è un alcaloide presente in alcuni funghi, in particolare in quelli del genere *Inocybe* e *Clitocybe*, ed agisce come agonista a livello dei recettori muscarinici. Analogamente, i recettori colinergici nicotinici sono attivati, non solo dall'acetilcolina, ma anche dalla nicotina; alcaloide contenuto in numerose piante, ma soprattutto nella pianta *Nicotiana tabacum*, dove la sua funzione è probabilmente quella di proteggere il vegetale dall'attacco degli insetti. Anche la nicotina agisce come agonista a livello di sinapsi colinergiche, ma i recettori a cui si lega sono, ovviamente, i nicotinici (Stenersen, 2004).

A differenza dei recettori muscarinici, costituiti da una singola catena peptidica, i recettori nicotinici posseggono una struttura pentamerica, formata, cioè, da cinque subunità proteiche che delimitano il canale ionico. I recettori nicotinici, in base alle subunità che li costituiscono, vengono indicati come omopentameri o eteropentameri. I primi presentano subunità con struttura primaria sovrapponibile, sono, cioè, costituiti dalle sole subunità α , i secondi, invece, posseggono subunità

con struttura primaria diversa, derivante dalla combinazione di subunità α e non- α . Studi effettuati sui recettori nicotinici dei mammiferi, hanno dimostrato che diverse combinazioni di tali subunità creano recettori con diverse sensibilità all'acetilcolina e/o profilo farmacologico variabile (Erdmanis *et al.*, 2012).

Nei vertebrati i recettori nicotinici sono localizzati a livello di placca neuromuscolare dei muscoli scheletrici e di neuroni del sistema nervoso centrale e periferico. Negli insetti i recettori nicotinici sono distribuiti nell'organismo ed in particolare si trovano a livello di sistema nervoso centrale. Essi sono fondamentali per la trasmissione nervosa e rappresentano i *target* dei pesticidi neonicotinoidi. Essendo l'acetilcolina il principale neurotrasmettitore eccitatorio a livello di SNC negli insetti, a differenza dei mammiferi in cui è il glutammato, viene favorita la selettività di determinati insetticidi neurotossici per i recettori nicotinici da loro posseduti (Vo *et al.*, 2009).

In condizioni fisiologiche, è l'acetilcolina (ACh), neurotrasmettitore del sistema nervoso colinergico, ad interagire con il recettore, così da permettere la trasmissione degli impulsi elettrici, o potenziali d'azione, a livello sinaptico.

È contenuta in vescicole ancorate alla membrana presinaptica, dalle quali fuoriesce per esocitosi. Una volta rilasciata nello spazio sinaptico, va a legarsi ai recettori nicotinici situati a livello di membrana postsinaptica e media il passaggio di ioni e la neurotrasmissione a livello di sinapsi. È classificata come neurotrasmettitore eccitatorio poiché attiva i canali del sodio dei neuroni postsinaptici, stimolando la formazione di nuovi potenziali d'azione.

Il meccanismo d'azione dell'ACh può essere riassunto in tre passaggi (Fig.10):

- liberazione del neurotrasmettitore e suo legame con il recettore nicotinico a livello di sito di legame;
- modificazione strutturale del recettore e apertura del canale ionico, con conseguente flusso intracellulare di Na ed extracellulare di K;
- idrolisi dell'acetilcolina ad opera dell' enzima acetilcolinesterasi.

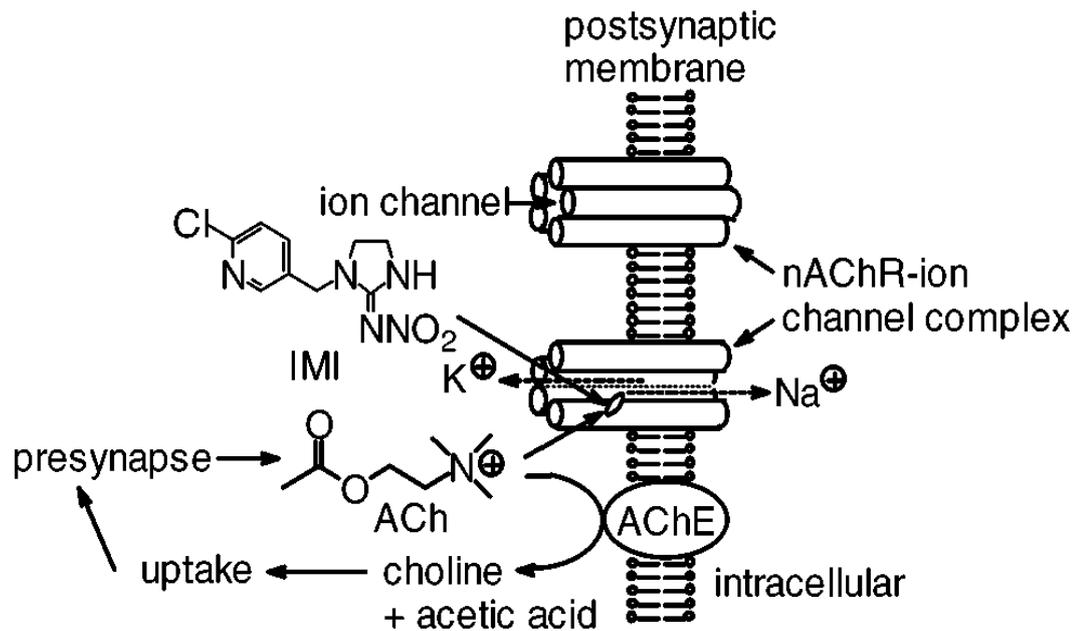


Fig.102 Neurotrasmissione a livello di recettori nicotinici della'acetilcolina. L'ACh è rilasciata a livello presinaptico e si lega ai nAChRs, ciò determina l'attivazione dei canali ionici. L'ACh è, poi, idrolizzata dall'enzima acetilcolinesterasi (Tomizawa and Casida, 2003).

I neonicotinoidi agiscono come acetilcolinomimetici.

Essendo degli agonisti, si sostituiscono all'acetilcolina nel legame con il recettore e tale legame determina l'apertura dei canali cationici non selettivi con conseguente flusso intracellulare di Na/Ca extracellulari ed uscita di K intracellulare. I neonicotinoidi, però, non possono essere degradati dall'enzima acetilcolinesterasi e si ha, quindi, la continua attivazione del recettore e la persistente depolarizzazione neuronale, con conseguente alterazione della trasmissione nervosa. L'interazione neonicotinoide-recettore determina, inizialmente, l'accentuazione della trasmissione nervosa a livello sinaptico, poi il blocco della stessa. Il legame dei neonicotinoidi ai recettori nicotinici è reso possibile grazie alla somiglianza della loro struttura molecolare con quella dell'acetilcolina per dimensioni e distribuzione delle cariche elettriche. Il recettore non è, quindi, in grado di distinguere tra sostanze endogene ed esogene ed il risultato è la sua iperstimolazione (Bostanian, 2005). L'insetto, dopo aver ingerito

il pesticida o essere venuto a contatto con esso, presenterà tremori generalizzati seguiti da paralisi e poi andrà incontro a morte. Alcune formulazioni presenti sul mercato contengono anche sostanze sinergiche in grado di inibire la degradazione ossidativa del neonicotinoide e prolungarne l'effetto (Sheets, 2001).

Principi della selettività per gli invertebrati

La *tossicità selettiva* è intesa come capacità di un pesticida di agire in maniera efficace nei confronti delle specie target e di avere effetti limitati, o nulli, sulle altre specie che vengono a contatto con esso. Un insetticida, se selettivo, sarà anche privo di potenziali rischi per l'uomo e per le specie non target.

I neonicotinoidi sono considerati insetticidi selettivi, caratteristica che li differenzia nettamente dai nicotinoidi, i quali si legano ai siti recettoriali dei mammiferi con affinità pari a quella mostrata per i siti recettoriali degli invertebrati. Per spiegare i motivi della selettività di questa classe di insetticidi nei confronti degli insetti, si sono studiate le interazioni tra i principi attivi dei neonicotinoidi e i siti di legame a livello di recettori nicotinici, utilizzando come surrogato strutturale le proteine leganti l'acetilcolina di un mollusco, la *Lymnaea stagnalis*, le quali mostrano omologia con i gruppi N-terminali delle subunità $\alpha 7$ dei siti di legame. Si è scoperto che ad essere determinanti per la selettività sono i gruppi elettronegativi N-ciano ed N-nitro posseduti dai neonicotinoidi ed i residui amminoacidici presenti a livello recettoriale negli insetti (Fig. 3). Tra gruppi elettronegativi e residui amminoacidici si instaurano legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche. A prova di ciò, si è osservato che la mutazione in alcuni polli dei residui amminoacidici dell'anello D in residui basici ha determinato la comparsa di sensibilità ai neonicotinoidi.

Mentre i residui amminoacidici negli insetti sono carichi positivamente e danno luogo ad una interazione positiva con i neonicotinoidi, quelli dei mammiferi sono carichi negativamente e generano un effetto di repulsione (Tomizawa, 2004).

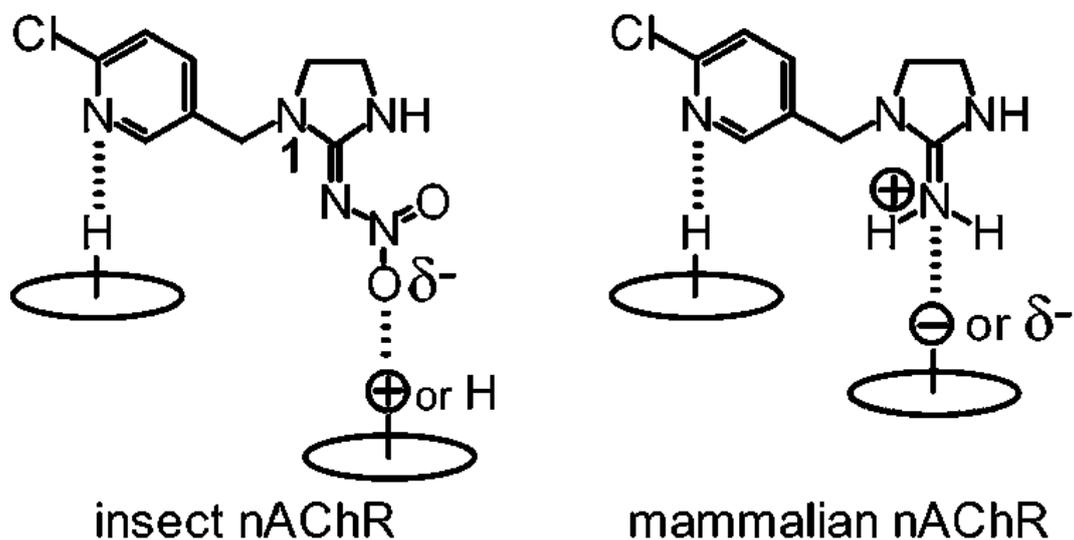


Fig.11: Caratteristiche molecolari dell'imidacloprid (a sn), rappresentante dei neonicotinoidi, e del des-nitro-imidacloprid (a dx), rappresentante dei nicotinoidi, che conferiscono selettività ai primi per i recettori nicotinici degli insetti, ai secondi per i recettori nicotinici dei mammiferi (Tomizawa and Casida, 2003).

Specie bersaglio

I neonicotinoidi vengono utilizzati in agricoltura perché efficaci nei confronti di insetti fitofagi e fitomizi appartenenti agli ordini degli Omotteri, Lepidotteri, Coleotteri e Tisanotteri (www.agraria.org/entomologia-agraria).

Alcuni neonicotinoidi trovano applicazione anche in campo veterinario, perché efficaci nei confronti delle pulci, e in ambito domestico per eliminare insetti infestanti come scarafaggi e termiti (Elbert *et al.*, 2008).

Formulazioni e modalità di impiego in agricoltura

I principi attivi neonicotinoidi sono presenti sul mercato in formulazioni solide e liquide, che li rendono applicabili a livello di foglie, terreno e semi.

Sono applicate soprattutto a livello di terreno, raramente sulle foglie poiché, se asciutte, solo una piccola quantità vi aderisce (Hassal, 1990). La concia delle sementi è una particolare tecnica di impiego dei neonicotinoidi. Consiste nel rivestire il seme con una pellicola imbevuta di neonicotinoide, il quale si distribuirà in modo sistemico nella pianta quando questa inizierà il suo sviluppo. Tale tecnica presenta come vantaggi la protezione della pianta fin da giovane, la riduzione della quantità di principio attivo utilizzata, la minor esposizione degli operatori ai fitofarmaci. Viene utilizzata per il trattamento di semi di mais, barbabietola da zucchero, cereali, cotone, colza e girasole (Elbert *et al.*, 2008).

Qualunque sia la sede di applicazione, i neonicotinoidi tendono a distribuirsi in modo sistemico nella pianta, grazie alla spiccata idrosolubilità, ed hanno una lunga durata d'azione (quattro settimane circa) (Van Timmeren *et al.*, 2010).

Formulazioni e modalità di impiego sugli animali

In ambito veterinario, l'imidacloprid è utilizzato per la sua azione ectoparassiticida. In commercio esistono formulazioni liquide da applicare sulla cute dell'animale allo scopo di prevenire e trattare infestazioni da pulci adulte e negli stadi larvali. L'imidacloprid dopo applicazione su determinate zone della cute, si distribuisce sulla superficie corporea e sul mantello, esplicando la sua azione letale per ingestione e per contatto (Urquhart *et al.*, 1998)

Il problema “neonicotinoidi e api”

Il declino degli insetti impollinatori e la Colony Collapse Disorder

Gli insetti impollinatori, grazie alla loro opera di fecondazione delle specie vegetali, sono fondamentali per la conservazione della biodiversità vegetale e per il mantenimento dell'equilibrio dell'ecosistema. Rivestono, inoltre, una notevole importanza economica sotto due punti di vista: il primo è che l'apicoltura rappresenta un'importante fetta del mercato mondiale grazie alla produzione di miele, propoli, pappa reale e cera, il secondo è che influenzano qualitativamente la produzione agricola grazie all'impollinazione.

Api ed altri insetti impollinatori, come bombi e farfalle, nel corso della storia, hanno spesso subito cali di popolazione, attribuiti a svariate cause di natura biotica e abiotica, come patogeni, parassiti, inquinanti, pesticidi, cambiamenti climatici, distruzione degli habitat e scarsa disponibilità di risorse.

Negli ultimi sette anni, si è verificato, però, il più grave declino di api da miele (*Apis mellifera*) appartenenti a colonie gestite. Nel 2006, in alcune colonie del Nord America, si è verificato un improvviso e inspiegabile calo di numero delle api adulte. Il fenomeno, senza precedenti nella storia per rapidità, gravità e caratteristiche, era caratterizzato dall'abbandono improvviso dell'alveare da parte delle api adulte, che lasciavano larve e regina completamente trascurate. L'abbandono da parte delle api operaie, che non venivano ritrovate morte nell'alveare o attorno ad esso, era, spesso, seguito dallo spopolamento del nido, poiché venivano a mancare i membri fondamentali per il sostenimento dell'alveare e della colonia. Per indicare il fenomeno, fu coniato il termine *Colony collapse disorder* (CCD), ovvero *Sindrome dello spopolamento degli alveari* (SSA) (Farooqui, 2012). Negli anni successivi si sono verificati eventi simili in altre parti del continente americano e del mondo, come Canada, Europa, Medio Oriente e Giappone. Nel periodo inverno 2006/2007 e inverno 2008/2009 si è verificata una mortalità nelle colonie di api da miele negli Stati Uniti tra il 32% e il 29% e in Europa mediamente del 20% (Williams *et al.*, 2010).

Per la CCD non è stato individuato alcun patogeno o parassita come causa scatenante ed è ancora incerto se la sindrome sia legata ad un singolo fattore o ad una combinazione di essi. Varie cause sono state proposte come responsabili di CCD, tra cui infezioni fungine da *Nosema ceranae* e *Nosema apis*, malattie virali sostenute dall' *Israeli Acute Paralysis Virus* (IAPV) o dal *Deformed wing virus* (DWV), parassitosi, radiazioni elettromagnetiche, piante geneticamente modificate nelle quali sono espressi geni killer per gli insetti, pesticidi (Farooqui, 2012).

Già prima della comparsa della CCD, i pesticidi erano stati additati come i principali responsabili del declino delle api; infatti, le perdite che si sono avute tra il 1996 ed il 1979 sono state attribuite a carbamati, organoclorine, organofosfati e piretroidi (Johnson *et al.*, 2010). Attualmente, l'attenzione è puntata sui neonicotinoidi. Il meccanismo d'azione, la diffusione sistemica nella pianta ed i particolari metodi d'applicazione, rendono questa classe di composti i principali sospettati del declino delle api da miele.

I neonicotinoidi agiscono sul sistema nervoso colinergico, a livello di recettori nicotinici, inducendo una depolarizzazione dose-dipendente. Nelle api da miele, i recettori nicotinici sono stati identificati a livello di lobi antennali e corpi fungiformi (Armengaud *et al.*, 2002). Entrambe le strutture, fondamentali per l'apprendimento olfattorio, sono localizzate a livello cerebrale. I circa 10000 neuroni che costituiscono i lobi antennali sono connessi con i chemocettori presenti a livello delle antenne e sono coinvolti nel processo olfattorio. I corpi fungiformi sono costituiti da circa 17000 neuroni e sono responsabili della formazione della memoria. Tali aree del cervello sono, quindi, coinvolte nello svolgimento delle varie fasi della memoria olfattiva, che sono l'apprendimento, la memoria a lungo e breve termine, il riconoscimento e la discriminazione tra odori. Agendo sui recettori nicotinici, i neonicotinoidi possono alterare le funzioni neurobiologiche delle api ed intaccare la loro capacità di orientamento, basata sul riconoscimento e sulla memorizzazione di determinati punti di riferimento visivi, fondamentale per raggiungere la fonte di cibo e tornare all'alveare e viceversa (Fourrier *et al.*, 2010). I danni all'apprendimento olfattorio e alla memoria si ripercuotono negativamente sull'attività di foraggiamento, e la conseguenza può

essere la comparsa di CCD. Numerosi studi di laboratorio effettuati negli Stati Uniti e in Europa hanno dimostrato che i neonicotinoidi in dosi sub-letali, da soli o in combinazione con altri fattori, causano disorientamento e difficoltà a ritornare all'alveare, minor comunicazione, danni all'apprendimento e alla memoria, calo della longevità e ripercussioni negative sulla capacità di foraggiare, rallentamento dello sviluppo larvale, problemi riproduttivi e l'indebolimento del sistema immunitario (Farooqui, 2012).

La diffusione sistemica nella pianta è una caratteristica che differenzia i neonicotinoidi dagli insetticidi tradizionali; è una proprietà che permette ai composti utilizzati per la concia dei semi di essere incorporati nella pianta in crescita e di distribuirsi in tutti i tessuti vegetali, anche in nettare e polline nel periodo di fioritura. Nettare e polline contaminati espongono le api bottinatrici, ma anche gli altri membri della colonia, sia adulti sia larve, ai neonicotinoidi, poiché vengono immagazzinati in alveare, dove vanno a costituire le riserve di cibo. La concentrazione dei neonicotinoidi in nettare e polline non è, in genere, così elevata da determinare la morte delle api, tuttavia è causa di una esposizione cronica che può avere gravi ripercussioni sullo sviluppo delle forme larvali e sulla sfera comportamentale e riproduttiva degli adulti (Aliouane *et al.*, 2008; Dively, 2012).

Determinati composti chimici potrebbero divenire letali per colonie di api già indebolite da patologie o, al contrario, i pesticidi potrebbero essere responsabili del calo delle difese immunitarie degli insetti, rendendoli più suscettibili alle infezioni (Le Conte *et al.*, 2011).

Ad essere in pericolo non sono solo le api, ma anche gli altri insetti impollinatori, come bombi e farfalle. Lo studio svolto da Laycock e coll. nel 2012 indaga la possibile connessione tra il declino della popolazione dei bombi (*Bombus terrestris*), imenotteri impollinatori, e l'uso di neonicotinoidi in agricoltura. In questa ricerca, ad una microcolonia di bombi adulti è stato somministrato imidacloprid per via orale per valutare gli effetti sulla fecondità e sullo sviluppo ovarico. Esito della sperimentazione è stato il calo della fecondità e la minor produzione di larve, mentre lo sviluppo ovarico non ha subito alterazioni.

Messa al bando dei neonicotinoidi imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin

Per tutelare le api in questi anni, diversi Paesi europei hanno attuato limitazioni nell'uso dei tre neonicotinoidi considerati più pericolosi per gli insetti non target, cioè imidacloprid, thiamethoxam e clothianidin.

In Francia, nel 1999, il Ministro dell'Agricoltura ha deciso di vietare l'uso dell'imidacloprid come conciante per i semi di girasole, divieto esteso nel 2004 ai semi di mais.

In Germania, dopo le massive morti di api che si sono avute nel maggio 2008, è stato vietato l'utilizzo di prodotti fitosanitari a base di clothianidin, thiamethoxam e imidacloprid per la concia di semi di colza, revocato dopo pochi mesi, e di mais.

In Italia è stato vietato nel 2008 l'uso di prodotti destinati alla concia contenenti thiamethoxam, imidacloprid e clothianidin. Il divieto, messo in atto dopo l'esecuzione di monitoraggi in tutto il Paese che avevano evidenziato la correlazione tra la semina di mais trattato con neonicotinoidi e la perdita di api, scatenò la reazione dell'industria dei pesticidi, che intraprese un'azione legale nei confronti dello Stato Italiano. La causa fu vinta da quest'ultimo, affiancato dall'UNAAPI (Unione nazionale associazione apicoltori italiani), e la sospensione mantenuta. Il divieto è stato, poi, prorogato varie volte, fino al 2013.

In Slovenia, come in Germania, il primo divieto è stato attuato nel 2008 ed ha interessato i tre neonicotinoidi utilizzati per la concia di semi di mais e colza. Il divieto per la colza è stato poi revocato.

Dopo anni di accese controversie tra apicoltori e case produttrici di fitofarmaci, la Commissione Europea ha deciso di vietare l'utilizzo di prodotti fitosanitari a base di clothianidin, imidacloprid e thiamethoxam nelle formulazioni granulari e spray e per il trattamento dei semi, su qualsiasi pianta o coltura attraente per le api prima della fioritura, in particolare mais, colza, cotone e girasole. Il divieto, che è entrato in vigore dal primo dicembre 2013, è della durata di due anni, al termine dei quali

potrà essere prorogato. Nonostante non sia stata raggiunta, in due incontri consecutivi, la maggioranza qualificata tra gli Stati membri per l'approvazione della proposta di divieto dei tre neonicotinoidi, la Commissione Europea ha, comunque, optato per l'attuazione della messa al bando, dopo aver valutato il parere pubblicato dal gruppo di esperti scientifici sui prodotti fitosanitari e i loro residui dell'EFSA, nel quale erano riportate le conclusioni sui rischi per le api derivati dai tre neonicotinoidi.

IMIDACLOPRID

Generalità

L'imidacloprid, primo neonicotinoide ad essere sintetizzato ed immesso sul mercato, è tra gli insetticidi più venduti al mondo. Si tratta di un composto biseterociclico alogenato, precursore dei neonicotinoidi cloronicotinici, la cui struttura molecolare si distingue da quella della nicotina per le dimensioni e per la presenza del gruppo nitriliminico. Si presenta come cristalli incolori dall'odore lieve e caratteristico (Gervais *et al.*, 2010).

Impiego

L'imidacloprid è utilizzato per il controllo di insetti succhiatori, come afidi, tisanotteri e mosche bianche, insetti terricoli ed insetti masticatori, come il punteruolo acquatico del riso (*Lissorhoptrus oryzophilus*) e la dorifora (*Leptinotarsa decemlineata*).

È impiegato per la protezione di numerose colture, oltre 140, e trova applicazione in diversi ambiti del settore agricolo, tra cui la frutticoltura, l'orticoltura, la coltivazione del tabacco e dei fiori. L'imidacloprid è anche utilizzato in campo veterinario come antiparassitario, perché efficace nei confronti delle pulci, ed in ambito domestico per combattere infestazioni da scarafaggi e termiti (Gervais *et al.*, 2010).

Destino ambientale

L'imidacloprid è un composto relativamente persistente nell'ambiente. La sua persistenza nel suolo va dai 174 ai 191 giorni, in acqua, invece, la sua persistenza varia dai 30 ai 129 giorni, poiché si degrada più velocemente nelle condizioni anaerobiche dell'ambiente acquatico, piuttosto che in quelle aerobiche del suolo. Anche la degradazione indotta dalla luce solare si svolge più rapidamente in acqua, infatti, se nel suolo il composto è fotodegradato nell'arco di mesi, molto

lentamente, in acqua ciò avviene in alcune ore. Non è un composto che tende alla volatilizzazione ed è dotato di una mobilità nel suolo scarsa/moderata (Roberts and Hutson, 1999; Gervais *et al.*, 2010).

Secondo l'EPA, il rischio di contaminazione delle falde acquifere e delle acque superficiali da parte dell'imidacloprid è elevato, considerato che l'elevata solubilità in acqua ne favorisce il trasporto, tramite scorrimento, verso le acque superficiali, mentre l'elevata persistenza nell'ambiente ne favorisce il raggiungimento delle acque profonde.

Comportamento nelle piante

Come gli altri neonicotinoidi di prima generazione, l'imidacloprid, è dotato di una buona diffusione sistemica dopo applicazione a livello radicale, ma di una limitata sistemicità se applicato a livello fogliare (Roberts and Hutson, 1999).

Una ricerca effettuata su piante di pomodoro cresciute in un terreno trattato con imidacloprid, ha rilevato che, nell'arco di 75 giorni, più del 75% della quantità applicata è stata assorbita e traslocata ai germogli. Analizzando alcuni frutti, si è riscontrata, soprattutto, la presenza di imidacloprid non metabolizzato, mentre, l'analisi della composizione fogliare ha condotto all'individuazione di piccole quantità di metaboliti oltre al composto madre (Rapporto JMPR, 2006).

Comportamento nei mammiferi

Le vie metaboliche intraprese dai neonicotinoidi nell'organismo dei mammiferi sono state studiate in animali da laboratorio, soprattutto ratti e topi, ma non esistono studi diretti effettuati sull'uomo.

In linea generale si può affermare che, dopo ingestione, i principi attivi, o i loro metaboliti, sono completamente assorbiti a livello gastroenterico, poi in parte sono metabolizzati a livello epatico e in parte sono escreti come tali con feci ed urine.

L'imidacloprid, dopo singola somministrazione orale nel ratto, viene rapidamente assorbito e distribuito nei vari distretti corporei e altrettanto rapidamente è

eliminato. Il 96% della dose somministrata è escreta in 48 ore dalla somministrazione, principalmente per via urinaria. Questo pesticida nel ratto può seguire due vie metaboliche (Vo *et al.*, 2009).

Tossicità acuta

L'imidacloprid è moderatamente tossico per ingestione (LD50 nel ratto pari a 450 mg/kg p. c.). Per inalazione presenta un livello di tossicità variabile a seconda che si tratti di polveri o aerosol, nel primo caso la tossicità è ridotta (LC50 nel ratto maggiore di 5323 mg/L di aria), nel secondo, invece, la tossicità è elevata (LC50 nel ratto è di 69 mg/L di aria). Segni clinici di intossicazione acuta mostrati dagli animali testati dopo esposizione orale, sono vomito, scialorrea, letargia, diarrea, debolezza muscolare, atassia, tremori e andatura scoordinata. Nel ratto l'insorgenza dei sintomi è rapida infatti essi compaiono circa 15 minuti dopo il trattamento, ed altrettanto rapida è la loro remissione, considerato che i sintomi scompaiono in circa 24 ore. Dopo somministrazione della dose letale, la morte insorge nell'arco di 24 ore. Gli studi sulla tossicità acuta hanno inoltre confermato che l'imidacloprid nel coniglio non causa irritazione oculare né cutanea e che nelle cavie non funge da sensibilizzante della cute (Gervais *et al.*, 2010).

Casi di avvelenamento per ingestione nell'uomo (alcuni dei quali causa di decessi), si sono verificati in Cina, Iran, India, Portogallo, Sri Lanka e Turchia. I sintomi riportati sono stati vomito, mal di testa, disorientamento, letargia, tachicardia, ipertensione, insufficienza respiratoria e, nei casi più gravi, il coma. Casi di avvelenamento per inalazione e per contatto, ma nessun decesso, si sono avuti in Polonia e Sri Lanka. Le persone colpite hanno mostrato disorientamento, agitazione, sudorazione e respiro affannoso (Mohamed *et al.*, 2009). Altre manifestazioni di tossicità acuta registrate nell'uomo, sono dei casi di dermatite da contatto denunciati da alcuni proprietari di piccoli animali, a seguito dell'applicazione di antiparassitari contenenti imidacloprid sui loro animali domestici (Gervais *et al.*, 2010).

Tossicità cronica

Ratti a cui è stato somministrato imidacloprid nella dieta per un periodo di tre mesi, hanno mostrato calo di peso, lesioni epatiche, deficit della capacità coagulativa e calo del numero di piastrine. Le femmine hanno mostrato tali effetti biologici durante il trattamento con dosaggio più alto (420 mg/kg/di) mentre i maschi durante il trattamento con dosaggio medio (60 mg/kg/di).

La sospensione del trattamento ha determinato la regressione delle lesioni epatiche ma non delle alterazioni ematiche (Gervais *et al.*, 2010).

Effetti cancerogeni

Ratti a cui è stato somministrato imidacloprid nella dieta per un periodo di 12 e di 24 mesi, hanno presentato alcuni segni di tossicità sistemica, ma non alterazioni riconducibili ad una azione cancerogena del composto. Alla luce dei numerosi studi effettuati in vivo, su topi e ratti, ed in vitro, in cui si provava che l'imidacloprid non era responsabile di danni al DNA, il composto è stato classificato dall'EPA come improbabile cancerogeno per l'uomo (Gervais *et al.*, 2010).

Effetti mutageni

Studi effettuati in vitro su linfociti umani e su cellule midollari di topo, hanno evidenziato, in entrambi i casi, la comparsa di aberrazioni cromosomiche. Dal momento che, in vivo, non c'è stata conferma di tali anomalie, è stata esclusa la possibilità che l'imidacloprid sia dotato di potere mutageno (Gervais *et al.*, 2010).

Effetti teratogeni e riproduttivi

Gli studi sono stati eseguiti utilizzando come specie surrogate ratti e conigli. In entrambe le specie, effetti biologici avversi sono stati registrati nei gruppi trattati con le dosi maggiori. Nel gruppo di ratti alimentati con una dieta contenente

imidacloprid alla concentrazione di 100 mg/kg/di, dal 6° al 15° giorno di gravidanza, si è constatato ridotto sviluppo embrionale e feti con malformazioni delle ossa costali. Nel gruppo di conigli a cui è stato somministrato imidacloprid nella dieta (72 mg/kg/di), dal 6° al 18° giorno di gravidanza, si sono verificati alcuni decessi e tra gli animali rimasti in vita si sono osservati casi di rallentato sviluppo e di ritardata ossificazione embrionale oltre a riassorbimenti ed aborti (Gervais *et al.*, 2010)

Neurotossicità

La somministrazione di imidacloprid in singola dose a concentrazioni crescenti a ratti suddivisi in gruppi in base al sesso, ha permesso di osservare al dosaggio maggiore (310 mg/kg) alcuni decessi e la comparsa di tremori, epistassi, ematuria ed atassia in animali di entrambi i sessi. Tali sintomi tendevano alla remissione in 1-5 giorni (Rapporto JMPR, 2001).

Effetti ambientali

Fauna acquatica L'imidacloprid è tossico per alcune specie di pesci, in particolare per le forme giovanili, e per i crostacei (Cox, 2001).

Uccelli L'imidacloprid è altamente tossico per gli uccelli, ma, soprattutto, per alcune specie come il passero domestico (*Passer domesticus*), la quaglia giapponese (*Coturnix japonica*), il canarino (*Serinus canaria*) ed il piccione (*Columba livia*) (Cox, 2001). Insieme ad acetamiprid e thiacloprid, è quello tra i neonicotinoidi dotato di maggior potere tossico nei confronti degli uccelli (Tomizawa and Casida, 2005).

Api Tra i neonicotinoidi, l'imidacloprid, è quello che mostra maggior potere tossico nei confronti dell' *Apis mellifera*, come dimostra uno studio condotto da Tomizawa e coll. nel 2003.

ACETAMIPRID

Generalità

L'acetamiprid è un neonicotinoide di prima generazione, appartenente al gruppo dei neonicotinoidi cloronicotinici. Può presentarsi come cristalli o polvere bianca inodori (EPA Pesticide Fact Sheet, 2002).

Impiego

L'acetamiprid è utilizzato per il controllo di insetti appartenenti agli ordini *Rynchota*, *Thysanoptera*, e *Lepidoptera*. Può essere applicato a livello di foglie o suolo per proteggere numerose specie vegetali, tra cui ortaggi fogliosi, alberi da frutta, viti, piante di cotone, piante di tè, piante ornamentali e fiori. È utilizzato anche in ambito domestico per eliminare termiti o altri insetti infestanti (Roberts and Hutson, 1999; EPA Pesticide Fact Sheet, 2002).

Destino ambientale

L'acetamiprid è una molecola poco persistente nell'ambiente. Nel suolo ha vita media di 1-8 giorni, ed è rapidamente degradato tramite reazioni ossidative. Il processo metabolico si conclude con la mineralizzazione, ossia con la formazione di diossido di carbonio. In acqua è trasformato in maniera relativamente rapida in condizioni di aerobiosi, mentre in anaerobiosi il suo tempo di persistenza si aggira intorno ai 45 giorni, poiché, in tali condizioni, si ha un rallentamento della sua degradazione (Roberts and Hutson, 1999).

L'acetamiprid ha una scarsa tendenza alla volatilizzazione ed è dotato di una mobilità che va da moderata ad elevata. Nonostante sia un composto relativamente mobile nel suolo, la rapida degradazione a cui è sottoposto permette di escludere che sia alto il rischio di contaminazione delle falde freatiche tramite

dilavamento. Non si può, però, affermare lo stesso per i suoi prodotti di trasformazione, che, essendo dotati di maggior persistenza nell'ambiente, rappresentano un potenziale rischio di contaminazione delle acque sotterranee (EPA Pesticide Fact Sheet, 2002).

Comportamento nelle piante

Uno studio svolto sul comportamento dell'acetamiprid dopo applicazione a livello fogliare nella pianta di insalata, ha evidenziato che il composto è assorbito dalle foglie e penetra in esse ma è scarsamente traslocato. La molecola principalmente rilevata dopo 63 giorni dall'applicazione è l'acetamiprid (67% della quantità applicata), mentre i metaboliti dimetil-acetamiprid, acido 6-cloronicotinico, alcool 6-cloropicolinico ed il suo coniugato glicosidico sono presenti in piccole percentuali (Roberts and Hutson, 1999; Rapporto JMPR, 2011).

Comportamento nei mammiferi

L'acetamiprid, dopo somministrazione orale nel ratto, è rapidamente assorbito, con raggiungimento del picco ematico nell'arco di 2-3 ore. Si distribuisce in maniera sistemica nell'organismo e le concentrazioni più alte del composto si riscontrano in ghiandole surrenali, fegato e reni. La dose somministrata è metabolizzata quasi totalmente, infatti, la biotrasformazione interessa il 79-86% della quantità totale di acetamiprid somministrata. La quota non metabolizzata si ritrova intatta in feci ed urine. Via di eliminazione principale è quella urinaria (53-65% della quantità totale). L'assorbimento dopo esposizione cutanea è scarso, nell'arco di 24 ore viene assorbito circa il 30% della dose applicata (EPA Pesticide Fact Sheet, 2002).

Tossicità acuta

La dose letale orale in topo e ratto va da 140 a 417 mg/kg p.c., quella cutanea supera i 2000mg/kg p.c., mentre la concentrazione letale per inalazione è sopra agli 1,5 mg/L di aria. Tali valori indicano una elevata tossicità del composto per ingestione ed inalazione, ed una tossicità per contatto molto bassa, a causa del lento e ridotto assorbimento cutaneo. I segni clinici legati ad intossicazione da acetamiprid nei mammiferi sono generalizzati e non specifici.

L'acetamiprid non funge da irritante cutaneo né oculare nei conigli testati e non sensibilizza la cute nelle cavie trattate (Rapporto JMPR, 2011).

In Giappone sono stati registrati due casi di avvelenamento per ingestione e i sintomi riportati erano vomito, debolezza muscolare, ipotermia, convulsioni, tachicardia e ipotensione (Imamura *et al.*, 2010).

Tossicità cronica

Studi effettuati su topi, ratti e cani hanno evidenziato la comparsa di effetti tossici simili dopo esposizione orale all'acetamiprid, cioè riduzione nell'assunzione di cibo e calo di peso (Rapporto JMPR, 2011).

Effetti cancerogeni

Test effettuati in topi e ratti, per valutare la potenziale cancerogenicità dell'acetamiprid, hanno dato, in entrambi i casi esiti negativi. Sulla base di ciò, il composto è stato classificato come improbabile cancerogeno per l'uomo (Rapporto JMPR, 2011).

Effetti mutageni

Da test effettuati in vitro, è emerso che l'acetamiprid può indurre aberrazioni cromosomiche, ma poiché non si è avuta conferma di simili effetti biologici in vivo, gli esperti hanno concluso che l'acetamiprid non è dotato di potere mutageno né di potere teratogeno (Rapporto JMPR, 2011).

Neurotossicità

Polli a cui è stato somministrato acetamiprid nella dieta in singola dose (30 mg/kg p.c.) hanno manifestato un aumento della frequenza urinaria e una ridotta attività motoria. Altri segni clinici, come tremori e postura "a gobba", sono comparsi a dosaggi maggiori (Rapporto JMPR, 2005).

Effetti ambientali

Fauna acquatica Secondo l'EPA, l'acetamiprid è scarsamente tossico nei confronti di pesci ed organismi acquatici.

Uccelli L'acetamiprid è tra i neonicotinoidi più tossici per gli uccelli (LD50 orale nella quaglia giapponese = 180 mg/kg) (Tomizawa and Casida, 2005).

Api Secondo l'EPA, l'acetamiprid è moderatamente tossico per le api.

THIAMETHOXAM

Generalità

Il thiamethoxam, primo neonicotinoide di seconda generazione ad essere sintetizzato e lanciato sul mercato, origina da modifiche apportate alla struttura dell'imidacloprid, ovvero la sostituzione del gruppo 6-cloro-3-piridile con il gruppo 2-cloro-5-tiazolico e l'introduzione di un gruppo metilico con funzione di farmacoforo. Tali variazioni ne hanno potenziato l'efficacia, sia in termini di spettro d'azione che di durata d'azione (Maienfisch *et al.*, 2001). Rispetto ad imidacloprid e acetamiprid, lo si può, infatti, utilizzare a dosi inferiori, ottenendo una maggior attività insetticida nei confronti di numerosi insetti. È prodotto in forma di polvere cristallina o granuli di colore marrone chiaro inodori (NRA, 2001).

Impiego

Il thiamethoxam è un insetticida a largo spettro, utilizzato per trattamenti fogliari, del suolo e per la concia dei semi. È efficace nei confronti di numerosi insetti con apparato buccale pungente, succhiante e masticatore, come afidi, tisanotteri, coleotteri, chilopodi, tentredini, minatori delle foglie, minatori del fusto, termiti. In commercio è presente in varie formulazioni: fluidi concentrati utilizzati per la concia delle sementi, granuli, sospensioni concentrate, granuli e polveri idrodispersibili. È un composto versatile nei metodi d'applicazione ed è utilizzabile per la protezione di numerose piante ed ortaggi, ma in particolare per sorgo, mais e cotone (Roberts and Hutson, 1999; Maienfisch *et al.*, 2001).

Destino ambientale

Il thiamethoxam ha un tempo di persistenza nel suolo che va dai 7 ai 109 giorni. Nel suolo è probabilmente degradato tramite idrolisi, mentre in acqua è sottoposto a fotolisi. Il composto è dotato di elevata mobilità nel suolo ed è altamente

solubile in acqua, caratteristica che tende a far escludere un suo possibile accumulo nel suolo (NRA, 2001).

Comportamento nelle piante

Secondo quanto riportato in un dossier pubblicato dalla NRA (National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals) nel 2001, il thiamethoxam, dopo applicazione a livello di suolo o quando utilizzato per il trattamento dei semi, si distribuisce nella pianta in maniera acropeta, raggiungendo i vari distretti vegetali, tra cui i coleottili, i cotiledoni e le giovani foglie. Studi effettuati su piante di mais e di riso derivate da semi conciate e su piante di lattuga cresciute su terreno trattato con thiamethoxam, hanno permesso di osservare che il residuo riscontrato in prevalenza, dopo la raccolta, era il thiamethoxam tal quale. Motivo della prevalenza del composto madre è che il thiamethoxam è metabolizzato molto lentamente nella pianta e quindi è disponibile in forma inalterata per un lungo periodo di tempo, da qui deriva anche la sua azione prolungata.

Comportamento nei mammiferi

Il thiamethoxam nel ratto, dopo somministrazione orale, è rapidamente assorbito ed altrettanto rapidamente si distribuisce nei tessuti ed è eliminato.

La distribuzione nei tessuti avviene in modo non selettivo, anche se le maggiori concentrazioni si riscontrano in fegato e sangue. Vita media nei tessuti è di 2-6 ore, indipendentemente dalla dose somministrata e dal sesso dell'animale. Il 20-30% circa della dose somministrata è metabolizzata, mentre la restante quota è escreta tal quale con le urine. L'escrezione del composto avviene in tempi brevi: in 24 ore circa oltre l'85% della dose somministrata è eliminata con le urine, la restante quota con le feci.

Dal confronto in vitro dell'iter metabolico del thiamethoxam in ratto, topo ed uomo, si è visto che i microsomi epatici dell'uomo metabolizzano il thiamethoxam in maniera del tutto simile a quelli del ratto (California Department of Pesticide Regulation, 2008).

Tossicità acuta

Il thiamethoxam mostra bassa tossicità acuta orale in topo e ratto, considerato che la dose letale orale è pari a 1563 mg/kg p.c. nel ratto e 871 mg/kg p. c. nel topo. Segni di tossicità acuta mostrati dalle specie surrogate sono: ridotta attività motoria e convulsioni. La tossicità per contatto è molto bassa (LD50 dermale nel ratto > 2000 mg/kg p. c.).

Il thiamethoxam nel coniglio non causa irritazione cutanea né oculare e non si comporta da sensibilizzante cutaneo nella cavia (Rapporto JMPR, 2010).

Tossicità cronica

Per valutare gli effetti conseguenti all'esposizione orale per alcune settimane al thiamethoxam, sono stati eseguiti studi su topi, ratti e cani.

Dalla sperimentazione è emerso che, sia nei topi che nei ratti, organo bersaglio del thiamethoxam era il fegato, che mostrava ipertrofia, infiltrazione di cellule infiammatorie e pigmentazione degli epatociti e delle cellule del Kupffer.

Nel ratto, altro organo target era il rene, che presentava lesioni con caratteristiche diverse nei due sessi. Nel maschio la nefrotossicità era legata alla presenza di gocce ialine a livello di epitelio tubulare, lesioni tubulari di tipo acuto e cronico, infiltrazione basofila e formazione di precipitati. Nella femmina, invece, si caratterizzava per lesioni tubulari croniche e nefrocalcinosi. Nel ratto, altri organi target erano la milza, che presentava emosiderosi o ematopoiesi extramidollare, e la ghiandola tiroide, che presentava ipertrofia dell'epitelio follicolare (Rapporto JMPR, 2010).

Effetti cancerogeni

Per stimare il potere cancerogeno del thiamethoxam, sono stati testati topi e ratti. Quanto emerso è che i principali organi bersaglio erano il fegato, in ratti di sesso femminile e topi, ed il rene nei topi maschi, organo che presentava lesioni attribuibili alla nefropatia già osservata negli studi a breve termine.

A basse dosi, le lesioni epatiche osservate nel topo erano sovrapponibili a quelle

riscontrate negli studi a breve termine, ad alte dosi il thiamethoxam, invece, aveva manifestato nel topo la sua potenziale cancerogenicità con la comparsa di adenomi epatocellulari in soggetti di entrambi i sessi e adenocarcinomi epatocellulari solo nei maschi (Rapporto JMPR, 2010).

Alcuni ricercatori hanno studiato e confrontato in vitro i processi metabolici a cui è sottoposto il thiamethoxam, utilizzando dei preparati microsomiali di topo, ratto ed uomo ed hanno concluso che la biotrasformazione del thiamethoxam che si ha nell'uomo è paragonabile a quella che si ha nel ratto, per cui il composto non rappresenterebbe un rischio per l'uomo esposto alle concentrazioni normalmente utilizzate in agricoltura (Green *et al.*, 2005).

Effetti mutageni

Sono stati effettuati numerosi test in vivo ed in vitro per valutare il potenziale potere mutageno del thiamethoxam e nessuno di questi ha evidenziato alterazioni del materiale genico attribuibili al composto in esame (Rapporto JMPR, 2010).

Effetti teratogeni

Studi effettuati in conigli e topi trattati con thiamethoxam durante la gestazione, hanno permesso di osservare fenomeni di tossicità fetale in entrambe le specie, ma a dosaggi diversi (150 mg/kg p. c. al dì nel coniglio; 750 mg/kg p. c. al dì nel topo). La tossicità fetale si è manifestata, in entrambe le specie, con feti di peso ridotto e con anomalie nell'ossificazione; nel coniglio, inoltre, si è presentato anche un aumento dell'incidenza dei feti abortiti (Rapporto JMPR, 2010).

Neurotossicità

Utilizzando come specie surrogata il ratto, sono stati eseguiti una serie di studi mirati ad individuare i possibili effetti del thiamethoxam sul sistema nervoso. Nonostante i trattamenti ripetuti, non è stato osservato alcun segno clinico riconducibile ad un meccanismo di neurotossicità (Rapporto JMPR, 2010).

Effetti ambientali

Fauna acquatica Secondo quanto riportato nel rapporto della NRA, il thiamethoxam è scarsamente tossico per i pesci e gli altri organismi acquatici, sia a seguito di esposizione acuta, sia dopo trattamento con dosi subletali, ma è moderatamente tossico per embrioni ed avannotti di trota iridea, a seguito di un trattamento di 28 giorni pre-schiusa e di 60 giorni post-schiusa.

Uccelli Secondo lo stesso rapporto della NRA del 2001, il thiamethoxam è debolmente tossico per gli uccelli dopo esposizione orale (LD50 orale in quaglie giapponesi = 1552 mg/kg p.c.), e praticamente non tossico in uccelli trattati con dosi subletali nella dieta per alcune settimane.

Api Il thiamethoxam è tra i neonicotinoidi più tossici per le api. Numerosi studi hanno messo in luce i possibili effetti subletali provocati dall'esposizione prolungata al thiamethoxam. Tra gli effetti osservati compaiono ridotta capacità di orientarsi e di tornare all'alveare, calo della memoria olfattiva, calo delle performance di apprendimento e di foraggiamento. Aliouane e coll., in una ricerca effettuata nel 2008, hanno osservato come l'esposizione per contatto al thiamethoxam potesse influenzare il comportamento delle api. Si è osservato un significativo deficit della memoria olfattiva alla dose di 0,1 ng/ape e un calo delle performance di apprendimento, senza alcun effetto sulla memoria, alla dose di 1 ng/ape.

THIACLOPRID

Generalità

Il thiacloprid è un neonicotinoide di seconda generazione, appartenente alla sottoclasse dei tianicotinili. A differenza degli altri neonicotinoidi, è dotato di attività ovocida. Si presenta sotto forma di cristalli inodori (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003).

Impiego

Il thiacloprid è utilizzato per il controllo di insetti con apparato buccale succhiante che infestano alberi da frutta, ortaggi, piante di cotone, fiori e piante ornamentali. Afidi e mosche bianche sono le specie target principali per le piante di cotone, insetti della famiglia Psyllide, ordine Rhyncota, della famiglia Curculionidae, ordine Coleoptera, e la *Cydia Pomonella* appartenente all'ordine Lepidoptera, sono i principali target per la frutta a nocciolo (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003; Rapporto JMPR, 2006).

È presente in commercio in varie formulazioni, che ne permettono l'applicazione a livello di foglie, suolo e semi, come granuli, fluidi concentrati utilizzabili per la concia e granuli da disciogliere in acqua.

Destino ambientale

Il thiacloprid, in condizioni di aerobiosi, mostra vita media di 1-4 giorni. In acqua, nelle stesse condizioni, la vita media del composto è di 10-63 giorni, mentre è stabile in anaerobiosi e, infatti, la sua vita media è di circa un anno.

I principali prodotti di trasformazione che originano dalla biodegradazione del composto sono ammidi ed acidi sulfonici, i quali presentano, rispettivamente, vita media di 32-142 giorni e 12-73 giorni. Il thiacloprid è privo di gruppi funzionali che possano essere idrolizzati, per questo non viene degradato tramite reazioni chimiche di idrolisi; è, inoltre, poco volatile.

La ridotta persistenza nel suolo e la scarsa mobilità, conferiscono al composto un potenziale di dilavamento medio-basso, minimizzando il rischio di contaminazione delle falde acquifere. Al contrario, gli acidi sulfonici, sono dotati di un maggior tempo di persistenza e di una maggiore mobilità, caratteristiche che li rendono dei possibili contaminanti delle acque sotterranee (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003).

Comportamento nelle piante

Le principali reazioni metaboliche che hanno luogo nei vegetali e portano alla degradazione del thiacloprid sono l'idrossilazione dell'anello tiazolidinico, la scissione ossidativa del ponte metilenico con formazione di agliconi, coniugazione degli agliconi con elementi endogeni della pianta, come zuccheri, fosfati o solfati (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003)

Comportamento nei mammiferi

Dopo somministrazione orale nel ratto, il thiacloprid è completamente e rapidamente assorbito ed i massimi livelli di sostanza sono riscontrabili nel plasma a distanza di 1-3 ore dalla somministrazione. L'escrezione si ha, principalmente, con le urine (60-83% della dose somministrata) ed in minor misura con le feci e per via respiratoria ed è relativamente rapida, oltre il 90% della dose, infatti, è escreta nell'arco di 48 ore. L'assorbimento del thiacloprid per via cutanea è scarso (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003).

Tossicità acuta

Da studi svolti nel ratto è emerso che il thiacloprid è moderatamente tossico per via orale (LD50= 396-836 mg/kg) e per inalazione (LC50 = 1233-2535 mg/L). Come per gli altri neonicotinoidi, essendo l'assorbimento cutaneo lento e ridotto, il thiacloprid risulta scarsamente tossico per contatto (LD50 = 2000 mg/kg p. c.). Nei conigli testati, non è irritante per la cute, ma lo è per gli occhi, e nelle cavie non induce sensibilizzazione cutanea (Rapporto JMPR, 2006).

Tossicità cronica

Sia nel topo che nel ratto, l'esposizione orale al thiacloprid per alcune settimane, causa una induzione dose-dipendente degli enzimi epatici, la quale si ripercuote (in entrambe le specie), sul fegato, con conseguente aumento di peso dell'organo, ipertrofia centrolobulare e alterazioni citoplasmatiche degli epatociti. Nel ratto l'esposizione orale al thiacloprid si ripercuote anche sulla tiroide, causando l'incremento della concentrazione ematica degli ormoni tiroidei, l'aumento di peso dell'organo e l'ipertrofia delle sue cellule follicolari. Tali effetti compaiono dopo esposizione orale, per contatto e per inalazione (Rapporto JMPR, 2006).

Effetti cancerogeni

Test sperimentali, effettuati nel topo, hanno evidenziato che il thiacloprid, se assunto per lunghi periodi di tempo e a dosi elevate, può causare nelle femmine l'aumento dell'incidenza di luteomi ovarici e nei maschi l'aumento dell'incidenza degli adenomi tiroidei. A detta degli esperti, il rischio per l'uomo di sviluppare queste forme tumorali in seguito all' ingestione di residui di thiacloprid presenti nei cibi, sarebbe molto basso poiché nei topi è un fenomeno legato, esclusivamente, all'esposizione ad elevate concentrazioni (Rapporto JMPR, 2006).

Effetti mutageni

Studi effettuati sia in vivo che in vitro, hanno dimostrato che il thiacloprid non è un composto potenzialmente mutageno (Rapporto JMPR, 2006).

Effetti teratogeni

Dai dati emersi da prove sperimentali eseguite in coniglio e ratto, gli esperti hanno concluso che il thiacloprid non è tossico per lo sviluppo embrionale e fetale e non è potenzialmente teratogeno (Rapporto JMPR, 2006).

Neurotossicità

Ratti trattati con singola dose di thiacloprid, hanno mostrato alterazioni della locomozione, queste sono comparse a dosaggi diversi nei due sessi: alla dose di 22 mg/kg p.c. per i maschi ed alla dose di 11 mg/kg p.c. per le femmine. Entrambi i sessi hanno manifestato tremori, ptosi, atassia e pupille dilatate al massimo dosaggio (109 mg/kg p.c) (Rapporto JMPR, 2006).

Effetti ecologici

Fauna acquatica Il thiacloprid è altamente tossico per gli invertebrati marini e per i pesci (LC50 orale nella trota iridea = 31 mg/L) (Tomizawa and Casida, 2005).

Uccelli Molto tossico per gli uccelli, sia in seguito a singola esposizione (LD50 orale nella quaglia giapponese = 49 mg/kg p.c), sia per assunzione prolungata con la dieta.

Api Il thiacloprid non mostra spiccata tossicità nei confronti delle api (EPA Pesticide Fact Sheet, 2003).

LA GIORDANIA

Informazioni generali

La Giordania, o Regno Hascemita di Giordania, è situata in Asia Occidentale e confina a nord con la Siria, a nord-est con l'Iraq, ad ovest con Israele e Territori Palestinesi, ad est, sud-est e sud è circondata dall'Arabia Saudita e a sud-ovest è bagnata dal Mar Morto.

Il Paese può essere suddiviso in tre zone: la Valle del Giordano, area fertile sfruttata per l'agricoltura e la pastorizia, situata nella parte occidentale del Paese, l'Altopiano della Transgiordania, dove sono localizzati la gran parte dei centri urbani, e il Deserto della Transgiordania, che si estende ad est.

La popolazione ammonta a circa 6 milioni di abitanti, la lingua ufficiale è l'arabo, ma molto diffusa è la lingua inglese.

La Giordania è una monarchia costituzionale, la cui economia è sostenuta, principalmente, dall'allevamento del bestiame e dal turismo, mentre il settore agricolo e l'industria rivestono un ruolo meno importante. A causa dell'aridità della gran parte del territorio giordano, le aree agricole sono limitate alla valle del fiume Giordano e alla zona che si estende ad est del Mar Morto. Il terreno arabile è destinato, soprattutto, alla coltivazione di cereali, come orzo e mais. Il settore industriale non è molto sviluppato, le industrie maggiori, situate ad est del fiume Giordano, sono giacimenti di fosfato, di rame e di potassio, raffinerie di petrolio ed aziende manifatturiere (Unimondo, 2008). L'allevamento di bestiame rappresenta una importante fetta dell'economia del Paese. Sono allevati, principalmente, ovini (730000 capi) e caprini (696000 capi), ma anche bovini (111000 capi), cammelli e volatili da cortile (DeAgostini, 2010).

Sistemi di allevamento ovino e bovino

I sistemi di allevamento ovino e bovino, in genere, variano da zona a zona in relazione alla disponibilità dei pascoli, alle possibilità finanziarie dell'allevatore e alle sue conoscenze tecniche.

I sistemi di allevamento in Giordania sono:

1) sistema estensivo: questa tipologia rispecchia il tipo di allevamento della pecora tradizionale e nomadico, prevale nelle regioni orientali e meridionali caratterizzate da un clima arido o semi arido. Le greggi si spostano da un luogo all'altro, con o senza mezzi di trasporto a motore, in cerca di pascoli e acqua. L'alimentazione si basa sulle erbe naturali ingerite al pascolo; in inverno si somministrano mangimi per un periodo che dipende dalla ricchezza dei pascoli.

2) sistema semi-estensivo: gli animali sono mantenuti al pascolo per la maggior parte dell'anno. Si muovono nelle zone adiacenti ai pascoli e tornano a passare l'inverno attorno agli stabulari dove la loro alimentazione è integrata con concentrati e foraggi.

3) sistema semi-intensivo: gli animali trascorrono la notte in stalla ma durante la giornata sono fatti pascolare in maniera controllata. La risorsa foraggera proveniente dal pascolo è integrata, secondo le necessità, con foraggi e concentrati.

4) sistema intensivo: riguarda soprattutto i bovini, gli animali vengono tenuti in allevamento per tutto il corso dell'anno, dove godono di diete bilanciate e cure veterinarie. La stabulazione può essere fissa o libera.

Normativa giordana sui prodotti fitosanitari

La normativa vigente in Giordania, stabilisce che, affinché un pesticida possa essere registrato, non deve far parte dei prodotti il cui uso è vietato sul territorio nazionale, o nei Paesi in cui esso è prodotto, per motivi sanitari e/o ambientali, oppure perché contenente sostanze con noto potere cancerogeno, teratogeno e/o mutageno. Nel caso in cui, il pesticida provenga da Stati dotati di sistemi di

registrazione avanzati ed affidabili, nello specifico Paesi dell'Unione Europea, Stati Uniti, Canada, Giappone, ed Australia, la registrazione è consentita, poiché non è ritenuta necessaria alcuna indagine aggiuntiva oltre a quelle già eseguite nel Paese produttore.

I prodotti vengono registrati presso il Ministero dell'Ambiente, previa autorizzazione della *Pesticide Registration Committee*, la quale acconsente alla legalizzazione del prodotto dopo averne valutato l'efficacia, i possibili usi ed i vantaggi legati al suo impiego, assicurandosi che le caratteristiche del prodotto non siano in contrasto con i principi stabiliti dalla normativa. Su consiglio della commissione, il ministero può anche decidere l'annullamento della registrazione di un pesticida, poiché ritenuto non più soddisfacente dei requisiti richiesti sulla base di nuovi accertamenti.

LIMITI MASSIMI DI RESIDUI DEI NEONICOTINOIDI

OGGETTO DELLA RICERCA

Il Regolamento (CE) 1107/2009 definisce "residui" una o più sostanze, compresi i loro metaboliti e i prodotti risultanti dalla loro degradazione o reazione, presenti nei o sui vegetali, prodotti animali edibili, acqua potabile o altrove nell'ambiente, e derivanti dall'impiego di un prodotto fitosanitario.

Per tutelare la salute del consumatore, sono stati stabiliti dagli organi competenti i cosiddetti limiti massimi residuali o LMR. Essi rappresentano la massima concentrazione di una certa sostanza che può essere presente in un alimento destinato al consumo umano.

La determinazione del limite massimo residuale si basa sul principio che l'assunzione quotidiana di residui di una certa sostanza, considerate tutte le possibili fonti alimentari di assunzione, non superi la dose giornaliera accettabile stabilita per quel principio attivo.

Nella tabella 42 sono riportati i limiti residuali massimi di imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid e thiamethoxam fissati per il latte bovino e ovino in Europa e in Giordania.

	Unione Europea	Giordania
	LMR (ppm)	LMR (ppm)
Imidacloprid	0,1	0,1
Acetamiprid	0,05	0,02
Thiacloprid	0,03	0,05
Thiamethoxam	0,05	0,05

Tab.42 Limiti massimi residuali nel latte bovino e ovino attualmente in vigore in Unione Europea e in Giordania.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito in Giordania, in collaborazione con il prof. Khaled Al-Qudah della *Jordan University of Science and Tecnology* di Irbid.

Sono stati raccolti campioni di latte bovino ed ovino in modo casuale. I campioni di latte ovino sono stati raccolti nella zona della valle del fiume Giordano (in fig. 14 nel cerchio blu), da cinque greggi, nel periodo compreso tra aprile e maggio 2011. Si tratta di allevamenti ovini di tipo itinerante, i cui capi si nutrono di erba fresca ingerita al pascolo; mentre nel periodo invernale sono alimentati con mangimi concentrati. I campioni di latte bovino provengono da cinque allevamenti (Fig. 12 e 13) situati nella zona di Al-Mafraq (in fig. 14 nel cerchio rosso) e sono stati raccolti nel periodo tra l'11 ed il 22 marzo 2012.

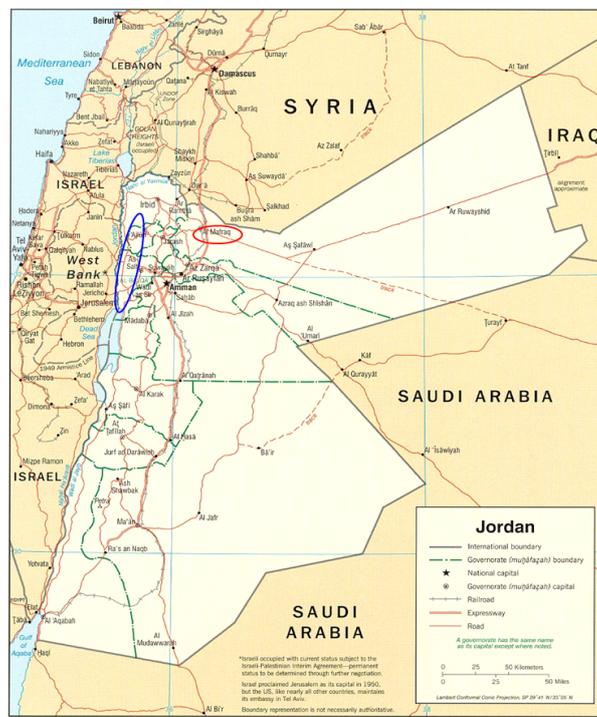
Fig.12. Allevamento bovino in cui è stato eseguito il campionamento.



Fig. 13. Erba fresca, alimento principale della dieta dei bovini sottoposti a campionamento.



Fig. 14. Cartina della Giordania; il cerchio rosso indica la zona (Al-Mafraq) in cui sono concentrati gli allevamenti bovini del Paese, il cerchio blu (valle del fiume Giordano) racchiude l'area in cui gli ovini sono condotti al pascolo.



Questi bovini sono alimentati, principalmente, con erba fresca raccolta nella valle del fiume Giordano, e ciascun capo ingerisce quotidianamente circa 20 kg di erba; in alcuni casi può esserci un'integrazione con piccole quantità di paglia ed insilati. I campioni, ognuno di circa 250 mL, sono stati raccolti in contenitori puliti di plastica e trasportati refrigerati all'università di Irbid.

Preparazione, conservazione e scelta dei campioni

I campioni sono stati liofilizzati e conservati congelati a -20 °C. I campioni sono stati identificati con la lettera F (*Flock*), seguita da un numero romano, che indica l'allevamento di provenienza, e da un numero arabo, che si riferisce all'animale.

La ricerca dei neonicotinoidi imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam e thiacloprid, è stata effettuata su un totale di 68 campioni, di cui 37 di latte ovino (tab. 43) e 31 di latte bovino (tab. 44), entrambi provenienti da 5 diversi allevamenti.

FI	FI I	FIII	FIV	FV
1	1	1	1	1
3	2	2	2	2
4	4	3	3	3
5	5	4	4	
6	8	5	5	
8	9	6	6	
9		7	7	
10		8	8	
		9	9	
		10	10	

Tab. 43 Campioni di latte ovino destinati all'analisi.

FI	FII	FVI	FIX	FXI
2	2	1	1	1
6	3	2	2	2
7	10	4	3	3
N 7		5	4	
8		7	5	
9		8	6	
10		9	7	
		10	8	
			9	
			10	

Tab. 44. Campioni di latte bovino destinati all'analisi.

Messa a punto del metodo analitico

La messa a punto del metodo è stata effettuata presso i laboratori del servizio di Farmacologia e Tossicologia del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università degli Studi di Bologna. L'estrazione dei campioni è stata effettuata nei laboratori della Jordan University of Science and Technology durante il mio periodo di permanenza e l'analisi dei campioni incogniti sono state effettuate dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Bologna.

Gli standard puri dei neonicotinoidi ricercati, imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid e thiamethoxam, sono stati acquistati dalla ditta Sigma.

È stata inizialmente preparata una soluzione "madre" da 1000 ppm di Imidacloprid solubilizzando 10 mg di neonicotinoide in 10 ml di acetonitrile (CH₃CN). Aliquote di questa soluzione sono state diluite per ottenere una soluzione da 10 ppm per valutare, nelle condizioni cromatografiche scelte, il

tempo di ritenzione (RT). Il primo passo è stato quello di preparare una retta di taratura, o curva non estratta, con soluzioni standard di imidacloprid a diverse concentrazioni.

Prelevando quantità variabili delle diverse soluzioni e aggiungendo una certa quantità di fase mobile, si sono ottenute le seguenti soluzioni standard a diversa concentrazione:

- 200 µl 1000 ppm + 1800 F. M. = 100 ppm
- 200 µl 100 ppm + 1800 F. M. = 10 ppm
- 100 µl 100 ppm + 1900 F. M. = 5 ppm
- 50 µl 100 ppm + 1950 F. M. = 2,5 ppm
- 200 µl 10 ppm + 1800 F. M. = 0,5 ppm
- 200 µl 5 ppm + 1800 F. M. = 0,25 ppm
- 200 µl 2,5 ppm + 1800 F. M. = 0,1 ppm
- 200 µl 0,5 ppm + 1800 F. M. = 0,05 ppm

Le soluzioni sono state analizzate in HPLC.

Successivamente, sono state preparate soluzioni standard con concentrazione pari a 100 ppm di ciascuno dei quattro neonicotinoidi oggetto della presente ricerca, imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam e thiacloprid. Dopo opportuna diluizione sono state ottenute soluzioni standard con concentrazione pari a 10 ppm che sono state analizzate singolarmente. L'obiettivo era di valutare sia la risposta in termini di area del picco sia che presentassero tempi di ritenzione diversi in modo da avere la separazione cromatografica dei 4 picchi.

È stata preparata una soluzione "madre mix" da 100 ppm nella quale erano presenti i quattro neonicotinoidi. Utilizzando la soluzione mix e applicando le diluizioni utilizzate per l'imidacloprid da solo sopra riportate, è stata preparata una retta di taratura dei quattro composti.

Il metodo estrattivo-analitico per l'analisi dei neonicotinoidi è stato messo a punto apportando alcune modifiche alla metodica proposta da Seccia e coll. (2008), che prevede l'utilizzo di colonnine Chem Elut con terra di Diatomea.

Il procedimento è il seguente:

- si prelevano 0,5 g da un campione di latte liofilizzato, li si pone in una provetta e vi si aggiungono 4,8 mL di acqua con pipetta graduata da 10 mL;
- si prelevano 0,5 g di latte bovino non contaminato, così da ottenere un campione bianco;
- si prelevano 0,5 g di latte bovino non contaminato e vi si aggiunge una certa quantità di soluzione a concentrazione nota di mix di neonicotinoidi;
- le provette vengono poste in un becker contenente acqua tiepida, così da favorire la completa solubilizzazione del latte;
- le provette sono sottoposte ad agitazione in vortex per circa 10 sec;
- si trasferisce il latte con pipetta Pasteur in una colonnina ChemElut contenente terra di Diatomea e si lasciano trascorrere 15 minuti dal completo assorbimento del latte nella colonnina;
- si eluiscono i neonicotinoidi dalle colonnine ChemElut utilizzando tre frazioni da 5ml di CH₂Cl₂;
- si raccoglie l'eluato;
- si porta a secco il campione in UNIVAPO;
- si risolubilizza il campione con 1 ml di fase mobile (30:70 CH₃CN:H₂O);
- si agitano i campioni in vortex per 10 secondi;
- si sottopongono i campioni ad ultrasuoni per 15 secondi;
- si trasferiscono i campioni in provette eppendorf da 2500µl;
- i campioni sono centrifugati per 4 secondi a 12000 rpm;
- si trasferiscono i campioni in vial per analisi in HPLC.

Prima di procedere con la prima prova di estrazione con tale metodo, sono state allestite soluzioni standard a diversa concentrazione con un mix dei quattro neonicotinoidi, imidacloprid, acetamiprid, thiamethoxam e thiacloprid.

A tal scopo, è stata prelevata una certa quantità di soluzioni da 100 ppm (equivalenti a 100000 ppb) dei singoli neonicotinoidi e la si è diluita con una certa quantità di fase mobile. Si sono, così, ottenute le seguenti soluzioni standard:

- 200 µL di ciascuna soluzione + 1200 µL F. M. = mix 10000 ppb
- 100 µL di ciascuna soluzione + 1600 µL F. M. = mix 5000 ppb
- 50 µL di ciascuna soluzione + 1800 µL F. M. = mix 2500 ppb

Le successive soluzioni sono state ottenute tramite diluizione delle soluzioni di mix di neonicotinoidi con fase mobile:

- 200 μ L mix neo 10000 ppb + 1800 μ L F. M. = mix 1000 ppb
- 200 μ L mix neo 5000 ppb + 1800 μ L F. M. = mix 500 ppb
- 200 μ L mix neo 2500 ppb + 1800 μ L F. M. = mix 250 ppb
- 200 μ L mix neo 1000 ppb + 1800 μ L F. M. = mix 100 ppb

A questo punto, è stata eseguita una prima prova di estrazione, indicata come PROVA PRELIMINARE 1, seguendo il metodo precedentemente descritto.

Sono stati preparati 20 mL di latte con 2 g di latte liofilizzato (*latte 1*) e 20 ml di latte con 4 g di latte liofilizzato (*latte 2*), con l'intento di verificare se i migliori risultati sono ottenuti con campioni di latte concentrato o in proporzioni naturali. Da ciascuno di essi, *latte 1* e *latte 2*, si prelevano 5 ml, ottenendo i campioni *bianco 1* e *bianco 2*, rispettivamente. I 15 mL restanti di *latte 1* e *latte 2* vengono addizionati con 300 μ L di soluzione con concentrazione da 10 ppm di imidacloprid. Sono poi suddivisi in aliquote da 5 mL, ottenendo, così, i campioni *latte 1 A* e *latte 1 B*, *latte 2 A* e *latte 2 B*.

Dopo la valutazione dei risultati ottenuti, i campioni sono stati filtrati e si è ripetuta l'estrazione.

È stata, poi, preparata una retta di calibrazione, o curva estratta, con soluzioni a diversa concentrazione (1000 ppb, 500 ppb, 250 ppb, 100 ppb, 50 ppb, 25 ppb, 10 ppb) di mix di neonicotinoidi.

È stato creato un nuovo metodo in eluizione isocratica, caratterizzato dal cambiamento delle lunghezze d'onda (λ) per ogni standard:

λ IMIDACLOPRID = 271

λ THIAMETHOXAM = 253

λ ACETAMIPRID-THIACLOPRID = 244

È stata iniettata in HPLC la curva precedentemente estratta di mix di neonicotinoidi. Infine, per poter ottenere una migliore separazione dei quattro analiti è stato preparato un metodo con gradiente, caratterizzato dal variare della quantità di acetonitrile durante l'analisi cromatografica: si parte dal 10% di acetonitrile e in 14 minuti si arriva al 21%, in 2 minuti si arriva al 27% ed in 19

minuti al 55%, al 38° minuto, in un minuto, si riporta l'acetonitrile al 10%.

Visti i risultati ottenuti dall'analisi della curva estratta con quest'ultimo metodo, si è deciso di adottarlo per l'analisi dei campioni.

Condizioni cromatografiche

Fase mobile (FM)	30:70 CH ₃ CN:H ₂ O
Flow	1 mL/min
Detection	271 nm imidacloprid 253 nm thiamethoxam 244 nm acetamiprid 244 nm thiacloprid
Injection volume	50 µL

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come riportato nel capitolo “Materiali e metodi”, all'inizio è stata preparata una retta di taratura con soluzioni standard di imidacloprid a diverse concentrazioni allo scopo di poter valutare la linearità nel *range* di concentrazioni di interesse.

L'analisi delle soluzioni standard alla concentrazione di 10 ppm di ciascuno dei quattro neonicotinoidi ha permesso di valutare i singoli tempi di ritenzione. Si sono ottenuti tempi di ritenzione diversi, indice di una buona separazione cromatografica:

- thiamethoxam= 5,15 min
- imidacloprid= 7,2 min
- acetamiprid= 8,2 min
- thiacloprid= 11,8 min

L'analisi della soluzione "mix" dei quattro neonicotinoidi ha confermato la buona separazione cromatografica. Nel cromatogramma riportato in figura 15, è possibile rilevare anche la variazione delle lunghezze d'onda impostate durante la corsa cromatografica.

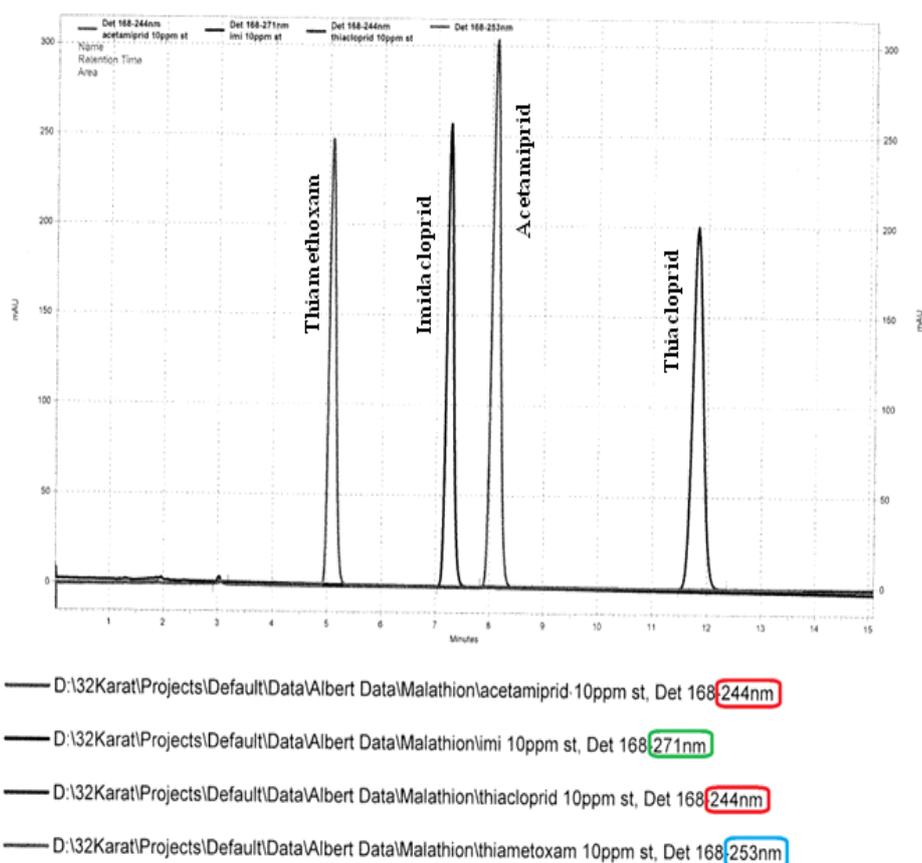


Fig. 15. Cromatogramma con i quattro picchi relativi ai quattro neonicotinoidi.

Per la prima prova di estrazione (PROVA PRELIMINARE 1), è stato utilizzato sia un campione di latte concentrato (*latte 1*), sia un campione di latte in normali proporzioni (*latte 2*), entrambi fortificati con imidacloprid. Non si sono evidenziate differenze per quanto riguarda la percentuale di recupero, ma il tracciato relativo al campione concentrato presentava un maggior numero di

interferenti e, sulla base dei risultati ottenuti, si è deciso di utilizzare campioni in proporzioni normali per l'analisi. La filtrazione del campione estratto non ha migliorato la qualità del cromatogramma, quindi si è deciso di eliminare questo passaggio nel trattamento dei campioni successivi.

Tuttavia, data la presenza di qualche interferente nel cromatogramma, sono state effettuate varie prove modificando il metodo isocratico con un metodo in gradiente. Le varie prove hanno permesso di ottenere un cromatogramma con buona separazione dei picchi degli analiti da quelli degli interferenti. Tale metodo è stato utilizzato per l'analisi delle rette di calibrazione che hanno consentito la valutazione della percentuale di recupero.

Le condizioni estrattivo-analitiche definite consentono di ottenere percentuali di recupero mediamente dell'86% per il thiamethoxam, del 94% per l'imidacloprid, del 99% per l'acetamiprid e del 73% per il thiacloprid. La verifica della linearità è stata eseguita attraverso il calcolo dei coefficienti di correlazione, che sono risultati costantemente superiori a 0,99 per la curva estratta (fig. 16), e pari ad 1 per la curva non estratta (fig.17) nell'intervallo di concentrazioni 25-500 ppb.

Fig. 16. Curva estratta di mix di neonicotinoidi.

Conc. (ppb)	Peak area			
	Thiametoxam	Imidacloprid	Acetamiprid	Thiacloprid
25	n.d.	6705	n.d.	n.d.
50	8284	13693	16991	8281
100	20706	30177	29502	22493
250	50185	72636	86737	55213
500	102533	142117	175368	115805

% rec vs st. rif. del 8/10/12				
Thiametoxam	Imidacloprid	Acetamiprid	Thiacloprid	
	93,23%			
75,17%	95,02%	100,23%	58,27%	
91,26%	98,61%	88,13%	78,34%	
88,54%	95,47%	103,76%	76,88%	
91,44%	90,57%	104,52%	80,96%	
media	86,60%	94,58%	99,16%	73,67%
CV	8,93%	3,14%	7,65%	14,08%

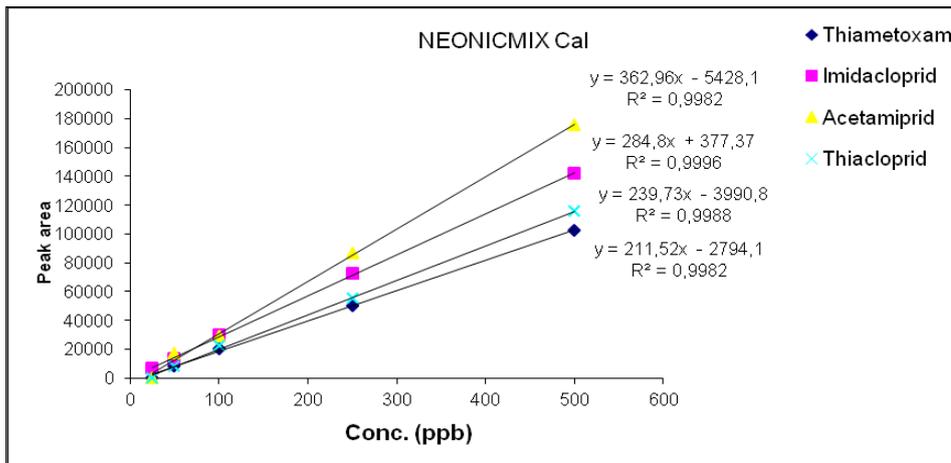
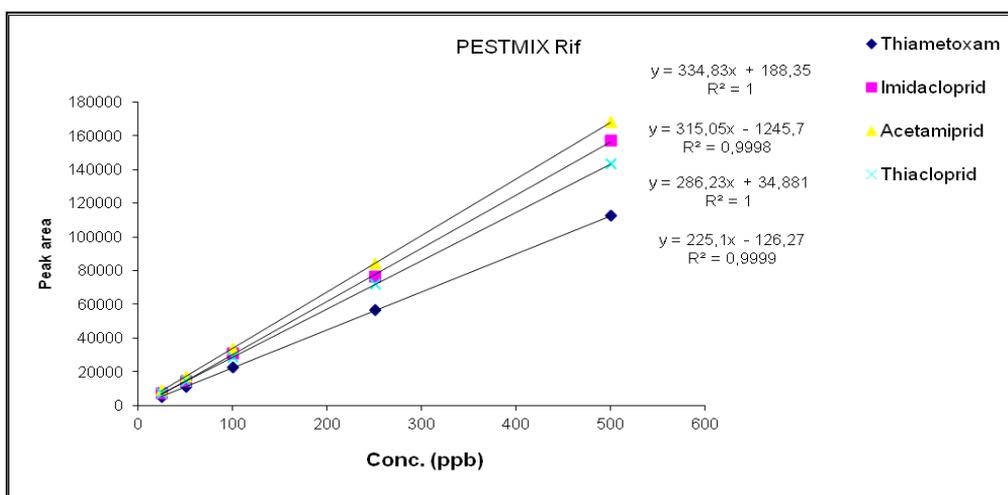


Fig. 17. Curva non estratta di mix di neonicotinoidi.

Conc. (ppm)	Peak area			
	Thiametoxam	Imidacloprid	Acetamiprid	Thiacloprid
25	5075	7192	8865	7152
50	11021	14410	16952	14211
100	22690	30601	33474	28713
250	56660	76079	83592	71820
500	112136	156913	167779	143039



Il Limite di determinazione (LOD) pari a 20 ppb e il Limite di quantificazione (LOQ) pari a 25 ppb sono indice di una buona sensibilità del metodo, sufficiente per l'analisi dei campioni incogniti. Tuttavia, data la disponibilità dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sede di Bologna, si è preferito effettuare le analisi mediante l'utilizzo di un sistema HPLC/MS/MS. Un cromatogramma relativo all'analisi HPLC/MS/MS è riportato in figura 18.

I campioni sono risultati costantemente negativi ai quattro neonicotinoidi ricercati.

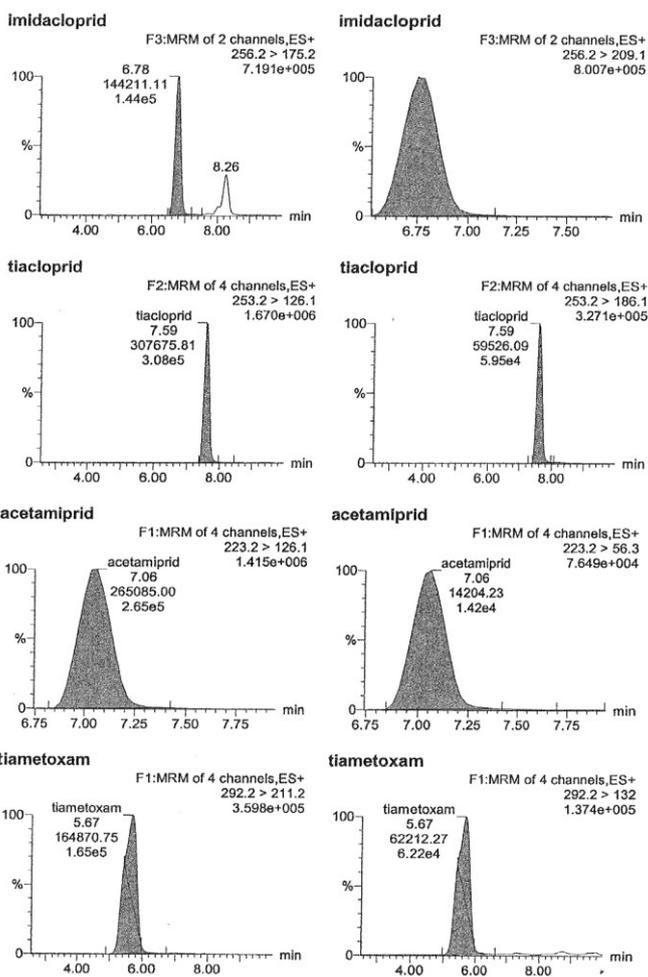
Fig. 18. Cromatogramma relativo all'analisi HPLC/MS/MS

Dataset: C:\MassLynxBackUp\DATA2\neonicotinoidi.PRO\neonicotinoidi universita mz09.qld

Last Altered: Tuesday, March 12, 2013 3:43:01 PM W. Europe Standard Time

Printed: Tuesday, March 19, 2013 1:34:59 PM W. Europe Standard Time

Name: neonicotinoidi mz09 095, Date: 11-Mar-2013, Time: 22:00:16, ID: , Description: univer drog 50 ppb 79



CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Gli insetticidi neonicotinoidi sono applicati con successo per controllare i parassiti in una grande varietà di colture agricole e il loro mercato, stimato intorno a 1 milione di dollari annuo, è correlato al loro selettivo meccanismo di azione a bassi dosaggi (Aliouane *et al.*, 2009). Questi composti sono caratterizzati da un ampio spettro di efficacia, da una azione sistemica e translaminare, da una pronunciata attività residua e condividono lo stesso meccanismo di azione. I neonicotinoidi sono utilizzati su oltre un centinaio di colture diverse, tra cui ortaggi, pomacee e drupacee, agrumi, riso, cotone, mais, patate, barbabietola da zucchero, colza, soia. Inoltre, sono presenti in formulazioni per il controllo dei parassiti negli animali domestici (Elbert *et al.*, 2008).

Utilizzando le key-words “Neonicotinoidi/imidacloprid” e “api” si contano dal 1992 più di 100 articoli con citazioni superiori a 1500 (Blacquièrè *et al.*, 2012), ma ancora si richiedono informazioni/dati sulle concentrazioni, effetti collaterali per una più completa valutazione del rischio. Ancora più problematico risulta l’ambito relativo agli effetti sinergici di “mixtures” di Neonicotinoidi (Iwasa *et al.*, 2004).

Poche informazioni sono riportate relativamente agli effetti sulla salute animale, possibili residui in prodotti di origine animale e conseguente esposizione orale per l’uomo. Da qui la necessità di effettuare dei controlli per valutare l’esposizione a eventuali residui in alimenti di origine animale. Mentre in Europa sono attuati piani di monitoraggio di residui di contaminanti e pesticidi in alimenti destinati all’uomo, in Giordania non esistono sistemi di controllo efficaci. In questo contesto si inserisce l’argomento di questo lavoro.

L’attività agricola in Giordania è strettamente legata all’uso di pesticidi allo scopo di proteggere i vegetali da organismi infestanti e malattie, e di garantire una adeguata produzione agricola. Residui di pesticidi presenti in alimenti destinati ad ovini e bovini, possono depositarsi nei tessuti animali ed essere rilevati in carne o latte destinati al consumo umano.

L'analisi di 68 campioni di latte provenienti dalla Giordania, sulla quale si è incentrato il presente lavoro di tesi, ha condotto al riscontro della costante negatività dei campioni ai quattro neonicotinoidi ricercati. I risultati ottenuti da questo lavoro dimostrano la salubrità del latte e quindi una sicurezza per la salute umana. Tuttavia, la totale assenza degli insetticidi oggetto di questa ricerca, porta ad alcune considerazioni. Ciò potrebbe essere determinato da una limitata diffusione dei neonicotinoidi su erba e colture foraggere destinate all'alimentazione del bestiame, attribuibile al costo relativamente elevato dei prodotti appartenenti a questa classe di insetticidi, che sul territorio giordano sono impiegati, soprattutto, per il trattamento di alberi da frutta. Altra ipotesi potrebbe essere attribuibile alle caratteristiche idrofile dei neonicotinoidi che, se utilizzati correttamente, sarebbero scarsamente trattenuti dal latte che è una emulsione di grassi in acqua.

BIBLIOGRAFIA

- ABOU-ARAB A.A.K. (2001) Heavy metal contents in Egyptian meat and the role of detergent washing on their levels. *Food and Chemical Toxicology* 39 (6), 593-599.
- ABRAHAM A.S., BROOKS B.A, EYLATH U. (1991) Chromium and cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Annals of Nutrition and Metabolism* 35 (4), 203-207.
- ACCENSI F., ABARCA M.L., CANO J., FIGUERA L. & CABAÑES F. J. (2001) Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79: 365-370.
- ADAMS R.M. (1990) Chromium dermal toxicity. In: *Occupational Skin Disease*, 2nd ed., Adams R.M., ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 26-31.
- AHMAD S.A., SAYED S.U., BARUA S., KHAN M.H., JALIL A., HADI S.A., TALUKDER H.K. (2001) Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environmental Health Perspectives* 109 (6), 629-631.
- AHSAN H., CHEN Y., PARVEZ F., ZABLITSKA L., ARGOS M., HUSSAIN I., MOMOTAJ H., LEVY D., CHENG Z.Q., SLAVKOVICH V., VAN GEEN A., HOWE G.R., GRAZIANO J.H. (2006) Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: baseline results from the health effects of arsenic longitudinal study. *American Journal of Epidemiology* 163 (12), 1138-1148.
- AHSAN H., PERRIN M., RAHMAN A., PARVEZ F., STUTE M., ZHENG Y., MILTON A.H., BRANDT-RAUF P., VAN GEEN A.,

- GRAZIANO J. (2000) Associations between drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 42 (12), 1195-1201.
- ALI N, HASHIM NH, SAAD B, SAFAN K, NAKAJIMA M, YOSHIZAWA T (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology*. 43: 1763-1772.
 - ALIOUANE Y., HASSANI A. K., GARY V., ARMENGAUD C., LAMBIN M., GAUTHIER M. (2009), Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effect on behavior. In: *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 28, pp. 113–122
 - ALMELA C., CLEMENTE M.J., VELEZ D., MONTORO R. (2006) Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology* 44 (11), 1901-1908.
 - AL-MODHEFER A.J.A., BRADBURY M.W.B., SIMMONS T.J.B. (1991) Observations on the chemical nature of lead in human blood serum. *Clinical Science* 81, 823-829.
 - AL-NAHEMI H.S. (2011) Estimation of lead and cadmium levels in muscles, livers and kidneys of slaughtered cattle in Mosul City. *Mesopotamia Journal of Agriculture* 39 (3), 8-16.
 - ALTURIQI A.S. and ALBEDAIR L.A. (2012) Evaluation of some heavy metals in certain fish, meat and meat products in Saudi Arabian markets. *Egyptian Journal of Aquatic Research* 38 (1), 45-49.
 - ÁLVAREZ L., GIL A.G., EZPELETA O., GARCÍA-JALÓN J.A. & LÓPEZ DE CERAIN A. (2004) Immunotoxic effects of ochratoxin A in Wistar rats after oral administration. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5): 825-834.

- ANDERSEN O., NIELSEN J.B., SVENDSEN P. (1988) Oral cadmium chloride intoxication in mice - effects of dose on tissue damage, intestinal absorption and relative organ distribution. *Toxicology* 48 (3), 225-236.
- ANDERSON R.A. (1997) Chromium as an essential nutrient for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 26, 35-41.
- ANDERSON R.A. and KOZLOVSKY A.S. (1985) Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition* 41 (6), 1177-1183.
- ANDRÉE S., JIRA W., SCHWIND K.H., WAGNER H., SCHWÄGELE F. (2010) Chemical safety of meat and meat products. A review. *Meat Science* 86 (1), 38-48.
- ARIÑO A, ESTOPAÑAN G, JUAN T, HERRERA A (2007). Estimation of dietary intakes of fumonisins B₁ and B₂ from conventional and organic corn. *Food Control*. 18: 1058-1062.
- ARMENGAUD C., LAMBIN M., GAUTHIER M. (2002), Effects of imidacloprid on the neural processes of memory, In: Devillers, J., Pham-Delegue, M.H., Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals, New York: Taylor & Francis, pp. 85–100
- ARNAU V, MARÍN S, RAMOS AJ, CANO-SANCHO G, SANCHIS V (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*. 53: 133-138.
- ASCHNER M., ONISHCHENKO N., CECCATELLI S. (2010) Toxicology of alkylmercury compounds. *Metal Ions in Life Sciences* 7, 403-434.

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1990) Toxicological Profile for Silver. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp146.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999) Toxicological Profile for Cadmium (Final Report). NTIS Accession No. PB99-166621 [434 pp.].
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (1999a) Toxicological Profile for Mercury. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2003) Toxicological Profile for Selenium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2004) Toxicological Profile for Cobalt. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2004a) Toxicological Profile for Copper. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005) Toxicological Profile for Zinc. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2007) Toxicological profile for Arsenic. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2007a) Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2008) Toxicological profile for Aluminium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2012a) Toxicological profile for Chromium. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp7.pdf>
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2012b) Toxicological profile for Manganese. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp151.pdf>
- AUSTWICK P.K.C. (1975) Balkan Nephropathy. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 68: 219-221.
- AYCICEK H, AKSOY A, SAYGI S (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control. 16: 263-266.

- AZEVEDO B.F., FURIERI L.B., PECANHA F.M., WIGGERS G.A., VASSALLO P.F., SIMÕES M.R., FIORIM J., ROSSI DE BATISTA P., FIORESI M., ROSSONI L., STEFANON I., ALONSO M.J., SALAICES M., VASSALLO D.V. (2012) Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 949048.
- BALLATORI N. and CLARKSON T.W. (1985) Biliary secretion of glutathione and of glutathione-metal complexes. *Fundamental and Applied Toxicology* 5 (5), 816-831.
- BANNON D.I., ABOUNADER R., LEES P.S.J., BRESSLER J.P. (2003) Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 284, C44-C50.
- BÁRÁNY E., BERGDAHL I.A., BRATTEBY L.E., LUNDH T., SAMUELSON G., SKERFVING S., OSKARSSON A. (2005) Iron status influences trace element levels in human. *Environmental Research* 98, 215-223.
- BARRY P.S.I. (1975) Comparison of concentrations of lead in human tissues. *British Journal of Industrial Medicine* 32, 119-139.
- BATISTA B.L., GROTTO D., HORNOS CARNEIRO M.F., BARBOSA F.Jr. (2012) Evaluation of the concentration of nonessential and essential elements in chicken, pork and beef samples produced in Brazil. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 75 (21), 1269-1279.
- BELMADANI A., STEYN P.S., TRAMU G., BETBEDER A.M., BAUDRIMONT I. & CREPPY E.E. (1999) Selective toxicity of ochratoxin A in primary cultures from different brain regions. *Archives of Toxicology*, 73(2): 108-114.

- BELMADANI A., TRAMU G., BETBEDER A.M. & CREPPY E.E. (1998a) Subchronic effects of ochratoxin A on young adult rat brain and partial prevention by aspartame, a sweetener. *Human and Experimental Toxicology*, 17(7): 380-386.
- BELMADANI A., TRAMU G., BETBEDER A.M., STEYN P.S. & CREPPY E.E. (1998b) Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Archives of Toxicology*, 72(10): 656-662.
- BENDELE A.M., CARLTON W.W., KROGH E.B. & LILLEHOJ E.B. (1985) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 75(4): 733-742.
- BERETTA B, DE DOMENICO R, GAIASCHI A, BALLABIO C, GALLI CL, GIGLIOTTI C, RESTANI P (2002). Ochratoxin A in cereal-based baby food: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants*. 19: 70-75.
- BERGDAHL I.A., GRUBB A., SCHUTZ A. DESNICK R.J., WETMUR J.G., SASSA S., SKERFVING S. (1997) Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacology & Toxicology* 81 (4), 153-158.
- BERGDAHL I.A., SHEVELEVA M., SCHUTZ A., ARTAMONOVA V.G., SKERFVING S. (1998) Plasma and blood lead in humans: Capacity-limited binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase and other leadbinding components. *Toxicological Sciences* 46 (2), 247-253.
- BERGDAHL I.A., VAHTER M., COUNTER S.A., SCHUTZ A., BUCHANAN L.H., ORTEGA F., LAURELL G., SKERFVING S. (1999) Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environmental Research* 80 (1), 25-33.

- BERNARD A. and LAUWERYS R. (1986) Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial-chemicals. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 28 (8), 558-562.
- BERNARD A., AMOR A.O., GOEMAREVANNESTE J., ANTOINE J.L., LAUWERYS R., COLIN I., VANDELEENE B., LAMBERT A. (1990) Urinary proteins and red-blood-cell membrane negative charges in diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 190 (3), 249-262.
- BERNER T.O., MURPHY M.M., SLESINSKI R. (2004) Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement. *Food and Chemical Toxicology* 42 (6), 1029-1042.
- BHAT R, RAI RV, KARIM AA (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9: 57-81.
- BIFFI R, MUNARI M, DIOGUARDI L, BALLABIO C, CATTANEO A, GALLI CL, RESTANI P (2004). Ochratoxin A in conventional and organic cereal derivatives: a survey of the Italian market 2001-02. *Food Additives and Contaminants*. 21(6): 586-591.
- Bioreport (2012). L'agricoltura biologica in Italia. 10-14. Disponibile all'indirizzo: www.federbio.it/files/794.pdf (Ultima consult. 12/05/2013).
- BIRZELE B, PRANGE A, KRÄMER J (2000). Deoxynivalenol and ochratoxin A in German wheat and changes of level in relation to storage parameters. *Food Additives and Contaminants*. 17(12): 1027-1035.
- BLANCO-PENEDO I., LÓPEZ-ALONSO M., MIRANDA M., HERNANDEZ J., PRIETO F., SHORE R.F. (2010) Non-essential and essential trace element concentrations in meat from cattle reared under organic, intensive or conventional production systems. *Food Additives and Contaminants* 27 (1), 36-42.

- BODWELL E.J. (2004) Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR) mediated gene activation but not GR mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chemical Research in Toxicology* 17 (8), 1064-1076.
- BODWELL E.J. (2006) Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: complex dose-response effects are shared by several steroid receptors. *Chemical Research in Toxicology* 19 (12), 1619-1629.
- BOISSET M., GIRARD F., GODIN J., BOUDENE C. (1978) Kinetics of pulmonary clearance of inhaled cadmium and of its accumulation in liver and kidneys, in rat. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Série D* 287 (1), 61-64.
- BOSTANIAN N. J., *Reviews in Food and Nutrition Toxicity: Volume 2*, CRC Press, 2005
- BOURAIS I, AMINE A, VENANZI M, MICHELI L, MOSCONE D, PALLESCHI G (2006). Development and application of a two-phase clean-up system in food samples prior to fluorescence analysis of aflatoxins. *Microchimica Acta*. 153: 101-108.
- BRERA C, CATANO C, DE SANTIS B, DEBEGNACH F, DE GIACOMO M, PANNUNZI E, MIRAGLIA M (2006). Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 5014-5019.
- BROOM DM (1986). Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal* 142: 524–526.

- BROWN M.A., THOM J.V., ORTH G.L., COVA P., JUAREZ J. (1964) Food poisoning involving zinc contamination. *Archives of Environmental Health* 8, 657-660.
- BROWN M.H., SZCZECH G.M. & PURMALIS R.P. (1976) Teratogenic and toxic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 37: 331-338.
- BUCHET J.P., LAUWERYS R., ROLES H. (1981) Comparison of the urinary-excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 48 (1), 71-79.
- BUCKLEY H.G. (1971) Fungal nephrotoxicity in swine. *Irish Veterinary Journal*, 25: 194-196.
- BULLERMAN L.B. (1985) Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 18(3): 197-200.
- BUSBY WF, WOGAN GN (1981). Aflatoxin. In: *Mycotoxins and N-Nitroso Compounds: environmental risks*. Volume II, RC Shank (Ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. 193-198.
- CARBONARI F (2012). Rapporto annuale 2012 analisi e dati di settore. L'analisi delle filiere. ISMEA. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/205> (Ultima consultazione 30 aprile 2013).
- CAST (1989). Council for agricultural science and technology mycotoxins: economic and health risk. Task force report n. 116. Ames, Iowa, USA.
- CAST (2003). Council for agricultural science and technology. Mycotoxins: risk in plant, animal and human systems. Task force report n. 139. Ames, Iowa, USA.

- CASTIGLIONE E, BORRIELLO R, CICCARELLI F (2005). L'evoluzione del mercato delle produzioni biologiche. L'andamento dell'offerta, le problematiche della filiera e le dinamiche della domanda. Ismea. Disponibile all'indirizzo <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1371> (Ultima consultazione 1 maggio 2013).
- CAUSIN R. (2004) Micotossine: chi le produce, cosa sono e cosa fanno. Bollettino Settimanale di Informazione ASS.IN.CER. Disponibile all'indirizzo: http://venetoagricoltura.regione.veneto.it/archive/00000068/01/Micotossine_Rcausin.mht (Ultima consultazione: 11.03.2011).
- CAUSIN R (2004). Micotossine: chi le produce, cosa sono e cosa fanno. Bollettino Settimanale di Informazione ASS.IN.CER. In: Rimozione di ocratossina A in un vino modello mediante proteasi acide. SSD AGR/15.
- CAVALIERE C, FOGLIA P, GUARINO C, NAZZARI M, SAMPERI R, LAGANÀ A (2007). A sensitive confirmatory method for aflatoxins in maize based on liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 21: 550-556.
- CEBULSKA-WASILEWSKA A., PANEK A., ZABINSKI Z., MOSZCZYNSKI P., AU W.W. (2005) Occupational exposure to mercury vapour on genotoxicity and DNA repair. Mutation Research 586 (2), 102-114.
- CERUTTI G (1999). Residui, additivi e contaminanti degli alimenti. Tecniche nuove (Ed.), Milano.
- CHANG W.H. and SHOBACK D. (2004) Extracellular Ca²⁺ sensing receptors - an overview. Cell Calcium 35 (3), 183-196.

- CHAPMAN L. and CHAN H.M. (2000) The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environmental Health Perspectives* 108 (suppl 1), 29-56.
- CHASAPIS C.T., LOU SIDOU A.R., SPILIOPOULOU C.A., STEFANIDOU M.E. (2012) Zinc and human health: an update. *Archives of Toxicology* 86 (4), 521-534.
- CHERNOZEMSKY I.N. (1991) Balkan endemic nephropathy and the associated tumours of the urinary system: a summary of epidemiological features in Bulgaria. *IARC Scientific Publications*, 115: 3-4.
- CHERNOZEMSKY I.N., STOYANOV I.S., PETKOVA-BOCHAROVA T.K., NICOLOV I.G., DRAGANOV I.V., STOICHEV I.I., TANCHEV Y., NAIDENOV D. & KALCHEVA N.D. (1977) Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district, Bulgaria. *International Journal of Cancer*, 19(1): 1-11.
- CHERVONA Y., ARITA A., COSTA M. (2012) Carcinogenic metals and the epigenome: understanding the effect of nickel, arsenic and chromium. *Metallomics* 4, 619-627.
- CHIAVARO E, DALL'ASTA C, GALAVERNA G, BIANCARDI A, GAMBARELLI E, DOSSENA A, MARCHELLI R (2001). New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. *Journal Chromatography A*. 937: 31-40.
- CHIBA M. and KIKUCHI H. (1984) The in vitro effects of zinc and manganese on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity inhibited by lead or tin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73 (3), 388-394.

- CHILIKIN V.I. (1947) Osobennosti i spornye voprosy Kliniki, patogeneze i lecheniia alimentarno-toksicheskoi aleikii. Acta Chkalov Institute Epidemiology Microbiology, 2: 145-151. (Cit. da Lutsky & Mor, 1981).
- CHIOU H.Y., HUANG W.I., SU C.L. (1997) Dose-response relationship between prevalence of cerebrovascular disease and ingested inorganic arsenic. Stroke 28, 1717-23.
- CHRISTOVA T., DURIDANOVA D., BRAYKOVA A., SETCHENSKA M., BOLTON T. (2001) Heme oxygenase is the main protective enzyme in rat liver upon 6-day administration of cobalt chloride. Archives of Toxicology 75 (8), 445-451.
- CHUNG J., NARTEY N.O., CHERIAN M.G. (1986) Metallothionein levels in liver and kidney of Canadians - a potential indicator of environmental exposure to cadmium. Archives of Environmental Health 41 (5), 319-323.
- CLEVELAND L.M., MINTER M.L., COBB K.A., SCOTT A.A., GERMAN V.F. (2008) Lead hazards for pregnant women and children: Part 1: immigrants and the poor shoulder most of the burden of lead exposure in this country. Part 1 of a two-part article details how exposure happens, whom it affects, and the harm it can do. American Journal of Nursing 108, 40-49.
- Codex Alimentarius (1999). Linee direttrici in materia di produzione, trasformazione, etichettatura e commercializzazione degli alimenti derivati dall'agricoltura biologica. CAC/GL 32.1999, punto 7. Disponibile all'indirizzo: <http://www.federbio.it/files/842.pdf> (Ultima consultazione 2 maggio 2013).
- COHEN A.J. and ROE F.J.C. (1991) Review of lead toxicology relevant to the safety assessment of lead acetate as a hair coloring. Food and Chemical Toxicology 29 (7), 485-507.

- COHEN M.D. and KARGACIN B. (1993) Mechanism of chromium carcinogenicity and toxicity. *Critical Review in Toxicology* 23 (3), 255-281.
- COLLINS H.L. (2003) The role of iron in infections with intracellular bacteria. *Immunology Letters* 85 (2), 193-195.
- CONCHA G, VOGLER G, LEZCANO D., NERMELL B., VAHTER M. (1998) Exposure to inorganic arsenic metabolites during early human development. *Toxicological Sciences* 44 (2), 185-190.
- COOK W.O., OSWEILER G.D., ANDERSON T.D. & RICHARD J.L. (1986) Ochratoxicosis in Iowa swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 188(2): 1399-1402.
- CORY-SLECHTA D.A. (1996) Legacy of lead exposure: consequences for the central nervous system. *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 114, 224-226.
- COULOMBRE RA (1993). Symposium: biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*. 76: 880-891.
- COX C. (2001), Imidacloprid. In: *Journal of pesticide reform*, Vol. 21, No. 1
- CSANAKY I., NEMETI B., GREGUS Z. (2003) Dose-dependent biotransformation of arsenite in rats – not S-adenosylmethionine depletion impairs arsenic methylation at high dose. *Toxicology* 183 (1-3), 77-91.
- CUNNINGHAM W.C. and STROUBE W.B.Jr. (1987) Application of an instrumental neutron activation analysis procedure to analysis of food. *Science of the Total Environment* 63, 29-43.

- DALL'ASTA C, MOSERITI A, GALAVERNA G, DOSSENA A, MARCHELLI R (2006). Metodi per la determinazione di micotossine negli alimenti. Dipartimento di Chimica Organica e Industriale, Università degli studi di Parma. Informatore fitopatologico 2. Disponibile all'indirizzo: <http://venetoagricoltura.regione.veneto.it/archive/00000865/> (Ultima consultazione 17 maggio 2013).
- DANIELS C.E., JETT Jr (2005) Does interstitial lung disease predispose to lung cancer? *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11 (5), 431-437.
- D'ARCO G, FERNÁNDEZ-FRANZÓN M, FONT G, DAMIANI P, MAÑES J (2009). Survey of fumonisins B₁, B₂, and B₃ in conventional and organic retail corn products in Spain and Italy and estimated dietary exposure. *Food Additives and Contaminants: Part B: Surveillance*. 2(2): 146-153.
- DAVIDSSON L., CEDERBLAD A., HAGEBO E. (1988) Intrinsic and extrinsic labeling for studies of manganese absorption in humans. *Journal of Nutrition* 118 (2), 1517-1521.
- DAVIES N.T. and CAMPBELL J.K. (1977) The effect of cadmium on intestinal copper absorption and binding in the rat. *Life Sciences* 20 (6), 955-960.
- DAYAN A.D. and PAINE A.J. (2001) Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. *Human & Experimental Toxicology* 20 (9), 439-51.
- DE MATTIA G. and BRAVI M.C. (2004) Impairment of cell and plasma redox state in subjects professionally exposed to chromium. *American Journal of Industrial Medicine* 46, 120-125.
- DEBETTO P. and LUCIANI S. (1988) Toxic effect of chromium on cellular metabolism. *Science of the Total Environment* 71, 365-377.

- DELLEDONNE M (2006). Micotossine. Riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico. Edagricole (Ed.) 3: 21-22.
- DELLEDONNE M. (2006) Micotossine: riconoscimento e prevenzione delle micotossicosi di interesse medico. Edagricole, Bologna. 139 pp.
- DELMULLE B, DE SAEGER S, ADAM A, DE KIMPE N, VAN PETEGHEM C (2006). Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 16 mycotoxins on cellulose filters and in fungal cultures. Rapid Commun Mass Spectrom. 20: 771-776.
- DEVEGOWDA G. & MURTHY T.N.K. (2005) Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. In: The mycotoxin blue book. DIAZ D.E. (Ed). Nottingham University Press, Nottingham, pp. 25-56.
- DI GIULIO C., DATA P.G., LAHIRI S. (1991) Chronic cobalt causes hypertrophy of glomus cells in the rat carotid body. American Journal of Physiology 261, C102-C105.
- DI SILVESTRO R.A. (1990) Influence of dietary copper, copper injections and inflammation on serum caeruloplasmin activity levels. Nutrition Research 10 (3), 355-358.
- DIAZ GJ, CORTES A, ROLDAN L (2005). Evaluation of the efficacy of four feed additives against the adverse effects of t-2 toxin in growing broiler chickens. J. Applied Poult. Res. 14: 226-231.
- DIMITROV P.S., SIMEONOV V.A. & STEIN A.D. (2001) Balkan endemic nephropathy in Vratza, Bulgaria, 1964-1987: an epidemiological analysis of population disease registers. European Journal of Epidemiology, 17(9): 847-853.

- DOGANOC D.Z. (1996) Lead and cadmium concentrations in meat, liver and kidney of Slovenian cattle and pigs from 1989 to 1993. *Food Additives and Contaminants* 13 (2), 237-241.
- DÖLL S, VALENTA H, DÄNICKE S, FLACHOWSKY G (2002). Fusarium mycotoxins in conventionally and organically grown grain from Thuringia/Germany. *Landbauforschung Völkenrode*. 52(2): 91-96.
- DONALDSON R.M. and BARRERAS R.F. (1966) Intestinal absorption of trace quantities of chromium. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 68 (3), 484-493.
- DONG J.T. and LUO X.M. (1993) Arsenic-induced DNA-strandbreaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutation Research* 302 (2), 97-102.
- DOYLE J. J. and SPAULDING E. (1978) Toxic and essential trace elements in meat: a Review. *Journal of animal science*, 47, 398-419.
- DRAGONI I, CANTONI C, PAPA A, VALLONE L (1997). Muffe, alimenti e micotossicosi. Città Studi Edizioni, Milano. In: Fumispore opp. Lotta alle muffe ed ai batteri nelle aziende alimentari. Pubblicato da International PBI S.p.A. Disponibile all'indirizzo: <http://www.internationalpbi.it/docs/PBI/note-applicative/raccolta-fumispore.pdf> (Ultima consultazione 30 giugno 2013).
- DRASCH G.A., BOHM J., BAUR C. (1987) Lead in human bones. Investigations on an occupationally non-exposed population in southern Bavaria (F.R.G.) I. Adults. *The Science of The Total Environment* 64 (3), 303-315.
- DRINKER P., THOMSON R.M., FINN J.L. (1927) Metal fume fever: II. Resistance acquired by inhalation of zinc oxide on two successive days. *Journal of Industrial Hygiene* 9, 98-105.

- EAST B.W., BODDY K., WILLIAMS E.D., MACINTYRE D., MCLAY A.L. (1980) Silver retention, total body silver and tissue silver concentrations in argyria associated with exposure to an anti-smoking remedy containing silver acetate. *Clinical and Experimental Dermatology* 5 (3), 305-311.
- EATON DL, GROOPMAN JD (1994). The toxicology of the Aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press London, UK.
- EC (European Commission) (2002). SCOOP, task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, Reports on tasks for scientific cooperation. January. Disponibile all'indirizzo: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf (Ultima consultazione 11.03.2011)
- ECOBICHON D. J. , "Effetti tossici dei pesticidi".In: Amdur M. O., Doull J, Klaassen C.D., Tossicologia, EMSI, 1993
- EFSA (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. Question n° EFSA-Q-2005-154. Adopted on 4 April 2006. The EFSA Journal, 365: 1-56.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2006) Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Available from: www.efsa.europa.eu/it/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf
- EFSA (European Food Safety Authority) (2008) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) on a request from the European Commission on mercury as undesirable substance in feed. The EFSA Journal 654, 1-74.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2008a) Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials on a request from European Commission on safety of aluminium from dietary intake. The EFSA Journal 754, 1-34.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2008b) The Al-Zn of element toxicity: A summary of the toxicological information on 24 elements. TOX/2008/29 Annex B.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009) EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on the use of cobalt compounds as additives in animal nutrition. The EFSA Journal 7(12), 1383 [45 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009a) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Scientific Opinion on Arsenic in Food. The EFSA Journal 7(10), 1351 [199 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009b) Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in Food Chain (CONTAM) on a request from the European Commission on cadmium in food. The EFSA Journal 980, 1-139.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009c) Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food on manganese ascorbate, manganese aspartate, manganese bisglycinate and manganese pidolate as sources of manganese added for nutritional purposes to food supplements following a request from the European Commission. The EFSA Journal 1114, 1-23.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009d) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to copper and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 263, 1726), function of the immune system (ID 264), maintenance of connective tissues (ID 265, 271,

1722), energy yielding metabolism (ID 266), function of the nervous system (ID 267), maintenance of skin and hair pigment (ID 268, 1724), iron transport (ID 269, 270, 1727), cholesterol metabolism (ID 369), and glucose metabolism (ID 369) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) The EFSA Journal 7, 1211 [21 pp.].

- EFSA (European Food Safety Authority) (2009e) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to iron and formation of red blood cells and haemoglobin (ID 249, ID 1589), oxygen transport (ID 250, ID 254, ID 256), energy-yielding metabolism (ID 251, ID 1589), function of the immune system (ID 252, ID 259), cognitive function (ID 253) and cell division (ID 368) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 on request from the European Commission. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). The EFSA Journal 7, 1215 [20 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Scientific Opinion on Lead in Food. The EFSA Journal 8 (4), 1570 [151 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010b) Scientific Opinion on the safety of chromium picolinate as a source of chromium added for nutritional purposes to foodstuff for particular nutritional uses and to foods intended for the general population. Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). The EFSA Journal 8 (12), 1883 [49 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2010c) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to iron and formation of red blood cells and haemoglobin (ID 374, 2889), oxygen transport (ID 255), contribution to normal energy-yielding metabolism (ID 255), reduction of tiredness and fatigue (ID 255, 374, 2889), biotransformation of xenobiotic

substances (ID 258), and “activity of heart, liver and muscles” (ID 397) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). The EFSA Journal 8, 1740 [17 pp.].

- EFSA (European Food Safety Authority) (2010d) Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to zinc and maintenance of normal skin (ID 293), DNA synthesis and cell division (ID 293), contribution to normal protein synthesis (ID 293, 4293), maintenance of normal serum testosterone concentrations (ID 301), “normal growth” (ID 303), reduction of tiredness and fatigue (ID 304), contribution to carbohydrate metabolism (ID 382), maintenance of normal hair (ID 412), maintenance of normal nails (ID 412) and contribution to normal macronutrient metabolism (ID 2890) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). The EFSA Journal 8(10), 1819 [25 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011) Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to copper and reduction of tiredness and fatigue (ID 272), maintenance of the normal function of the nervous system (ID 1723), maintenance of the normal function of the immune system (ID 1725) and contribution to normal energy-yielding metabolism (ID 1729) pursuant to Article 13 of Regulation (EC) No 1924/2006. The EFSA Journal 9(4), 2079 [13 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM): Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food. The EFSA Journal 10 (12), 2985 [241 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012a) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific

Opinion on safety and efficacy of cobalt carbonate as feed additive for ruminants, horses and rabbits. The EFSA Journal 10 (6), 2727 [27 pp.].

- EFSA (European Food Safety Authority) (2012b) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on the safety and efficacy of tetra-basic zinc chloride for all animal species. The EFSA Journal 10 (5), 2672 [19 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012c) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds (E6) as feed additives for all animal species: zinc chelate of amino acids hydrate, based on a dossier submitted by Zinpro Animal Nutrition Inc.. The EFSA Journal 10 (3), 2621 [22 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012d) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds (E6) as feed additive for all animal species: zinc oxide, based on a dossier submitted by Grillo Zinkoxid GmbH/EMFEMA. The EFSA Journal 10 (11), 2970 [24 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012e) Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on safety and efficacy of zinc compounds (E6) as feed additive for all species: zinc sulphate monohydrate, based on a dossier submitted by Grillo-Werke AG/EMFEMA. The EFSA Journal 10 (6), 2734 [23 pp.].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to iron and contribution to normal cognitive development pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). The EFSA Journal 11, 3335 [10 pp.].

- EISLER R. (1986) Chromium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n.6.
- ELBERT A., HAAS M., SPRINGER B., THIELERT W. & NAUEN R. (2008) Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest Management Science* 64:1099–1105.
- ELLEN G., VAN LOON J.W., TOLSMA K. (1989) Copper, chromium, manganese, nickel, zinc in kidneys of cattle, pigs and sheep and in chicken livers in The Netherlands. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 189 (6), 534-537.
- ELLING F. (1979) Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: alterations in enzyme activity in tubular cells. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 87: 237-243.
- ELLING F. (1983) Feeding experiments with ochratoxin A-contaminated barley to bacon pigs. IV: Renal lesions. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A, Animal Science*, 33: 153-159.
- ELLING F., NIELSEN J.P., LILLEHOJ E.B., THOMASSEN M.S. & STØRMER F.C. (1985) Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicology*, 23: 247-254.
- EPA, Pesticide Fact Sheet thiacloprid, (2003). In: http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf
- EPA, Pesticide Fact Sheet acetamiprid, (2002). In: http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-099050_15-Mar-02.pdf

- ERDMANIS L., O'REILLY A.O., WILLIAMSON M.S., FIELD L.M., TURBERG A., WALLACE B. A. (2012), Association of Neonicotinoid Insensitivity with a Conserved Residue in the Loop D Binding Region of the Tick Nicotinic Acetylcholine Receptor. In: *Biochemistry*, Vol. 51, 4627-4629
- EVM (Expert Group on Vitamins and Minerals) (2003). Risk assessment: Chromium. In: *Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. Report on the Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM)*. U.K. Food Standards Agency (FSA), Committee on Nutrition (SACN), Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM), London, Engl.; pp. 172-179. Available from: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/vitmin2003.pdf>
- EXLEY C., BURGESS E., DAY J.P., JEFFERY E.H., MELETHIL S., YOKEL R.A. (2006) Aluminium toxicokinetics. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48 (6), 569-584.
- FAO/UNEP (1979). Prevention of mycotoxins. Recommended practices for the prevention of mycotoxins in food, feed and their products. FAO Food and Nutrition Paper. 10: 1-71. Disponibile all'indirizzo: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036e0q.htm> (Ultima consultazione 21 maggio 2013).
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation) (2001) Safety evaluation of certain mycotoxins in food, prepared by the 56th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Geneva, 6-15 February 2001. FAO Food and Nutrition Paper, 74: 708 pp. - WHO Food Additives, 47: 701 pp.
- FARINA M., ASCHNER M., ROCHA J.B. (2011) Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 256 (3), 405-417.

- FAROOQUI T. (2012), A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. In: *Neurochemistry International*, Vol. 62, 122-136
- FERRANS V.J., HIBBS R.G., WEILBAECHER D.G. (1964) Alcoholic cardiomyopathy: a histochemical and electron microscopic study. *American Journal of Cardiology* 13 (1), 106-107.
- FERSINO V, RAELI M, GIARDINA F (2008). Il biologico nel bacino del Mediterraneo. Politiche, normative e mercati per l'agricoltura di qualità. IAMB-ISMEA. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/1371> (Ultima consultazione 4 maggio 2013).
- FIBL (2007). Forschungsinstitut für Biologischen Landbau. Climate Change and Organic Farming. Whorkshop at BioFach.
- FIBL-IFOAM (2012). The word of organic agriculture. Statistic and emerging trends.
- FINK-GREMMELS, J. (2005) Conclusions from the workshops on Ochratoxin A in food: recent developments and significance, organized by ILSI Europe in Baden (Austria), 29 June-1 July 2005. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 22(1): 1-5.
- FLEMING D.E., BOULAY D., RICHARD N.S., ROBIN J.P., GORDON C.L., WEBBER C.E., CHETTLE D.R. (1997) Accumulated body burden and endogenous release of lead in employees of a lead smelter. *Environmental Health Perspectives* 105, 224-233.
- FLORA G, GUPTA D., TIWARI A. (2012) Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology* 5 (2), 47-58.

- FLORA S.J., FLORA G., SAXENA G. (2006) Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning. In: Lead. Jose S.C., Jose S. eds. Amsterdam: Elsevier Science B.V. pp. 158-228. (citato da: Flora et al., 2012).
- FLORA S.J., FLORA G., SAXENA G., MISHRA M. (2007) Arsenic and lead induced free radical generation and their reversibility following chelation. *Cell and Molecular Biology* 53, 26-47.
- FLORA S.J., PACHAURI V., SAXENA G. (2011) Arsenic, cadmium and lead. *Reproductive and Developmental Toxicology*. (Academic Press) pp 415-438.
- FOULKES E.C. and VONER C. (1981) Effects of Zn status, bile and other endogenous factors on jejunal Cd absorption. *Toxicology* 22 (2), 115-122.
- FRESQUEZ M.R., PAPPAS R.S., WATSON C.H. (2013) Establishment of Toxic Metal Reference Range in Tobacco from US Cigarettes. *Journal of Analytical Toxicology* 37 (5), 298-304.
- FRISVAD J.C. & LUND F. (1993) Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals. In: Occurrence and significance of mycotoxins. SCUDAMORE K.A. (Ed). Central Science Laboratory, London, pp. 146-171.
- FRISVAD J.C. & SAMSON R.A. (2000) *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 45: 201-207.
- FUCHS R. & PERAICA M. (2005) Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Additives and Contaminants, Part A*. 22(1): 53-57.

- FUKUI Y., HOSHINO K., KAMEYAMA Y., YASUI T., TODA C. & NAGANO H. (1987) Placental transfer of ochratoxin A and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food and Chemical Toxicology*, 25: 17-24.
- FURIERI L.B., FIORESI M., JUNIOR R.F., BARTOLOMÉ M.V., FERNANDES A.A., CACHOFEIRO V., LAHERA V., SALAICES M., STEFANON I., VASSALLO D.V. (2011) Exposure to low mercury concentration in vivo impairs myocardial contractile function. *Toxicology and Applied Pharmacology* 255 (2), 193-199.
- GALTIER P. & ALVINERIE M. (1976) In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Annales de Recherches Vétérinaire*, 7: 91-98.
- GALTIER P. (1974) Fate of ochratoxin A in the animal organism. 1: Transport of the toxin in the blood of the rat. *Annales de Recherches Vétérinaire*, 5: 311-318.
- GALTIER P., ALVINERIE M. & CHARPENTEAU J.L. (1981) The pharmacokinetic profiles of Ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19: 735-738.
- GALTIER P., CAMGUILHEM R. & BODIN G. (1980) Evidence for in vitro and in vivo interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. *Food and Cosmetics Toxicology*, 18(5): 493-496.
- GALVANO F, RITIENI A, PIVA G, PIETRI A (2005). Mycotoxins in the Human food Chain. In: *The mycotoxin blue book*. Diaz D.E. (Ed). Nottingham University Press. 187-224.
- GALVANO F., RITIENI A., PIVA G. & PIETRI A. (2005) Mycotoxins in the Human Food Chain. In: *The mycotoxin blue book*. DIAZ D.E. (Ed). Nottingham University Press, Nottingham, pp.187-224.

- GARNER C.D. and NACHTMAN J.P. (1989) Manganese catalyzed auto-oxidation of dopamine to 6hydroxydopamine in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 69 (4), 345-351.
- GARRECHT M. and AUSTIN D.W. (2011) The plausibility of a role for mercury in the etiology of autism: a cellular perspective. *Toxicological and Environmental Chemistry* 93 (5-6), 1251-1273.
- GERVAIS J.A., LUUKINEN B., BUHL K., STONE D. (2010). Imidacloprid Technical Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. In: <http://npic.orst.edu/factsheets/imidacloprid.html>
- GHIDINI S, ZANARDI E, BATTAGLIA A, VARISCO G, FERRETTI E, CAMPANINI G, CHIZZOLINI R (2005). Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. *Food Additives and Contaminants*. 22(1): 9-14.
- GHITA M., STANESCU V., TUDOR L., ILIE L.I., GALIS A.M. (2009) The variabce of selected heavy metals content in different meat types determined by ICP-MS and DRC-ICPMS. *Scientific works C series LV* (1), ISSN 1222-5304.
- GIAVINI E., PRATI M., VISMARA C. (1980) Effects of cadmium, lead and copper on rat preimplantation embryos. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology* 25, 702-705.
- GIRAY B, GIRGIN G, BASAK-ENGIN A, AYDIN S, SAHIN G (2007). Aflatoxin levels in wheat sample consumed in some regions of Turkey. *Food Control*. 18: 23-29.
- GLASER U., KLOPPPEL H., HOCHRAINER D. (1986) Bioavailability indicators of inhaled cadmium compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 11 (3), 261-271.

- GOLDBLATT LA (1969). Aflatoxin. scientific background, control and implications. Academic Press Inc, New York, USA. 472.
- GOLDSMITH S. (1980) Arsenic-induced atypical ventricular tachycardia. *New England Journal of Medicine* 303 (19), 1096-8.
- GOLÍŃSKI P., HULT K., GRABARKIEWICZ-SZCZESNA J., CHEŁKOWSKI J., KNEBLEWSKI P. & SZEBIOTKO K. (1984) Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(6): 1210-1212.
- GONZÁLEZ L, JUAN C, SORIANO JM, MOLTÓ JC, MAÑES J (2006). Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology* 107: 223-227.
- GONZÁLEZ-OSNAYA L, SORIANO JM, MOLTÓ JC, MAÑES J (2007). Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International Journal of Food Microbiology*. 118: 87-91.
- GOYER R.A. (1990) Transplacental transport of lead. *Environmental Health Perspectives* 89, 101-105.
- GRAEME K.A. and POLLACK C.V. (1998) Heavy metal toxicity, part I: arsenic and mercury. A review. *The Journal of Emergency Medicine* 16 (1), 45-56.
- GREEN T., TOGHILL A., LEE R., WAECHTER F., WEBER E., PEFFER R., NOAKES J., ROBINSON M. (2005), Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans Part 2: Species Differences in Response. In: *Toxicological Sciences*, Vol. 86(1), 48-55

- GREEN T., TOGHILL A., LEE R., WAECHTER F., WEBER E., NOAKES J. (2005), Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans Part 1: Mode of Action Studies in the Mouse. In: Toxicological Sciences, Vol. 86(1), 36-47
- GREGER J.L. and SUTHERLAND J.E. (1997) Aluminium exposure and metabolism. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 34 (5), 439-474.
- GREGER J.L., GOETZ W., SULLIVAN D. (1985) Aluminium levels in foods cooked and stored in aluminium pans, trays and foil. Journal of Food Protection 48 (9), 772-777.
- GROSS S.B., PFITZER E.A., YEAGER D.W., KEHOE R.A. (1975) Lead in human tissues. Toxicology and Applied Pharmacology 32, 638-651.
- GULSON B.L. (2008) Stable lead isotopes in environmental health with emphasis on human investigations. The Science of the Total Environment 400, 75-92.
- GULSON B.L., MAHAFFEY K.R., VIDAL M., JAMESON C.W., LAW A.J., MIZON K.J., SMITH A.J., KORSCH M.J. (1997) Dietary lead intakes for mother/child pairs and relevance to pharmacokinetic models. Environmental Health Perspectives 105, 1334-1342.
- GULSON B.L., PALMER J.M., BRYCE A. (2002) Changes in blood lead of a recreational shooter. The Science of The Total Environment 293, 143-150.
- GUMMOW B. (1996) Experimentally induced chronic copper toxicity in cattle. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 63 (4), 277-288.

- HÄGGBLÖM P. (1982) Production of Ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(5): 1205-1207.
- HAINAUT P. and MILNER J. (1993) A structural role for metal ions in the wildtype conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Research* 53, 1739-1742.
- HALL M., GAMBLE M., SLAVKOVICH V., LIU X., LEVY D., CHENG Z., VAN GEEN A., YUNUS M., RAHMAN M., PILSNER Jr., GRAZIANO J. (2007) Determinants of arsenic metabolism: blood arsenic metabolites, plasma folate, cobalamin, and homocysteine concentrations in maternal-newborn pairs. *Environmental Health Perspectives* 115 (10), 1503-1509.
- HALSTENSEN A.S., NORDB K.C., ELEN O. & EDUARD W. (2004) Ochratoxin A in grain dust-estimated exposure and relations to agricultural practices in grain production. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 245-254.
- HAMBIDGE K.M., CASEY C.E., KREBS N.F. (1986) Zinc. In: Trace elements in human and animal nutrition. Vol. 2, Mertz W, 5th ed. New York, NY: Academic Press, 1-137.
- HAOUET M.N. & ALTISSIMI M.S. (2003b) Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale umana - Elaborazione dei dati ottenuti dal 1992 al 1998 (2^a parte). *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*, n. 19. Disponibile all'indirizzo: http://www.spvet.it/arretrati/numero_19/micot.html (Ultima consultazione: 11.03.2011).
- HAOUET MN, ALTISSIMI MS (2003a). Micotossine negli alimenti e micotossicosi animale umana. *Webzine Sanità Pubblica Veterinaria*, n.18.: http://www.spvet.it/arretrati/numero_18/micot.html (Ultima consultazione

31 maggio 2013).

- HARDING J.C.S. (2000) Sindrome del deperimento progressivo post-svezzamento (PMWS). Aspetti clinici, epidemiologia e diagnosi. In: Atti della Società italiana di patologia ed allevamento dei suini - XXVI Meeting annuale, pp. 77-86.
- HARRIS E.D. (1993) The transport of copper: Essential and toxic trace elements in human health and disease. *Progress in Clinical and Biological Research* 380, 163-179.
- HARRIS W.R. and MESSORI L. (2002) A comparative study of aluminum(III), gallium(III), indium(III), and thallium(III) binding to human serum transferrin. *Coordination Chemistry Reviews* 228 (2), 237-262.
- HARTWIG A., SCHLEPEGRELL R., BEYERSMANN D. (1990) Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultures of mammalian cells. *Mutation Research* 241, 75-82
- HARVEY R.B., ELISSALDE M.H., KUBENA L., WEAVER E.A., CORRIER D.E. & CLEMENT B.A. (1992) Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *American Journal of Veterinary Research*, 53: 1966-1970.
- HASSAL K.A., *The Biochemistry and Uses of Pesticides*, VCH, 1990
- HEARD M.J. and CHAMBERLAIN A.C. (1982) Effect of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. *Human & Experimental Toxicology* 1 (4), 411-415.
- HEENAN C.N., SHAW K.J. & PITT J.I. (1998) Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *International Journal of Food Microbiology*, 1: 67-72.

- HENQUIN J.C., SCHMEER W., MEISSNER H.P. (1983) Forskolin, an activator of adenylate cyclase, increase Ca²⁺-dependent electrical activity induced by glucose in mouse pancreatic B cells. *Endocrinology* 112 (6), 2218-2220.
- HERNÁNDEZ-MARTINEZ R, NAVARRO-BLASCO I (2010). Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Additives and Contaminants: Part B*. 3(4): 275-288.
- HILL D.S., WLODARCZYK B.J., FINNELL R.H. (2008) Reproductive consequences of oral arsenate exposure during pregnancy in a mouse model. *Birth Defects Research Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 83 (1), 40-47.
- HOLMBERG T., BREITHOLTZ-EMANUELSSON A., HÄGGBLÖM P., SCHWAN O. & HULT K. (1991) *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia*, 116: 169-176.
- HONG J.T., LEE M.K., PARK K.S., JUNG KM., LEE R.D., JUNG H.K., PARK K.L., YANG K.J. & CHUNG Y.S. (2002) Inhibitory effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist on ochratoxin A-induced cytotoxicity and activation of transcription factors in cultured rat embryonic midbrain cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 65(5-6): 407-418.
- HOOGENBOOM LAP, BOKHORST JG, NORTHOLT MD, VAN DE VIJVER LPL, BROEX NJG, MEVIUS DJ, MEIJS JAC, VAN DER ROEST J (2008). Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: a comparison with conventional products. *Food Additives and Contaminants*. 25(10): 1195-1207.
- HUFF J., LUNN R.M., WAALKES M.P., TOMATIS L., INFANTE P.F. (2007) Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 13 (2), 202-212.

- HUGHES BO (1976). Behaviour as an index of welfare. Vth European Poultry Conf. Malta. Disponibile all'indirizzo: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/animalwelfare/52.pdf (Ultima consultazione 29 maggio 2013).
- HUGHES M.F., DEVESA V., ADAIR B.M., STYBLO M., KENYON E.M., THOMAS D.J. (2005) Tissue dosimetry, metabolism and excretion of pentavalent and trivalent monomethylated arsenic in mice after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 208 (2), 186-187.
- HURSH J.B., SCHRAUB A., SATTLER E.L., HOFMANN H.P. (1969) Fate of ²¹²Pb inhaled by human subjects. *Health Physics* 16 (3), 257-267.
- HUSSEIN S.H. & BRASEL M.J. (2001) Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167: 101-104.
- IAI (International Aluminium Institute) (2007) Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. Expert Panel: Krewski, D., Yokel, R.A., Nieboer, E., Borchelt, D., Joshua Cohen, J., Harry, J., Kacew, S., Lindsay, J., Mahfouz, A.M., Rondeau, V. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews* 10 (suppl 1), 1-269.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1990) Chromium, nickel and welding. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 49. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol49/>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, volume 58. Available from:

- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 56: 489-521.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2004) Arsenic and arsenic compounds. IARC Monographs 100C.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2006) Inorganic and organic lead compounds. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human 87, 519. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2013). Agents classified by IARC Monographs. 1-107. Disponibile all'indirizzo: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (Ultima consultazione 8 giugno 2013).
- IBÁÑEZ-VEA M, GONZÁLEZ-PEÑAS E, LIZARRAGA E, LÓPEZ DE CERAIN A (2012). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. Food Chemistry. 132: 35-42.
- IBÁÑEZ-VEA M, GONZÁLEZ-PEÑAS E, LIZARRAGA E, LÓPEZ DE CERAIN A (2012). Co-occurrence of mycotoxins in Spanish barley: A statistical overview. Food Control. 28: 295-298.
- IFOAM. International Federation of Organic Agriculture Movements. Leading, uniting and assisting the Organic Movement since 1972. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ifoam.org/> (Ultima consultazione 20 maggio 2013).

- IHEDIOHA J.N. and OKOYE C.O.B. (2012) Cadmium and lead levels in muscle and edible offal of cow reared in Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88 (3), 422-427.
- IL'YASOVA D. (2005) Cadmium and renal cancer. *Toxicology Applied Pharmacology* 207 (2), 179-186.
- ILYCHOVA S.A. and ZARIDZE D.G. (2012) Cancer mortality among female and male workers occupationally exposed to inorganic lead in the printing industry. *Occupational and Environmental Medicine* 69, 87-92.
- IMAIDA K., HIROSE M., OGISO T., KURATA Y. & ITO N. (1982) Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats. *Cancer Letters*, 16: 137-143
- IMAMURAT., YANAGAWA Y., NISHIKAWA K., MATSUMOTO N., SAKAMOTO T. (2010). Two cases of acute poisoning with acetaminophen in humans. In: *Clinical Toxicology*, Vol. 48(8), 851-853.
- INSKIP M.J., FRANKLIN C.A., BACCANALE C.L., MANTON W.I., O'FLAHERTY E.J., EDWARDS C.M., BLENKINSOP J.B., EDWARDS E.B. (1996) Measurement of the flux of lead from bone to blood in a nonhuman primate (*Macaca fascicularis*) by sequential administration of stable lead isotopes. *Fundamental and Applied Toxicology* 33, 235-245.
- ISMEA (2013). Report. Prodotti biologici. Focus sulla domanda nazionale. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismea.it/flex/cm/pages/ServeAttachment.php/L/IT/D/8%252Ff%252F2%252FD.d5cb257e55547e57856a/P/BLOB%3AID%3D7994> (Ultima consultazione 5 giugno 2013).
- ISS (Istituto Superiore di Sanità) Schede descrittive di cromo, fluoro, manganese, mercurio, nichel e piombo. Available from:

- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (2002) "Heavy metals"- a meaningless term? Prepared for publication by Duffus J.H. *Pure and Applied Chemistry* 74 (5), 793-807.
- IWASA T., MOTOYAMA N., AMBROSE J.T., ROE M.R. (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23:371–378.
- IZLER (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna) (2013) Metodo di prova interno per la ricerca e la determinazione di metalli (piombo, cadmio, cromo, mercurio e arsenico) in alimenti di origine animale e vegetale mediante spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) [11 pagine].
- JAMES H.M., HILBURN M.E., BLAIR J.A. (1985) Effects of meals and meal times on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. *Human & Experimental Toxicology* 4 (4), 401-407.
- JANZEN R., SCHWARZER M., SPERLING M., VOGEL M., SCHWERDTLE T., KARST U. (2011) Adduct formation of Thimerosal with human and rat hemoglobin: a study using liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry (LC/ESI-TOF-MS). *Metallomics* 3 (8), 847-852.
- JÄRUP L., ALFVEN T., PERSSON B., TOSS G. and ELINDER C.G. (1998) Cadmium may be a risk factor for osteoporosis. *Occupational and Environmental Medicine* 55 (7), 435-439.
- JEEJEEBHOY K.N., CHU R.C., MARLISS E.B., GREENBERG G.R., BRUCE-ROBERTSON A. (1977) Chromium deficiency, glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 30 (4), 531-538.

- JOFFE A.Z. (1971) Alimentary Toxic Aleukia, Microbial Toxins. KADIS S., CIEGLER A. & AJL S.J. (Eds). Academic Press, New York, pp. 139-189. (Cit. da Lutsky & Mor 1981).
- JOHNSON R. M., ELLIS M. D., MULLIN C. A., FRAZIER M. (2010),"Pesticides and honey beetoxicity in the United States" , In: Sammataro D., Yoder J. A., Honey Bee Colony Health, CRC Press, 2011
- JOHNSTON H.J., HUTCHISON G., CHRISTENSEN F.M., PETERS S., HANKIN S., STONE V. (2010) A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 40 (4), 328-346.
- JOHREM L., SLORACH S., SUNDSTRÖM B., OHLIN B. (1991) Lead, cadmium, arsenic and mercury in meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle in 1984-1988. *Food Additives and Contaminants* 8 (2), 201-211.
- JOHREM L., SUNDSTRÖM B., ÅSTRAND C., HAEGGLUND G. (1989) The levels of zinc, copper, manganese, selenium, chromium, nickel, cobalt and aluminium in the meat, liver and kidney of Swedish pigs and cattle. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 188 (1), 39-44.
- JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR), Imidacloprid. In: *Pesticide residues in food 2006*
- JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR),Report 2001, Imidacloprid In: *Pesticide residues in food 2001*
- JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR),Report 2010, Thiamethoxam. In: *Pesticide residues in food 2010*

- JOINT FAO/WHO MEETING ON PESTICIDE RESIDUES (JMPR), Report 2011, Acetamiprid. In: Pesticide residues in food 2011
- KALTREIDER R.C. (2001) Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environmental Health Perspectives* 109, 245-251.
- KANISAWA M. & SUZUKI S. (1978) Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Japanese Journal of Cancer Research GANN*, 69: 599-600.
- KELLEN E., ZEEGERS M.P., HOND E.D., BUNTINX F. (2007) Blood cadmium may be associated with bladder carcinogenesis: the Belgian case-control study on bladder cancer. *Cancer Detection and Prevention* 31 (1), 77-82.
- KIESSLING K.H., PETTERSON H., SANDHOLM K. & OLSEN M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 47(5): 1070-1073.
- KIM D.W., KIM K.Y., CHOI B.S., YOUN P., RYU D.Y., KLAASSEN C.D., PARK J.D. (2007) Regulation of metal transporters by dietary iron, and the relationship between body iron levels and cadmium uptake. *Archives of Toxicology* 81 (5), 327-334.
- KINGSTON R.L., HALL S., SIORIS L. (1993) Clinical observations and medical outcomes in 149 cases of arsenate ant killer ingestion. *Journal of Toxicology- Clinical Toxicology* 31 (4), 581-591.
- KJELLSTRÖM T. and NORDBERG G.F. (1978) A kinetic model of cadmium metabolism in the human being. *Environmental Research* 16 (1-3), 248-269.

- KLINGLMAYR C, NÖBAUER K, RAZZAZI-FAZELI E, CICHANA-MARKL M (2010). Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. *Journal of Chromatography B*. 878(2): 187-193.
- KONSRUD G.O., MELDRUM J.B., SALISBURY C.D., HOULAHAN B.J., SASCHENBRECKER P.W, TITTIGER F. (1985) Trace element levels in liver and kidney from cattle, swine and poultry slaughtered in Canada. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 49 (2), 159-163.
- KORÉNEKÓVÁ B., SKALICKÁ M., NAD P. (2002) Concentration of some heavy metals in cattle reared in the vicinity of a metallurgic industry. *Veterinarski Arhiv* 72 (5), 259-267.
- KOTSONIS F.N. and KLAASSEN C.D. (1978) The relationship of metallothionein to the toxicity of cadmium after prolonged oral administration to rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 46 (1), 39-54.
- KOZAKIEWICZ Z., PATERSON R.R.M. & BRIDGE P.D. (1993) Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species. In: *Occurrence and significance of mycotoxins*. SCUDAMORE (Ed.). Central Science Laboratory. London, pp. 64-75.
- KROGH P (1974). Mycotoxic nephropaty. In: *Mycotoxins*. (Ed.) Purchase I.F.H. Elsevier scientific publishing company. Amsterdam, Netherland. 419-428.
- KROGH P. (1974) Mycotoxic porcine nephropathy: a possible model for Balkan endemic nephropathy. In *Endemic Nephropathy. Proceedings of the Second International Symposium on Endemic Nephropathy*. PUCHLEV A. (Ed). Publishing House of the Bulgarian Academy of Science, Sofia, pp. 266-270.

- KROGH P. (1978) Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section A*. 269(1): 1-28.
- KROGH P. (1991) Porcine nephropathy associated with ochratoxin A. In: *Mycotoxins and animal foods*. SMITH J.E. & HENDERSON R. S. (Eds). CRC Press/Lewis Publishers, Boca Raton, FLA, pp. 627-645.
- KROGH P. (1992) Role of ochratoxin in disease causation. *Food and Chemical Toxicology*, 30: 213-224.
- KROGH, P. & ELLING F. (1977) Mycotoxic nephropathy. *Veterinary Science Communications*, 1: 51-63.
- KROGH, P. (1976a) Mycotoxic nephropathy. In *advances in veterinary science and comparative Medicine*. Academic Press, New York, 20: 147-170.
- KROGH, P. (1976b) Epidemiology of mycotoxic porcine nephropathy. *Nordisk Veterinaer Medicin*, 28: 452-458.
- KUIPER-GOODMAN T. & SCOTT P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2: 179-248.
- LAIRON D (2009). Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 30(1): 33-41.
- LANDOLPH J. (1994) Molecular mechanisms of transformation of CH3/10T1/2 Cl 8 mouse embryo cells and diploid human fibroblasts by carcinogenic metal compounds. *Environmental Health Perspective* 102, 119-125.
- LAPARRA J.M., VELEZ D., MONTORO R., BARBERA R., FARRÉ R. (2003) Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51

(20), 6080-6085.

- LARSEN T.O., SVENDSEN A. & SMEDSGAARD J. (2001) Biochemical characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Applied Environmental Microbiology*, 67(8): 3630-3635.
- LAYCOCK I., LENTHALL K. M., BARRATT A. T., CRESSWELL J. E. (2012), Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). In: *Ecotoxicology*, Vol. 21, 1937-1945
- LE CONTE Y., BRUNET J., MCDONNELL C., DUSSAUBAT C., ALAUX C. , "Interactions between Risk Factors in Honey Bees". In: Sammataro D., Yoder J. A., *Honey Bee Colony Health*, CRC Press, 2011
- LEGRUM W., STUEHMEIER G., NETTER K.J. (1979) Cobalt as a modifier of microsomal monooxygenases in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 48 (2), 195-204.
- LENCASTRE A., LOBO M., JOAO A. (2013) Argyria: case report. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 88 (3), 413-416.
- LEWIS R. (2004) Occupational Exposures: Metals. In: *Current Occupational & Environmental Medicine*. LaDou J. editor., 3rd Ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies, Inc. pp. 439-441.
- LIGUORI L. (1993) Iron protein succinylate in the treatment of iron deficiency: Controlled, double blind, multicenter clinical trial on over 1000 patients. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology* 31 (3), 103-123.

- LOCK E.A. & HARD G.C. (2004) Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information. *Critical Reviews in Toxicology*, 34: 211-299.
- LOMBARDI-BOCCIA G., AGUZZI A., CAPPELLONI M., DI LULLO G., LUCARINI M. (2003) Total-diet study: dietary intakes of macro elements and trace elements in Italy. *British Journal of Nutrition* 90 (6), 1117-1121.
- LÓPEZ-ALONSO M., BENEDITO J.L., MIRANDA M., CASTILLO C., HERNÁNDEZ J., SHORE R.F. (2000) Arsenic, cadmium, lead, copper and zinc in cattle from Galicia, NW Spain. *The Science of the Total Environment* 246 (2-3), 237-248.
- LÓPEZ-ALONSO M., BENEDITO J.L., MIRANDA M., CASTILLO C., HERNÁNDEZ J., SHORE R.F. (2003) Mercury concentrations in cattle from NW Spain. *The Science of the Total Environment* 302 (1-3), 93-100.
- LOPEZ-GARCIA R, PARK DL (1998). Effectiveness of post-harvest procedures in management of mycotoxin hazards. In: *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Bhatnagar e Sinha (Ed.) Nwew York, Marcel Dekker.
- LOPEZ-GARCIA R, PARK DL, PHILLIPS TD (1999). Integrated mycotoxin management systems. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins. Tunis, 3-6 March (MYC-CONF/99/6a) 15.
- LUCISANO A. (1994) Arsenico. In: *Tossicologia Veterinaria*. A cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 140-145.
- MA M.S. and LE X.C. (1998) Effect of arsenosugar ingestion on urinary arsenic speciation. *Clinical Chemistry* 44 (3), 539-550.

- MAEDER P, FLIESSBACH A, DUBOIS DE, GUNST L, FRIED P, NIGGLI U (2002). Soil Fertility and Biodiversity in Organic Farming. *Science Magazine*. 296: 1694-1697.
- MAHAFFEY K.R. and ANNEST J.L. (1986) Association of erythrocyte protoporphyrin with blood lead level and iron status in the second National Health and Nutrition Examination Survey, 1976-1980. *Environmental Research* 41 (1), 327-338.
- MAHAFFEY K.R., CORNELIUSSEN P.E., JELINEK C.F. (1975) Heavy metal exposure from foods. *Environmental Health Perspectives* 12, 63-69.
- MAIENFISCH P., HUERLIMANN H., RINDLISBACHER A., GSELL L., DETTWILER H., HAETTENSCHWILER J., SIEGER E., WALTI M. (2001), The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid, In: *Pest Management Science*, Vol: 57, 165-176
- MALKINSON A.M. (2005) Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. *Experimental Lung Research* 31 (1), 57-82.
- MALMAURET L, PARENT-MASSIN D, HARDY JL, VERGER P (2002). Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*. 19(6): 524-532.
- MALO J.L., MALO J., CARTIER A., DOLOVICH J. (1990) Acute lung reaction due to zinc inhalation. *European Respiratory Journal* 3 (1), 111-114.
- MANTON W.I., ROTHENBERG S.J., MANALO M. (2001) The lead content of blood serum. *Environmental Research* 86 (3), 263-273.
- MARIAM I., IQBAL S., NAGRA S.A. (2004) Distribution of some trace and macrominerals in beef, mutton and poultry. *International Journal of Agriculture & Biology* 6, 816-820.

- MARKOVIĆ N., IGNJATOVIĆ I., ČUKURANOVIĆ R., PETROVIĆ B., KOČIĆ B. & STEFANOVIĆ V. (2005) Decreasing incidence of urothelial cancer in Balkan endemic nephropathy region in Serbia. A surgery based study from 1969 to 1989. *Pathologie Biologie*, 53(1): 26-29.
- MAROTO A, BOQUÉ R, RIU J, RUISÀNCHEZ I, ODENA M (2005). Uncertainty in aflatoxin B₁ analysis using information from proficiency tests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382: 1562-1566.
- MARTINI M (2008). I funghi micotossigeni e le micotossine. Rivista on-line di agricoltura, zootecnia e ambiente n. 60, 15 maggio. Disponibile all'indirizzo:
http://www.rivistadiagraria.org/riviste/vedi.php?news_id=205&cat_id=70
(Ultima consultazione 15 maggio 2013).
- MASOERO F, GALLO A, MOSCHINI M, PIVA G, DIAZ D (2007). Carry-over of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*. 1: 1344-1350.
- MATÉS J.M. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 153, 83-104.
- MATOSSIAN M.K. (1980) Poison of the past: molds, epidemics, and history. Yale University Press. New Haven & London, xiv, 190 pp.
- MATSUDA K., KANAOKA S., AKAMATSU M., SATTELLE D.B. (2009), Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids Structural Insights. In: *Molecular Pharmacology*, Vol. 76, 1-10
- MAYURA K., REDDY R.V., HAYES. A.W. & BERNDT W.O. (1982) Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A in rats. *Toxicology*, 25: 175-185.

- McDONALD C., HOQUE R., HUDA N., CHERRY N. (2007) Risk of arsenic-related skin lesions in Bangladeshi villages at relatively low exposure: a report from Gonoshasthaya Kendra. *Bulletin of the World Health Organization* 85 (9), 668-673.
- McELROY J.A., SHAFER M.M., TRENTAM-DIETZ A., HAMPTON J.M., NEWCOMB P.A. (2006) Cadmium exposure and breast cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute* 98 (12), 869-873.
- MEDICAL TOXICOLOGY BRANCH (2008), THIAMETHOXAM Summary of toxicology data. In: *DPR Medical Toxicology*
- MEHARG A.A., SUN G., WILLIAMS P.N., ADOMAKO E., DEACON C., ZHU Y.G., FELDMANN J., RAAB A. (2008) Inorganic arsenic levels in baby rice are of concern. *Environmental Pollution* 152 (3), 746-749.
- MEISNER H. e KROGH P. (1986) Phosphoenolpyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 14: 199-206.
- MILETIĆ-MEDVED M., DOMIJAN A.M. & PERAICA M. (2005) Recent data on endemic nephropathy and related urothelial tumors in Croatia. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 117(17): 604-9.
- MILIĆEVIĆ D., JURIĆ V., STEFANOVIĆ S., JOVANOVIĆ M. & JANKOVIĆ S. (2008) Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and Porcine Nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Science*, 9(11): 2169-2183.
- MILLS J.T. & ABRAMSON D (1982) Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapeseed and cereals in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 37-41.

- MILLS J.T., ABRAMSON D., FROHLICH A.A. e MARQUARDT R.R. (1989) Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. from stored durum wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 11: 357-360.
- MILLS J.T., SEIFERT K.A., FRISVAD J.C. & ABRAMSON D. (1995) Nephrotoxic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*, 130(1): 23-28.
- MINOIA C. and CAVALLERI A. (1988) Chromium in the urine, serum and red blood cells in the biological monitoring of workers exposed to different chromium valency states. *Science of the Total Environment* 71 (3), 213-221.
- MIRAGLIA M. & BRERA C. (1999) Le micotossine. In: *Tossicologia degli alimenti*. CAPUANO A., DUGO G. & RESTANI P. (Eds). UTET, Torino, Italia., pp. 22-28.
- MOHAMED F., GAWARAMMANA I., ROBERTSON T.A., ROBERTS M.S., PALANGASINGHE C., ZAWAHIR S., JAYAMANNE S., KANDASAMY J., EDDLESTON M., BUCKLEY N.A., DAWSON A.H., ROBERTS D.M. (2009), Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. In: *PLoS One*, Vol. 4
- MORRIS C.M., CANDY J.M., OAKLEY A.E., TAYLOR G.A., MOUNTFORT S., BISHOP H., WARD M.K., BLOXHAM C.A., EDWARDSON J.A. (1989) Comparison of the regional distribution of transferrin receptors and aluminium in the forebrain of chronic renal dialysis patients. *Journal of the Neurological Science* 94 (1-3), 295-306.
- MORTON W.E. and CARON G.A. (1989) Encephalopathy: an uncommon manifestation of workplace arsenic poisoning? *American Journal of Industrial Medicine* 15, 1-5.

- MULLER L., ABEL J., OHNESORGE F.K. (1986) Absorption and distribution of cadmium, copper and zinc following oral subchronic low level administration to rats of different binding forms of cadmium (Cd-acetate, Cd-metallothionein, Cd-glutathione). *Toxicology* 39 (2), 187-195.
- MULTHAUP G., SCHLICKSUPP L., HESSE L., BEHER D., RUPPERT T., MASTERS C.L., BAYREUTHER K. (1996) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science* 271, 1406-1409.
- MUNRO I.C., MOODIE C.A., KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P.M. & GRICE H.C. (1974) Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 28: 180-188.
- MUSSI I., CALZAFERRI G., BURATTI M., ALESSIO L. (1984) Behaviour of plasma and urinary aluminium levels in occupationally exposed subjects. *International Archives of Occupational and Environment Health* 54 (2), 155-161.
- MUTTI A., CORRADI M., GOLDONI M., VETTORI M.V., BERNARD A., APOSTOLI P. (2006). Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest* 129 (5), 1288-1297.
- NACHTMANN C, GALLINA S, RASTELLI M, FERRO GL, DECASTELLI L (2007). Regional monitoring plan regarding the presence of aflatoxin M₁ in pasteurized and UHT milk in Italy. *Food Control*. 18: 623-629.
- NASIR MS, JOLLEY ME (2002). Development of a fluorescence polarization assay for the determination of aflatoxin in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3116-3121.

- NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY FOR AGRICULTURAL AND VETERINARY CHEMICALS (NRA) (2001), Evaluation of the new active THIAMETHOXAM in the product CRUISER 350 FS INSECTICIDE SEED TREATMENT
- NAVAS-ACIEN A., GUALLAR E., SILBERGELD E.K., ROTHENBERG S.J. (2007) Lead exposure and cardiovascular disease-a systematic review. *Environmental Health Perspective* 115 (3), 472–482.
- NI M., LI X., YIN Z., SIDORYK-WEGRZYNOWICZ M., JIANG H., FARINA M., ROCHA J.B., SYVERSEN T., ASCHNER M. (2011) Comparative study on the response of rat primary astrocytes and microglia to methylmercury toxicity. *Glia* 59 (5), 810-820.
- NILUFER D, BOYACIOGLU D (2002). Comparative study of three different methods for the determination of aflatoxins in Tahini. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3375-3379.
- NOMIYAMA K. and NOMIYAMA H. (1986) Critical concentration of unbound cadmium in the rabbit renal cortex. *Experientia* 42 (2), 149.
- NORDBERG G.F., KJELLSTROM T., NORDBERG M. (1985) Kinetics and metabolism. In: *Cd and health: A toxicological and epidemiological appraisal*. Vol I: Exposure, Dose and Metabolism. CRC Press, Friberg L. E.C. and Kjellstrom T., Boca Raton, FL, 103-178. (citato da: EFSA, 2009b).
- NORDBERG G.F., PISCATOR M., LIND B. (1971a) Distribution of cadmium among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 29 (5-6), 456-470.
- NORDBERG G.F., PISCATOR M., NORDBERG M. (1971b) On the distribution of cadmium in blood. *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 30 (3-4), 289-295.

- NORDBERG M. and NORDBERG G.F. (2000) Toxicological aspects of metallothionein. *Cellular and Molecular Biology* 46 (2), 451-463.
- NORTHOLT M.D. & BULLERMAN L.B (1982). Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, 45: 519-526.
- NORTHOLT M.D., VAN EGMOND H.P. & PAULSCH W.E. (1979) Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. *Journal of Food Protection*, 42: 485-490.
- O'FLAHERTY E.J. (1996) A physiologically-based model of chromium kinetics in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* 138, 54-64.
- OLIVARES M., PIZARRO F., DE PABLO S., ARAYA M., UAUY R. (2004) Iron, zinc and copper: contents in common Chilean foods and daily intakes in Santiago, Chile. *Nutrition Journal* 20 (2), 205-212
- PARENT-MASSIN D, CONAN JC, LANGLER C, LEVEQUE JM, THISSE M (2002). Analysis of mycotoxin levels in bread, biscuits, muesli, apple juice and apple marmelade prepared from organic raw materials. *Toxicology letters*. 135: 107.
- PARK DL (2002). Effect of processing on aflatoxin. *Mycotoxins Food Safety*. 504: 173-179.
- PARK DL, NJAPAU H, BOUTRIF E (1999). Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) concept. *FAO*. 23: 49-56.
- PARK J.D., CHERRINGTON N.J., KLAASSEN C.D. (2002) Intestinal absorption of cadmium is associated with divalent metal transporter 1 in rats. *Toxicological Sciences* 68 (2), 288-294.

- PERAICA M., DOMIJAN A.M., FUCHS R., LUCIĆ A. & RADIĆ, B. (1999) The occurrence of ochratoxin A in blood in general population of Croatia. *Toxicology Letters*, 110(1-2): 105-112.
- PERCIVAL S.S. and HARRIS E.D. (1990) Copper transport from ceruloplasmin: Characterization of the cellular uptake mechanism. *American Journal of Physiology* 258, C140-C146.
- PETRILLI F.L. and DEFLORE S. (1978) Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutation Research* 54, 139-147.
- PIETRI A, BERNABUCCI U, REYNERI A, VISCONTI A (2004). Come prevenire le aflatossine nel latte. Indicazioni pratiche agli allevatori. *L'Informatore Agrario* 14. Disponibile all'indirizzo: http://www.informatoreagrario.it/BDO/BDO_popupAbstract.asp?D=54542 (Ultima consultazione 1 giugno 2013).
- PITT J.I. (1996) What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*, 7(4): 1.
- PITT J.I. (1987) *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Applied Environmental Microbiology*, 53(2): 266-269.
- PITT JI (1996). What are mycotoxins? *Australian Mycotoxin Newsletter*. 7(4): 1. In: *Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control*. Disponibile all'indirizzo: <http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo7/micotoxinas%202003.pdf> (Ultima consultazione: 15 maggio 2013).
- PIVA G. (2003) Micotossine e allevamento bovino considerazioni. pp. 1-19. Disponibile all'indirizzo: <http://www.clal.it/downloads/articoli/Micotossine%20vacca%20da%20latte.pdf>

- PIVA G., BATTILANI P. & PIETRI A. (2004) Micotossine, un tema globale. In: 1° Congresso Nazionale: le micotossine nella filiera agro-alimentare. Roma, 29-30 novembre 2004. Atti a cura di MIRAGLIA M. & BRERA C. Istituto Superiore di Sanità. Rapporti ISTISAN 05/42, vii, pp. 3-14.
- PLEŠTINA R. (1992) Some features of Balkan endemic nephropathy. *Food and Chemical Toxicology*, 30: 177-181.
- POMPA G (1994). Aflatossine. *Tossicologia veterinaria*. Ambrosiana (Ed.) Milano, Italia. 360-365.
- PRANDINI A, TANSINI G, SIGOLO S, FILIPPI L, LAPORTA M, PIVA G (2009). On the occurrence of aflatoxin M₁ in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*. 47(5): 984-991.
- PRASAD A.S., BREWER G.J., SCHOOMAKER E.B., RABBANI P. (1978) Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *JAMA* 240 (20), 2166-2168.
- PRIEST N.D. (2004) The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminum-26 as a tracer: Review and study update. *Journal of Environmental Monitor* 6 (5), 375-403.
- PUCHLEV A., ASTRUG A., POPOV N. & DOCEV O. (1960) Clinical studies of endemic nephritis. In: *Endemicnijat nefrit v Bulgaria*. Sophia, Bulgaria. PUCHLEV A. (Ed). *Medicina i fizkultura*, pp. 7-17. (Cit. da: Fuchs & Peraica, 2005).
- PULS R. (1994) *Mineral levels in animal health*. 2nd edition. Clearbrook: Sherpa International, 83. (citato da: López-Alonso et al., 2000).

- QUATREHOMME G., RICQ O., LAPALUS P. (1992) Acute arsenic intoxication: forensic and toxicologic aspects (an observation). *Journal of Forensic Sciences* 37 (4), 1163-71.
- QUINTANILLA-VEGA B., HOOVER D.J., SILBERGELD E.K., WAALKES M., ANDERSON L.D. (2000) Lead interaction with human protamine (HP2) as a mechanism of male reproductive toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 13, 594-600.
- RABINOWITZ M.B., KOPPLE J.D., WETHERILL G.W. (1980) Effect of food intake and fasting on gastrointestinal lead absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 33 (8), 1784-1788.
- RABINOWITZ M.B., WETHERILL G.W., KOPPLE J.D. (1976) Kinetic-analysis of lead metabolism in healthy humans. *Journal of Clinical Investigation* 58, 260-270.
- RADOVANOVIĆ Z. (1991) Epidemiological characteristics of Balkan endemic nephropathy in eastern regions of Yugoslavia. *IARC Scientific Publications*, 115: 11-20.
- RAHMAN M., VAHTER M., SOHEL N., YUNUS M., WAHED M.A., STREATFIELD P.K., EKSTROM E.C., PERSSON L.A. (2006) Arsenic exposure and age and sex-specific risk for skin lesions: a population-based casereferent study in Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* 114 (12), 1847-1852.
- RAHMANI A, JINAP S, SOLEIMANY F (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 8(3): 202-251.
- RALSTON N.V.C. and RAYMOND L.J. (2010) Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology* 278 (1), 112-123.

- RAMOS-CATHARINO R, DE AZEVEDO-MARQUES L, SILVA-SANTOS L, BAPTISTA AS, GLÒRIA EM, CALORI-DOMINGUES MA, FACCO EMP, EBERLIN MN (2005). Aflatoxin screening by MALDI-TOF mass Spectrom. Review 5: 54-76.
- Rapporti ISTISAN, 04/15. Istituto Superiore di Sanità, 1123-3117. Trattamento dei dati inferiori al limite di rivelabilità nel calcolo dei risultati analitici Roma 2004. 3.
- RASMUSSEN R.E. and MENZEL D.B. (1997) Variation in arsenic-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes and lymphoblastoid cell lines. Mutation Research 386 (3), 299-306.
- RASTOGI S.K. (2008) Renal effects of environmental and occupational lead exposure. Indian Journal Occupational Environmental Medicine 12, 103-106.
- RATNAIKE R.N. (2003) Acute and chronic arsenic toxicity: a review. Postgraduate Medical Journal 79, 391-396.
- RAVINDRAN A., CHANDRAN P., KHAN S.S. (2012) Biofunctionalized silver nanoparticles: advances and prospects. A review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 105, 342-352.
- RAYMAN M.P. (2000) The importance of selenium to human health: a review. The Lancet 356, 233-241.
- REEVES P.G. and CHANEY R.L. (2008) Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. Science of the Total Environment 398 (1-3), 13-19.
- REYNERI A (2006). Allarme micotossine nella granella di mais. La presenza nella produzione della campagna 2004-2005. Dipartimento di agronomia, selvicoltura e gestione del territorio, Università di Torino. L'Informatore Agrario 4.: <http://www.informatoreagrario.it/BDO/BDO>

[popupAbstract.asp?D=72074](#) (Ultima consultazione 2 giugno 2013).

- ROBERTS T., HUTSON D., *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2, Insecticides and fungicides*, The Royal Society of Chemistry, 1999
- RODRICKS JV, HESSELTINE CW, MEHLMAN MA (1977). *Mycotoxins in Human and Animal Health*. Pathotox. Publ: Park Forest South, IL.
- RODRIGUES J.L., SERPELONI J.M., BATISTA B.L., SOUZA S.S., BARBOSA F.Jr. (2010) Identification and distribution of mercury species in rat tissues following administration of thimerosal or methylmercury. *Archives of Toxicology* 84 (11), 891-896.
- RODRÍGUEZ-ORTÍZ J.C., VALDEZ-CEPEDA R.D., LARA-MIRELES J.L., RODRÍGUEZ-FUENTES H., VÁZQUEZ-ALVARADO R.E., MAGALLANES-QUINTANAR R., GARCÍA-HERNÁNDEZ J.L. (2006) Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of cadmium and lead by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal* 10 (3), 1-10.
- ROELS H., LAUWERYS R.R., BUCHET J.P., BERNARD A., CHETTLE D.R., HARVEY T.C., AL-HADDAD I.K. (1981) In vivo measurement of liver and kidney cadmium in workers exposed to this metal: its significance with respect to cadmium in blood and urine. *Environmental Research* 26 (1), 217-240.
- ROGGEMAN S., DE BOECK G., DE COCK H., BLUST R., BERVOETS L. (2014) Accumulation and detoxification of metals and arsenic in tissues of cattle (*Bos taurus*) and the risks for human consumption. *Science of the Total Environment* 466-467, 175-184.
- ROUSSEAU M.C., PARENT M.E., NADON L., LATREILLE B., SIEMIATYCKI J. (2007) Occupational exposure to lead compounds and risk of cancer among men: a population-based case-control study. *American Journal of Epidemiology* 166, 1005-1014.

- RUDY M. (2009) Correlation of lead, cadmium and mercury levels in tissue and liver samples with age in cattle. *Food Additives and Contaminants* 26 (6), 847-853.
- SAKAMOTO M., KUBOTA M., LIU X.J., MURATA K., NAKAI K., SATOH H. (2004) Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. *Environmental Science & Technology* 38 (14), 3860-3863.
- SAKAMOTO M., KUBOTA M., MURATA K., NAKAI K., SONODA I., SATOH H. (2008) Changes in mercury concentrations of segmental maternal hair during gestation and their correlations with other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. *Environmental Research* 106 (2), 270-276.
- SAKAMOTO M., MURATA K., KUBOTA M., NAKAI K., SATOH H. (2010) Mercury and heavy metal profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. *Ecotoxicology and Environment Safety* 73 (1), 1-6.
- SALEH H.A., EL-AZIZ G.A., EL-FARK M.M., EL-GOHARY M. (2009) Effect of maternal lead exposure on craniofacial ossification in rat fetuses and the role of antioxidant therapy. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38 (5), 392-399.
- SANDSTEAD H.H. (1995) Is zinc deficiency a public health problem? *Nutrition* 11 (suppl. 1), 87-92.
- SANTIN E (2005). Mold growth and mycotoxin production. In: *The Mycotoxin Blue Book*. Diaz D.E. (Ed.) Nottingham University Press, UK. 225-234.

- SAVA V., REUNOVA O., VELASQUEZ A., HARBISON R. E & SÁNCHEZ-RAMOS J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27(1): 82-92.
- SCF (Scientific Committee for Food) (1993) Reports of the Scientific Committee for Food of the European Community. Thirty-first series. Nutrient and energy intakes for the European Community. Commission of the European Communities, Luxembourg.
- SCF (Scientific Committee on Food) 1998 Opinion of the Scientific Committee on Food on Ochratoxin A, expressed on 17 September 1998. The Scientific Committee on Food, the European Commission. Disponibile all'indirizzo:
- SCHUHMACHER M., HERNANDEZ M., DOMINGO J.L., FERNANDEZBALLART J.D., LLOBET J.M., CORBELLA J. (1996) A longitudinal study of lead mobilization during pregnancy: Concentrations in maternal and umbilical cord blood. *Trace Elements and Electrolytes* 13 (4), 177-181.
- SCHUHMACHER-WOLZ U., DIETER H.H., KLEIN D., SCHNEIDER K. (2009) Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects. *Critical Reviews in Toxicology* 39 (4), 271-298.
- SCUDAMORE K.A., CLARKE J.H. & HETMANSKI M.T (1993) Isolation of *Penicillium* strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 82-87.
- SECCIA S., FIDENTE P., MONTESANO D., MORRICA P. (2008) Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1214, 115-120.

- SEDKI A., LEKOUCH N., GAMON S., PINEAU A. (2003) Toxic and essential trace metals in muscle, liver and kidney of bovines from a polluted area of Marocco. *The Science of the Total Environment* 317 (1-3), 201-205.
- SHAW C.A. and TOMLJENOVIC L. (2013) Aluminium in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants and autoimmunity. *Immunologic Research* 56 (2-3), 304-316.
- SHEETS L. P., "Imidacloprid: a Neonicotinoid Insecticide", In: Doull J., Ecobichon D., Gamon D., Hodgson E., Reiter L., Roos J., *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, 2001
- SHUURS A.H.B. (1997) Reproductive toxicity of occupational mercury. A review of the literature. *Journal of Dentistry* 27 (4), 249-256.
- SILVA L, FERNÁNDEZ-FRANZÓN M, FONT G, PENA A, SILVEIRA I, LINO C, MAÑES J (2009). Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food Chemistry*. 112: 1031-1037.
- SINAB. Sistema d'Informazione Nazionale sull'Agricoltura Biologica. Disponibile all'indirizzo: <http://www.sinab.it/> (Ultima consultazione 22 maggio 2013).
- SIROT V., GUERIN T., VOLATIER J.L., LEBLANC J.C. (2009) Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. *Science of the Total Environment* 407 (6), 1875-1885.
- SKERFVING S. and BERGDAHL I.A. (2007) Lead. In: *Handbook on the toxicology of metals*, 3rd edition. Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T.(eds.). Elsevier, pp. 599-643.

- SLOTH J.J. and JULSHAMN K. (2008) Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (4), 1269-1273.
- SMITH D., HERNANDEZ-AVILA M., TELLEZ-ROJO M.M., MERCADO A., HU H. (2002) The relationship between lead in plasma and whole blood in women. *Environmental Health Perspectives* 110, 263-268.
- SMITH D., OSTERLOH J.D., FLEGAL A.R. (1996) Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environmental Health Perspectives* 104, 60-66.
- ŠOŠTARIĆ B. & VUKELIĆ M. (1991) Characteristics of urinary tract tumours in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Scientific Publications*, 115: 29-35.
- STAUBER J.L., FLORENCE T.M., GULSON B.L., DALE L.S. (1994) Percutaneous absorption of inorganic lead compounds. *Science of the Total Environment* 145, 55-70.
- STENERSEN J., *Chemical pesticides mode of action and toxicology*, CRC Press, 2004
- STIL P.E., MACKLIN A.W., RIBELIN W.E. & SMALLEY E.B. (1971) Relationship of ochratoxin A to foetal death in laboratory and domestic animals. *Nature*, 234: 563-564.
- STOEV S.D., GROZEVA N. & HALD B. (1998a) Ultrastructural and toxicological investigations in spontaneous cases of porcine nephropathy in Bulgaria. *Veterinarski Arhiv*, 68 (2): 39-49.

- STOEV S.D., HALD B. & MANTLE P.G. (1998b) Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex of uncertain (mycotoxin) etiology. *Veterinary Record*, 142(8): 190-194.
- STOEV SD, GOUNDASHEVA D, MIRTCHEVA T, MANTLE PG (2000) Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 52(4): 287-296.
- STROKA J, VAN OTTERDIJK R, ANKLAM E (2000). Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. *Journal of Chromatography A*. 904(2): 251-256.
- SUCCI G, TAMBURINI A, SANDRUCCI A (2001). Aflatossine e gestione aziendale: relazioni tra performance della mandria e contaminazione di alimenti e latte. In *Aflatossine nel latte e negli alimenti zootecnici: metodiche analitiche e anamnesi di allevamento. Progetto regionale: ricerca dei determinanti la qualità del latte per l'applicazione del Reg. CE 1525 del 16 luglio 1998*. Disponibile all'indirizzo: http://www.cialombardia.org/documenti/produzioni_vegetali/aflatossine_metodiche.pdf (Ultima consultazione 17 maggio 2013).
- SUDA I. and HIRAYAMA K. (1992) Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Archives of Toxicology* 66 (6), 398-402.
- SUMINO K., HAYAKAWA K., SHIBATA T., KITAMURA S. (1975) Heavy metals in normal Japanese tissues. Amounts of 15 heavy metals in 30 subjects. *Archives of Environmental Health* 30 (10), 487-494.
- SUZUKI Y. and FUKUDA K. (1990) Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. *Archives of Toxicology* 64, 169-176.

- SWAILEH K.M., ABDULKHALIQ A., HUSSEIN R.M., MATANI M. (2009) Distribution of toxic metals in organs of local cattle, sheep, goat and poultry from the West Bank, Palestinian Authority. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83 (2), 265-268.
- SWEENEY M.J. & DOBSON A.D.W. (1998) Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158.
- TALLKVIST J., BOWLUS C.L., LONNERDAL B. (2001) DMT1 gene expression and cadmium absorption in human absorptive enterocytes. *Toxicology Letters* 122 (2), 171-177.
- TAM J, MANKOTIA M, MABLY M, PANTAZOPOULOS P, NEIL RJ, CALWAY P, SCOTT PM (2006). Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂. *Food Additives and Contaminants*. 23(7): 693-699.
- Tecnoalimenti (2006). Le micotossine: modalità di contaminazione, i rischi per la salute, gli strumenti per la prevenzione e la regolamentazione nel mondo a tutela del consumatore. Tecnoalimenti S.C.P.A. 21 dicembre. Disponibile all'indirizzo: <http://www.tecnoalimenti.com/Prog%20area/DIFFUSIONE%20CULTURA%202006/Micotossine.pdf> (Ultima consultazione: 8 giugno 2013).
- TIECCO G. (2001) Malattie da agenti chimici. *Igiene e tecnologia alimentare*. Edagricole, Bologna, Italia, pp. 543-738.
- TOMIZAWA M. (2004), Neonicotinoids and Derivatives: Effects in Mammalian Cells and Mice. In: *Journal of Pesticide Science*, Vol: 29(3), 177-183

- TOMIZAWA M., CASIDA J.E. (2003), Selective Toxicity of Neonicotinoids attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. In: Annual Review of Entomology, Vol. 48, 339-364
- TOMIZAWA M., CASIDA J.E. (2005), Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. In: Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 45, 247-268
- TOSSAVAINEN A., NURMINEN P., MUTANEN P. (1980) Application of mathematical modeling for assessing the biological half-times of chromium and nickel in field studies. British Journal of Industrial Medicine 37, 285-291.
- TREBLE R.G. and THOMPSON T.S. (1997) Preliminary results of a survey of lead levels in human liver tissue. Bulletin of Environment Contamination and Toxicology 59, 688-695.
- TRIVEDI B., SAXENA D.K., MURTHY R.C., CHANDRA S.V. (1989) Embryotoxicity and fetotoxicity of orally administered hexavalent chromium in mice. Reproductive Toxicology 3(4), 275-278.
- TROSKO J.E. and RUCH R.J. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. Frontiers in Bioscience 3, 208-236.
- TSAI S.M., WANG T.N., KO Y.C. (1999) Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. Archives of Environmental Health 54 (3), 186-193.
- TSENG M., GREENBERGER E.R., SANDLER R.S., BARON J.A., HAILE R.W., BLUMBERG B.S., MCGLYNN K.A. (2000) Serum ferritin concentration and recurrence of colorectal adenoma. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 9, 625-630.

- TURNER NW, SUBRAHMANYAM S, PILETSKY SA (2009). Analytical for determination of mycotoxins. A review. *Analytica Chimica Acta*. 632: 168-180.
- TURNLUND J.R. (1994) Copper. In: *Modern nutrition in health and disease*. Shils M.E., Olson J.A., Shike M., Eds. 8th Ed. Philadelphia: Lea and Febiger. (citato da: EFSA, 2006).
- TURNLUND J.R., KEYES W.R., ANDERSON H.L., ACORD L.L. (1989) Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *The American Journal of Clinical Nutrition* 49 (5), 870-878.
- UAUY R., OLIVARES M., GONZALEZ M. (1998) Essentiality of copper in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 67 (suppl.), 952s-959s.
- ULLREY D.E. (1987) Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. *Journal of Animal Science* 65 (6), 1712-1726.
- UNEP (United Nations Environment Programme) (2008) Draft final review of scientific information on cadmium. Available from:
- URBANO G.R., TANIWAKI M.H., LEITAO M.F. & VICENTINI M.C. (2001) Occurrence of ochratoxin A producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64: 1226-1230.
- URQUHART G.M., ARMOUR J., DUNCAN J.L., DUNN A.M., JENNINGS F.W. (1998), *Parassitologia veterinaria*, UTET
- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1998) Toxicological review of hexavalent chromium. Available from: <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0144tr.pdf>

- US EPA (United States Environmental Protection Agency) (1998a) Toxicological review of trivalent chromium. Available from:
- US-NTP (United States-National Toxicology Program) (1989) Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS N° 303-47-9) in F344/N Rats (gavage studies). Technical Report Series N° 358. NTIS Publication N° PB90-219478/AS. Research Triangle Park, NC and Bethesda, MD. National Toxicology Program Technical Report, 358: 1-142.
- VALDIVIA R., AMMERMAN C.B., WILCOX C.J., HENRY P.R. (1978) Effect of dietary aluminium on animal performance and tissue mineral levels in growing steers. *Journal of Animal Science* 47 (6), 1351-1356.
- VALENZUELA C., LÓPEZ DE ROMAÑA D., OLIVARES M., MORALES M.S., PIZARRO F. (2009) Total iron and heme iron content and distribution in beef meat and viscera. *Biological Trace Element Research* 132 (1-3), 103-111.
- VAN TIMMEREN S., WISE C. J., VENDERVOORT C., ISAAC R.(2010), Comparison of foliar and soil formulation of neonicotinoid insecticides for control of potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellide), in wine grapes.
- VELDAM A, MEIJS JAC, BORGGREVE GJ, HEERES VAN DER TOL JJ (1992). Carry-over of aflatoxin from cows' food to milk. *Animal Prod.* 55: 163-168.
- VIDAL A, MARÍN S, RAMOS AJ, CANO-SANCHO G, SANCHIS V (2013). Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology.* 53: 133-138.

- VIJ A.G. (2009) Hemopoietic, hemostatic and mutagenic effects of lead and possible prevention by zinc and vitamin C. *Al Ameen Journal of Medical Science* 2, 27-36.
- VINCETI M., VENTURELLI M., SIGHINOLFI C., TREROTOLI P., BONVICINI F., FERRARI A., BIANCHI G., SERIO G., BERGOMI M., VIVOLI G. (2007) Case-control study of toenail cadmium and prostate cancer risk in Italy. *Science of the Total Environment* 373 (1), 77-81.
- VO D.T, HSU W. H., ABU-BASHA E. A., MARTIN R. J. (2009), Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. In: *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Vol: 33, 315-322
- VUKELIĆ M., ŠOŠTARIĆ B. & FUCHS, R. (1991) Some pathomorphological features of Balkan endemic nephropathy in Croatia. *IARC Scientific Publications*. 115: 37-42.
- WAALKES M.P. (1995) Metal carcinogenicity. In: *Metal toxicology*. Goyer R.A., Klaassen C.D., Waalkes M.P. (editors). San Diego: Academic Press, Inc., pp. 77-98.
- WAALKES M.P., DIWAN B.A., WARD J.M., DEVOR D.E., GOYER R.A. (1995) Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer Research* 55, 5265-5271.
- WAEGENEERS N., PIZZOLON J.-C., HOENIG M., DE TEMMERMAN L. (2009a) Accumulation of trace elements in cattle from rural and industrial areas in Belgium. *Food Additives and Contaminants* 26 (3), 326-332.

- WAEGENEERS N., PIZZOLON J.-C., HOENIG M., DE TEMMERMAN L. (2009b) The european maximum level for cadmium in bovine kidneys is in Belgium only realistic for cattle up to 2 years of age. *Food Additives and Contaminants* 26 (9), 1239-48.
- WAISBERG M., JOSEPH P., HALE B., BEYERSMANN D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192 (2-3), 95-117.
- WALKER R. & LARSEN J.C. (2005) Ochratoxin A: previous risk assessments and issues arising. *Food Additives and Contaminants, Part A*, 22(1): 6-9.
- WALSH C.T., SANDSTEAD H.H., PRASAD A.S., NEWBERNE P.M., FRAKER P.J. (1994) Zinc: health effects and research priorities for the 1990's. *Environmental Health Perspectives* 102 (suppl. 2), 5-46.
- WASSERMAN G.A., LIU X.H., PARVEZ F., AHSAN H., FACTOR-LITVAK P., VAN GEEN A., SLAVKOVICH V., LOLACONO N.J., CHENG Z.Q., HUSSAIN L., MOMOTAJ H., GRAZIANO J.H. (2004) Water arsenic exposure and children's intellectual function in Arai hazar, Bangladesh. *Environmental Health Perspectives* 112 (13), 1329-1333.
- WEAKLY J.N. (1973) The action of cobalt ions on neuromuscular transmission in the frog. *The Journal of Physiology* 234, 597-612.
- WEHNER F.C., THIEL P.G., VAN RENSBURG S.J. & DERNASIUS I.P.C. (1978) Mutagenicity to *Salmonella typhimurium* of some *Aspergillus* and *Penicillium* mycotoxins. *Mutation Research*, 58: 193-203.
- WHILTLOW LW, HAGLER WM (1992). Nutrition related toxicities. In: *Large dairy herd management*. HH Van Horn, CJ Wilcox (Ed). American Dairy Science Association. Champaign IL. 585.

- WHITAKER TB, DICKENS JW, GIESBRECHT FG (1991). Testing animal feedstuffs for mycotoxins: sampling, subsampling and analysis. In: Smith JE, Henderson RS (Ed), Mycotoxins and animal food. 153-164.
- WHO (World Health Organization) (1989) Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care. A guide for health administrators and programme managers. DeMaeyer E.M. with the collaboration of Dallman P., Gurney J.M., Hallberg L., Sood S.K., Srikantia S.G. WHO, Geneva. Available from: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/9241542497/en/
- WHO (World Health Organization) (1996) Trace elements in human nutrition and health. A report of a re-evaluation of the role of trace elements in human health and nutrition. WHO, Geneva. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/1996/9241561734_eng.pdf
- WHO (World Health Organization) (1997) Aluminium. Environmental Health Criteria 194. IPCS. First draft prepared by Habs H., Simon B., Thiedemann K.U., Howe P. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc194.htm>
- WHO (World Health Organization) (2001) Arsenic and arsenic compounds. Environmental Health Criteria n. 224. World Health Organization, Geneva. Available from: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_224/en/
- WIEGAND H.J., OTTENWALDER H., BOLT H.M. (1985) Fast uptake kinetics in vitro of ⁵¹Cr(VI) by red blood cells of man and rat. Archives of Toxicology 57, 31-34.

- WILLIAMS G. R., TARPY D. R., VANENGELSDORP D., CHAUZAT M., THOMPSON H. M. (2010), Risk assesment for honeybees and pesticides -recent developments and new issues. In: Pest Management Science, Vol. 66, 1157-1162
- WITMER C.M. and HARRIS R. (1991) Chromium content of bone after oral and intraperitoneal (IP) administration of chromium (VI) to rats. Toxicologist 11, 41.
- WÜRGLER F.E., FRIEDERICH U. & SCHLATTER J. (1991) Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in Salmonella typhimurium TA102. Mutation Research, 261(13) 209-216.
- WYNANT W., SIEMIATYCKI J., PARENT M.E., ROUSSEAU M.C. (2013) Occupational exposure to lead and lung cancer : results from two case-control studies in Montreal, Canada. Occupational and Environmental Medicine 70, 164-170.
- XIE Y.X., CHIBA M., SHINOHARA A., WATANABE H., INABA Y. (1998) Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. Industrial Health 36 (3), 234-239.
- YAGER J.W. and WIENCKE J.K. (1997) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase by arsenite. Mutation Research 386 (3), 345-351.
- YAMANAKA K., HAYASHI, H., KATO, K., HASEGAW, A., OKADA S. (1995) Involvement of preferential formation of apurinic/apyrimidinic sites in dimethylarsenic-induced DNA strand breaks and DNA-protein crosslinks in cultured alveolar epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 207 (1), 244-249.

- YOKEL R.A. and McNAMARA P.J. (2001) Aluminium toxicokinetics: An updated minireview. *Pharmacology & Toxicology* 88 (4), 159-167.
- ZATTA P., FAVARATO M., NICOLINI M. (1993) Deposition of aluminium in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminium acetylacetonate. *NeuroReport* 4 (9), 1119-1122.
- ZEPNIK H., VOLKEL W., DEKANT W. (2003) Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192: 36-44.
- ZURICH M.G., LENGACHER S., BRAISSANT O., MONNETTSCHUDI F., PELLERI L. & HONEGGER P. (2005) Unusual astrocyte reactivity caused by the food mycotoxin ochratoxin A in aggregating rat brain cell cultures. *Neuroscience*, 134(3): 771-782.

NORMATIVA

Decreto del Presidente della Repubblica del 24 maggio 1988, n. 236. Attuazione della direttiva CEE numero 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della L. 16 aprile 1987, n. 183. Gazzetta Ufficiale n.152 del 30 giugno 1988.

Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n.158. Attuazione della direttiva 2003/74/CE (che modifica la Direttiva 96/22/CE), concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali. Gazzetta Ufficiale n. 98 del 28 aprile 2006.

Decreto ministeriale n. 18354/2009 del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, del 27 novembre 2009. Concernente disposizioni per l'attuazione dei regolamenti (CE) n. 834/2007, n. 889/2008 e n. 1235/2008 e successive modifiche riguardanti la produzione biologica e l'etichettatura dei prodotti biologici. Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana del 8 febbraio 2010, n. 30. Supplemento ordinario n. 24.

Direttiva 2001/22/CE della Commissione dell'8 marzo 2001 relativa ai metodi per il prelievo di campioni e ai metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di piombo, cadmio, mercurio e 3-MCPD nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 16.3.2001. L 77: 14-21.

Direttiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, 6 novembre 2001. Recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari. Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana del 28 novembre 2001, n. L 311: 1-123.

Direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, 7 maggio 2002. Relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione animale. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee, 30 maggio 2002, L n. 140: 10-21.

Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 ottobre 2003. Modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione animale. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 1 novembre 2003, L n. 285: 33-37.

Direttiva 2003/40/CE della Commissione del 16 maggio 2003 che determina l'elenco, i limiti di concentrazione e le indicazioni di etichettatura per i componenti delle acque minerali naturali, nonché le condizioni d'utilizzazione dell'aria arricchita di ozono per il trattamento delle acque minerali naturali e delle acque sorgive. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 22.5.2003. L 126: 34-39.

Direttiva 2009/30/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 aprile 2009 che modifica la direttiva 98/70/CE per quanto riguarda le specifiche relative a benzina, combustibile diesel e gasolio nonché l'introduzione di un meccanismo inteso a controllare e ridurre le emissioni di gas a effetto serra, modifica la direttiva 1999/32/CE del Consiglio per quanto concerne le specifiche relative al combustibile utilizzato dalle navi adibite alla navigazione interna e abroga la direttiva 93/12/CEE. (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 5.06.2009. L 140: 88-113.

Direttiva 2009/48/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 giugno 2009 sulla sicurezza dei giocattoli. (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 30.6.2009. L 170: 1-37.

Direttiva 76/769/CEE del Consiglio del 27 luglio 1976 concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli Stati Membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 27.9.1976, p. 201.

Direttiva 79/117/CEE del Consiglio del 21 dicembre 1978 relativa al divieto di immettere in commercio ed impiegare prodotti fitosanitari contenenti determinate sostanze attive. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee 8.2.1979. L 33: 36-40.

Direttiva 91/676/CEE del Consiglio, 12 dicembre 1991. Relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. Gazzetta ufficiale della Repubblica Italiana del 31 dicembre 1991, n. L 375: 1-8.

Direttiva 94/36/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 30 giugno 1994 sulle sostanze coloranti destinate ad essere usate nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 10.9.1994. L 237: 13-29.

Direttiva 95/2/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti. Modificata dalla Direttiva 96/85/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19.12.1996 e dalla Direttiva 98/72/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19.10.1998. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 18.3.1995, pp. 1-53.

Direttiva 96/23/CE del Consiglio del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 23.5.1996. L 125: 1-32.

Direttiva 98/70/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 13 ottobre 1998 relativa alla qualità della benzina e del combustibile diesel e recante modificazione della direttiva 93/12/CEE del Consiglio. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 28.12.1998. L 350: 58-74.

Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 5.12.98. L 330: 32-54.

Libro bianco sulla sicurezza alimentare presentato dalla Commissione delle comunità europee del 12.1.2000. COM/99/0719 DEF pp. 1-60.

Piano Nazionale Residui 2013, in applicazione del d. lgs del 16 marzo 2016, n. 158 e s.m. Ministero della Salute: Dipartimento della sanità pubblica veterinaria, della sicurezza alimentare e degli organi collegiali per la tutela della salute-

Direzione generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione, ufficio III.

Raccomandazione 2006/576/CE della Commissione, 17 agosto 2006. Sulla presenza di deossinivalenolo, zearalenone, ocratossina A, tossine T-2 e HT-2 e fumonisine in prodotti destinati all'alimentazione degli animali. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 23 agosto 2006, L n.229: 7-9.

Regolamento (CE) n. 1235/2008 della Commissione, 8 dicembre 2008. Recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio per quanto riguarda il regime di importazione di prodotti biologici dai paesi terzi. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea del 12 dicembre 2008, n. L 334: 25-52.

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, 28 gennaio 2002. Stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 1 febbraio 2002, n. L 31: 1-24.

Regolamento (CE) n. 1831/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2003 sugli additivi destinati all'alimentazione animale (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 18.10.2003. L 268: 29-43.

Regolamento (CE) n. 1881/2006 della Commissione, 19 dicembre 2006. Definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 20 dicembre 2006, n. L 364: 5-24.

Regolamento (CE) n. 1882/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, 29 settembre 2003. Recante adeguamento alle decisioni 1999/468/CE del Consiglio delle disposizioni relative ai comitati che assistono la Commissione nell'esercizio delle sue competenze di esecuzione previste negli atti soggetti alla procedura prevista all'articolo 251 del trattato CE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 31 ottobre 2003, n. L 284: 1-53.

Regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006, concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la Direttiva 1999/45/CE e che abroga il Regolamento (CEE) n. 797/93 del Consiglio e il Regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la Direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le Direttive della Commissione 91/155/CE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 29.5.2007. L 136: 3-280.

Regolamento (CE) n. 1924/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 dicembre 2006 relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 30.12.2006. L 404: 4-25.

Regolamento (CE) n. 1935/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004, riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 13.11.2004. L 338: 4-17.

Regolamento (CE) n. 194/1997 della Commissione del 31 gennaio 1997, che stabilisce tenori massimi ammissibili per alcuni contaminanti presenti in prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 1.2.1997. L 31: 48-50.

Regolamento (CE) n. 2092/91 del Consiglio, 24 giugno 1991. Relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e all'indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 22 luglio 1991, L n.198: 1-106.

Regolamento (CE) n. 2174/2003 della Commissione, 11 marzo 2004. Modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto concerne le aflatossine. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 13 dicembre 2003, n. L 326: 12-15.

Regolamento (CE) n. 271/2010 della Commissione, 24 marzo 2010. Recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, per quanto riguarda il logo di produzione biologica dell'Unione europea. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea del 31 marzo 2010, n. L 84: 19-22.

Regolamento (CE) n. 315/1993 del Consiglio, 8 febbraio 1993. Stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 13 febbraio 1993, n. L 37: 1-5.

Regolamento (CE) n. 333/2007 della Commissione del 28 marzo 2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 29.3.2007. L 88: 29-38.

Regolamento (CE) n. 401/2006 della Commissione, 23 febbraio 2006. Relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 9 marzo 2006, n. L 70: 12-34.

Regolamento (CE) n. 466/2001 della Commissione dell'8 marzo 2001, che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 16.3.2001. L 77: 1-13.

Regolamento (CE) n. 472/2002 della Commissione, 12 febbraio 2002. Modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 16 marzo 2002, n. L 75: 18-20.

Regolamento (CE) n. 596/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, 18 giugno 2009. Adegua alla decisione 1999/468/CE del Consiglio determinati atti soggetti alla procedura di cui all'articolo 251 del trattato, per quanto riguarda la procedura di regolamentazione con controllo. Adeguamento alla procedura di

regolamentazione con controllo. Quarta parte. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 18 luglio 2009, n. L 188: 14-92.

Regolamento (CE) n. 629/2008 della Commissione del 2 luglio 2008 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 3.7.2008. L 173: 6-9.

Regolamento (CE) n. 683/2004 della Commissione, 13 aprile 2004. Modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda le aflatossine e l'ocratossina A negli alimenti per lattanti e prima infanzia. Gazzetta ufficiale delle Comunità Europee del 15 aprile 2004, n. L 106: 3-5.

Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, 28 giugno 2007. Relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CE) n. 2092/1991. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea del 20 luglio 2007, n. L 189: 1-23.

Regolamento (CE) n. 889/2008 della Commissione, 5 settembre 2008. Recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli. Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea del 18 settembre 2008, n. L 250: 1-84.

Regolamento (CEE) n. 315/1993 del Consiglio dell'8 febbraio 1993 che stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee del 13.2.1993. L 37: 1-3.

Regolamento (UE) n. 165/2010 della Commissione, 26 febbraio 2010. Recante modifica, per quanto riguarda le aflatossine, del regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale del 27 febbraio 2010, n. L 50: 8-12.

Regolamento (UE) n. 380/2012 della Commissione del 3 maggio 2012 che modifica l'allegato II del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda le condizioni di utilizzo e i livelli di utilizzo degli additivi alimentari contenenti alluminio (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 4.5.2012. L 119: 14-38.

Regolamento (UE) n. 420/2011 della Commissione del 29 aprile 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 30.4.2011. L 111: 3-6.

Regolamento (UE) n. 427/2013 della Commissione dell'8 maggio 2013 concernente l'autorizzazione della selenometionina prodotta da *Saccharomyces cerevisiae* NCYC R646 come additivo per mangimi destinati a tutte le specie animali e recante modifica ai regolamenti (CE) n. 1750/2006, (CE) n. 634/2007 e (CE) n. 900/2009 per quanto riguarda la supplementazione massima con lievito al selenio. (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 9.5.2013. L 127: 20-22.

Regolamento (UE) n. 836/2011 della Commissione del 19 agosto 2011 che modifica il regolamento (CE) n. 333/2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE). Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 20.8.2011. L 215: 9-16.

SITOGRAFIA

<http://europa.eu/>

<http://www.arpa.veneto.it>

<http://www.cadmium.org>

<http://www.chimica-online.it>

<http://www.cial.it>

<http://www.efsa.europa.eu/it>

<http://www.epa.gov>

<http://www.ieo.it/bda2008/homepage.aspx>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

<http://www.repubblica.it>

<http://www.sciencedirect.com>

<http://www.deagostinigeografia.it/wing/schedapaese.jsp?idpaese=073>

<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0028tr.pdf>

http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-014019_26-Sep-03.pdf

<http://www.legambiente.it/contenuti/comunicati/biodomenica-2010-grande-festa-del-biologico-nelle-piazze-italiane>

<http://www.unimondo.org/Paesi/Asia/Asia-occidentale/giordania/economia>

APPENDICE 1: Tabelle dei risultati relativi ai metalli

Tabella 45: concentrazione, espressa in mg/kg, dei 13 metalli per la matrice muscolo.

NUMERO ANIMALE	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
1	0,319	0,165	0,198	43,99	< 0,005	5,174	23,827	0,006	0,363	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
3	< 0,005	0,196	0,090	20,29	< 0,005	1,352	41,892	< 0,005	0,216	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
4	< 0,005	0,235	0,211	23,62	< 0,005	2,670	38,086	< 0,005	1,096	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
5	< 0,005	0,165	0,316	44,40	< 0,005	6,759	22,758	< 0,005	0,427	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
24	< 0,005	0,155	0,310	45,87	< 0,005	4,557	27,166	< 0,005	0,416	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
29	< 0,005	0,169	0,294	31,50	< 0,005	6,565	52,650	< 0,005	0,287	< 0,005	0,015	< 0,005	0,005
30	12,834	0,392	0,362	31,67	< 0,005	0,933	49,895	0,114	0,303	< 0,005	0,018	< 0,005	0,010
46	< 0,005	0,153	0,075	16,49	< 0,005	0,547	52,306	< 0,005	0,372	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
54	< 0,005	0,163	0,097	19,36	< 0,005	1,296	55,688	< 0,005	0,204	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
57	< 0,005	0,174	0,172	17,01	< 0,005	3,541	34,148	< 0,005	0,227	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
58	< 0,005	0,121	0,094	23,05	< 0,005	1,586	51,358	< 0,005	0,273	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
61	< 0,005	0,133	0,118	27,27	< 0,005	1,656	59,994	< 0,005	0,332	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
64	< 0,005	0,154	0,161	23,19	< 0,005	0,526	55,178	< 0,005	0,269	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
67	< 0,005	0,156	0,127	13,54	< 0,005	1,354	48,450	< 0,005	0,513	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
68	< 0,005	0,270	0,088	15,07	< 0,005	1,139	47,132	< 0,005	0,226	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
75	< 0,005	0,105	0,342	42,90	< 0,005	5,312	24,425	< 0,005	0,332	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
76	< 0,005	0,182	0,071	18,46	< 0,005	1,010	51,409	< 0,005	0,138	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
84	0,156	0,819	0,140	27,88	0,004	2,473	57,467	0,009	0,284	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
92	< 0,005	0,144	0,348	49,27	< 0,005	6,045	22,129	< 0,005	0,457	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
93	0,134	0,330	0,345	19,29	< 0,005	4,451	55,227	< 0,005	0,252	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
116	< 0,005	0,176	0,304	21,13	< 0,005	4,251	59,991	< 0,005	0,222	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
137	< 0,005	0,164	0,160	24,82	< 0,005	2,220	73,566	< 0,005	0,219	< 0,005	0,009	< 0,005	< 0,005
142	< 0,005	0,201	0,070	16,62	< 0,005	2,077	48,662	< 0,005	0,328	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,005
143	< 0,005	0,191	0,087	16,27	< 0,005	1,365	67,021	< 0,005	0,174	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
151	0,356	0,184	0,256	45,19	< 0,005	4,949	25,205	< 0,005	0,425	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,007
152	< 0,005	0,234	0,049	10,56	0,001	0,841	41,824	< 0,005	0,237	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
196	0,020	0,261	0,094	22,97	< 0,005	2,879	29,449	< 0,005	0,225	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
197	< 0,005	0,229	0,068	18,93	< 0,005	1,236	31,039	< 0,005	0,234	< 0,005	< 0,005	< 0,005	0,005
212	< 0,005	0,158	0,271	20,13	< 0,005	5,017	37,444	< 0,005	0,224	< 0,005	0,005	< 0,005	< 0,005

Tabella 46: concentrazione, espressa in mg/kg, dei 13 metalli per la matrice fegato.

NUMERO ANIMALE	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
1	<0,005	0,202	1,342	27,39	0,027	12,763	46,949	<0,005	0,405	0,007	0,016	<0,005	0,023
3	<0,005	0,218	1,903	36,82	0,044	56,336	44,361	<0,005	0,506	<0,005	0,025	0,022	0,015
4	<0,005	0,207	1,822	41,08	0,059	41,133	29,228	0,009	4,001	0,009	0,024	<0,005	0,010
5	<0,005	0,190	1,510	31,73	0,043	49,825	39,094	0,008	0,591	0,021	0,029	<0,005	0,018
24	<0,005	0,105	1,437	25,38	0,025	4,666	22,116	<0,005	0,281	<0,005	0,012	<0,005	0,009
29	<0,005	0,137	1,571	48,33	0,040	26,155	82,803	<0,005	0,416	0,013	0,046	<0,005	0,038
30	<0,005	0,190	1,207	47,03	0,033	2,675	29,640	0,008	0,541	0,008	0,111	<0,005	0,014
46	<0,005	0,084	1,089	29,11	0,045	1,247	25,316	<0,005	0,584	<0,005	0,048	<0,005	0,004
54	<0,005	0,164	1,675	61,21	0,064	20,283	75,554	<0,005	0,930	0,006	0,032	<0,005	0,217
57	<0,005	0,168	1,234	34,36	0,060	22,873	49,212	<0,005	0,487	0,005	0,015	<0,005	0,024
58	<0,005	0,131	2,040	37,11	0,046	20,052	38,568	<0,005	0,579	0,021	0,038	<0,005	0,040
61	<0,005	0,075	1,525	20,93	0,029	37,919	26,930	<0,005	0,440	<0,005	0,028	<0,005	0,009
64	<0,005	0,105	1,695	53,91	0,054	0,791	19,434	<0,005	1,056	<0,005	0,016	<0,005	0,025
67	<0,005	0,108	0,310	46,95	0,006	4,297	21,674	<0,005	0,746	<0,005	<0,005	<0,005	0,036
68	<0,005	0,119	1,547	23,48	0,025	19,863	28,239	<0,005	0,331	0,008	0,017	<0,005	0,040
75	<0,005	0,107	1,391	29,75	0,023	25,428	25,186	<0,005	0,319	0,008	0,007	<0,005	0,007
76	<0,005	0,172	1,439	26,10	0,035	9,697	37,303	0,005	0,456	0,011	0,033	<0,005	0,067
83	<0,005	0,156	1,548	30,59	0,026	37,565	27,230	<0,005	0,357	0,006	0,071	0,017	0,009
84	1,039	0,281	1,224	39,95	0,062	32,638	47,384	0,008	0,416	0,007	0,009	<0,005	0,027
92	<0,005	0,188	2,005	52,42	0,060	56,089	32,336	<0,005	0,566	<0,005	0,037	<0,005	0,016
93	<0,005	0,139	0,291	45,64	0,005	4,579	21,830	<0,005	0,374	<0,005	0,001	<0,005	0,011
116	<0,005	0,135	1,669	32,11	0,048	27,870	36,653	<0,005	0,396	0,036	0,032	<0,005	0,036
137	<0,005	0,172	2,621	27,22	0,045	26,157	38,056	0,005	0,522	0,008	0,058	<0,005	0,018
142	<0,005	0,164	2,001	26,58	0,053	164,064	34,837	<0,005	0,721	<0,005	0,019	<0,005	0,005
143	<0,005	0,139	2,010	30,12	0,026	20,538	33,143	<0,005	0,486	0,007	0,021	<0,005	0,005
151	<0,005	0,146	1,795	24,33	0,037	18,187	31,636	<0,005	0,487	0,008	0,028	<0,005	0,007
152	<0,005	0,286	1,580	49,26	0,046	73,357	34,053	<0,005	0,570	0,020	0,070	<0,005	0,047
196	<0,005	0,120	0,087	198,12	0,004	1,219	21,745	<0,005	0,429	<0,005	0,002	<0,005	<0,005
197	<0,005	0,132	1,496	48,50	0,041	25,830	33,784	<0,005	0,545	0,016	0,012	<0,005	0,006
212	0,168	0,117	1,059	64,97	0,021	30,172	26,105	<0,005	0,305	0,007	0,011	<0,005	0,045

Tabella 47: concentrazione, espressa in mg/kg, dei 13 metalli per la matrice rene.

NUMERO ANIMALE	Al	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Se	Ag	Cd	Hg	Pb
3	<0,005	0,154	0,636	38,78	0,017	4,000	20,466	<0,005	1,746	<0,005	0,113	0,111	0,032
4	<0,005	0,150	0,661	38,84	0,020	4,437	18,144	0,026	2,672	<0,005	0,097	<0,005	0,022
5	<0,005	0,162	0,878	40,34	0,019	7,710	23,626	0,008	2,241	<0,005	0,115	<0,005	0,041
54	<0,005	0,165	0,203	48,56	0,008	3,860	18,873	<0,005	0,549	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
57	<0,005	0,158	0,379	43,96	0,009	6,262	25,397	<0,005	0,483	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
58	<0,005	0,211	0,443	45,89	0,008	5,350	23,627	<0,005	0,439	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
67	<0,005	0,157	1,467	23,22	0,030	15,581	20,976	<0,005	0,721	<0,005	0,117	<0,005	0,008
83	<0,005	0,146	0,711	36,76	0,005	6,306	19,943	<0,005	0,349	<0,005	0,009	<0,005	<0,005
93	<0,005	0,172	1,580	38,01	0,038	57,513	36,594	<0,005	0,559	0,010	0,035	<0,005	0,013
116	<0,005	0,134	0,775	38,22	0,023	5,389	20,047	0,005	2,390	<0,005	0,131	<0,005	0,024
196	<0,005	0,152	0,217	47,82	0,010	5,332	21,948	<0,005	0,481	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
197	<0,005	0,164	0,198	44,30	0,010	4,972	22,800	<0,005	0,482	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
212	<0,005	0,137	0,842	51,08	0,018	6,155	22,986	<0,005	1,968	<0,005	0,027	<0,005	0,027