

Progetto

***Qualità e sicurezza del frumento duro e derivati:
analisi chimica e nuovi indici diagnostici per la
valutazione della contaminazione da micotossine
e metalli pesanti***

MIUR n. 6674

Casillo

Obiettivi realizzativi

Fase	Data inizio	Data fine	Perc. Avanzamento	Perc. Da realizzare
1. Monitoraggio frumento duro (SP)	01/11/2003	30/09/2006	100%	0%
2. Studio delle caratteristiche di possibili indici diagnostici (RI)	01/09//2004	30/04/2006	100%	0%
3. Progettazione del processo prortotipale di diagnostica (SP)	01/05/2006	30/06/2007	40%	60%
4. Progettazione del prototipo di processo correttivo a valle della diagnostica (SP)	01/01/2007	30/04/2008	0%	100%

Stato d'avanzamento al 31/10/2006

Casillo

Monitoraggio della contaminazione con micotossine e metalli pesanti del frumento duro: campioni MP (Attività 1.1 - SP)

Articolazione dell'attività:

- 1. Predisposizione di un format per la raccolta di dati**
- 2. Corso di formazione per il personale dell'azienda sulle metodologie di campionamento**
- 3. Campionamento del frumento duro**
- 4. Raccolta dati informativi sui campioni**
- 5. Analisi chimica dei campioni per presenza micotossine e metalli pesanti**
- 6. Analisi dei risultati**
- 7. Creazione di un database della qualità: verifica del format raccolta dati**

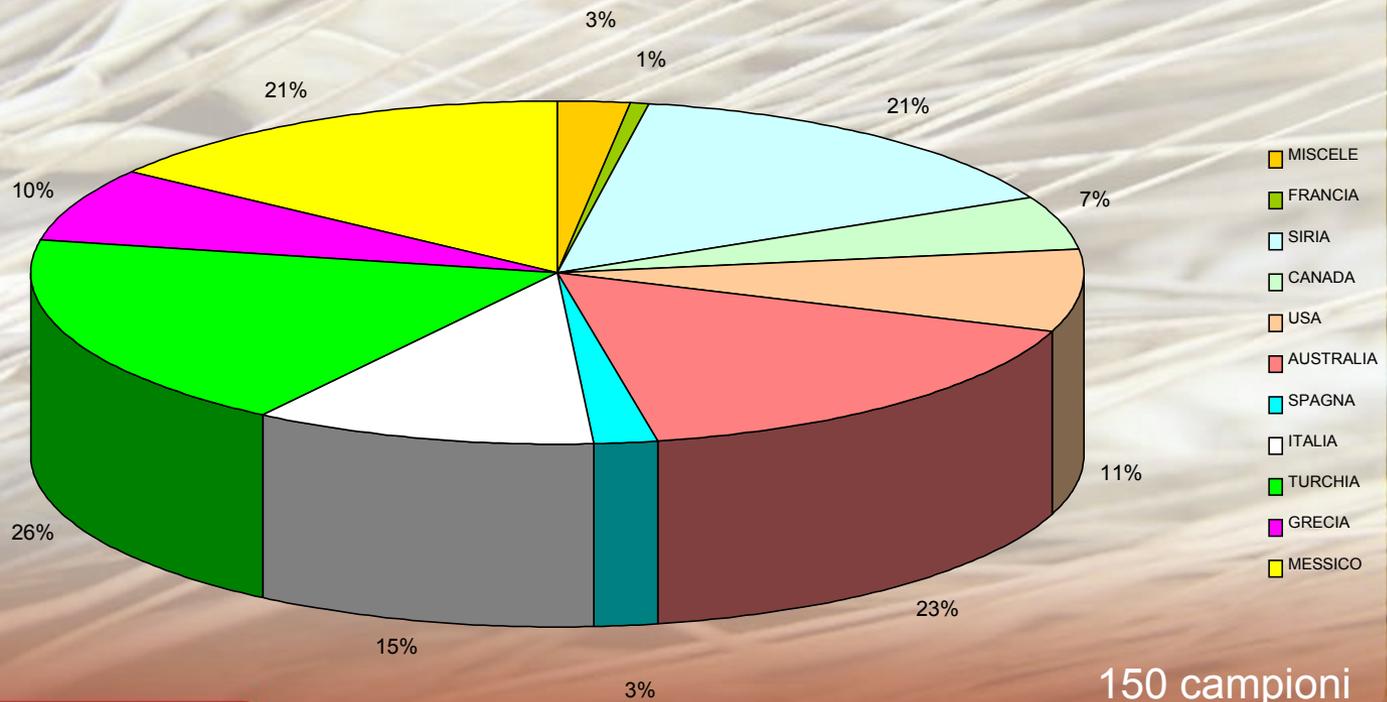
**Monitoraggio della contaminazione con micotossine
e metalli pesanti del frumento duro: campioni MP
(Attività 1.1 - SP)**

Campioni

Frumento duro di diversa origine geografica

Valutazione contenuto in micotossine e metalli pesanti

Campioni: distribuzione geografica



150 campioni

Casillo

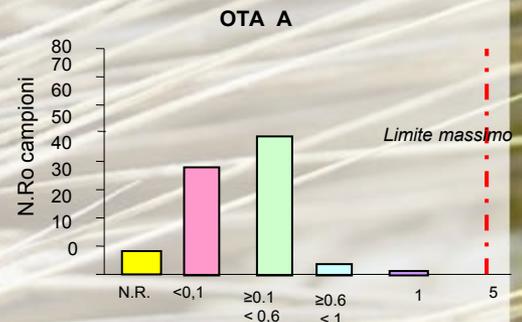
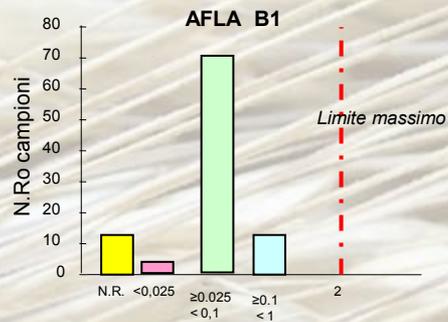
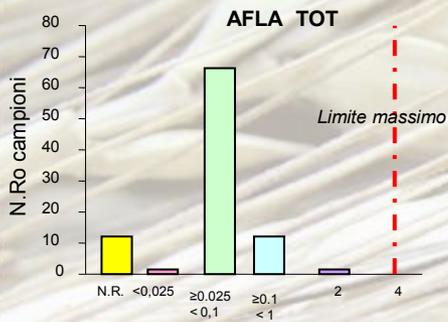
MIUR 6674 - Attività 1.1

Analisi: metodi di prova e performance dei metodi.

<u>Tossine/metalli</u>	<u>Metodo</u>	<u>Limite rilevabilità metodo</u>
deossivalenolo (DON)	GC-MS	50 ppb
Diacetossiscirpenolo	GC-MS	50 ppb
Fusarenone	GC-MS	50 ppb
Neosolaniolo	GC-MS	50 ppb
Nivalenolo	GC-MS	50 ppb
tossina HT-2	GC-MS	50 ppb
tossina T-2	GC-MS	50 ppb
Aflatossine tot	HPLC-MS	0.1 ppb
Aflatossina B1	HPLC-MS	1 ppb
Ocratossina A (OTA)	HPLC-MS	< 0.5 ppb
Zearalenone (ZEA)	HPLC-MS	10 ppb
Piombo	Assorbimento atomico	0.025 ppm
Cadmio	Assorbimento atomico	0.010 ppm

MICOTOSSINE

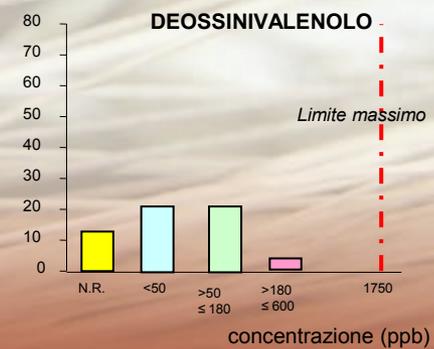
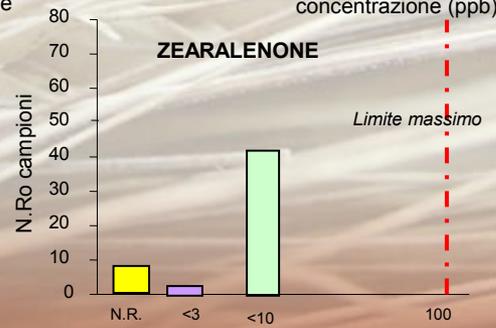
Distribuzione percentuale dei campioni 2006 in relazione al contenuto in micotossine



concentrazione (ppb)

concentrazione (ppb)

concentrazione (ppb)

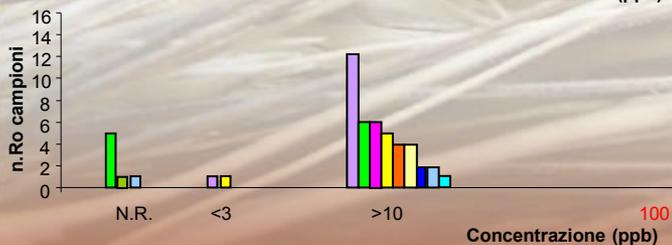
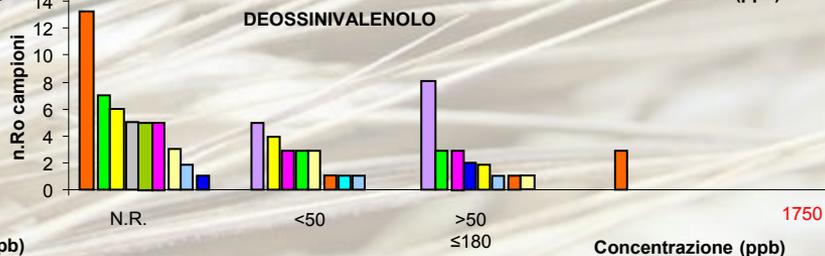
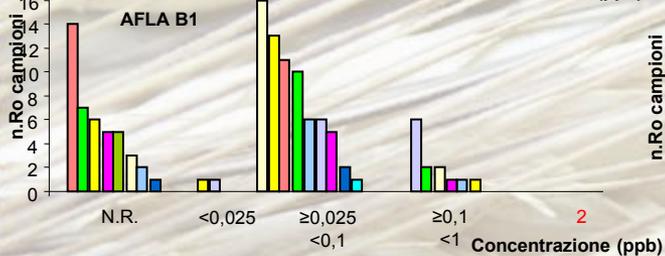
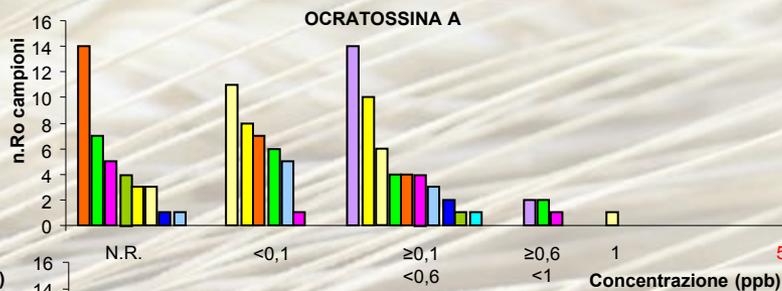
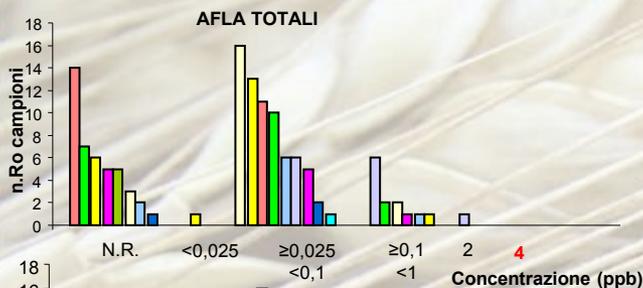


concentrazione (ppb)

concentrazione (ppb)



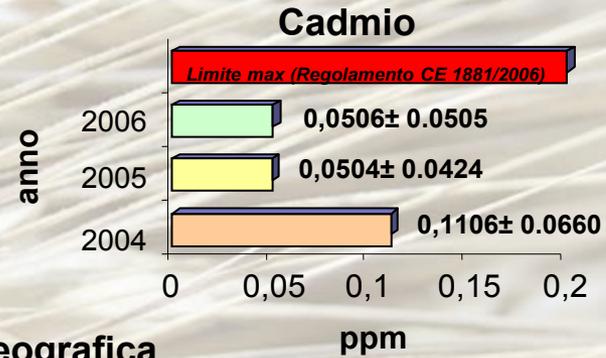
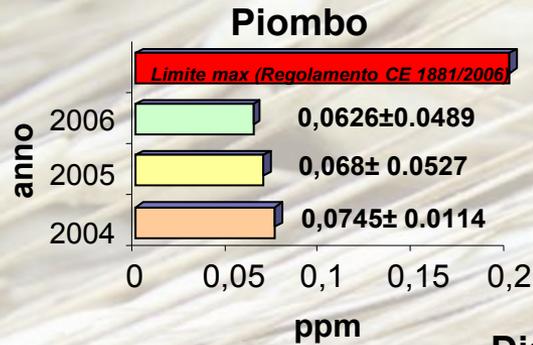
MICOTOSSINE: distribuzione geografica



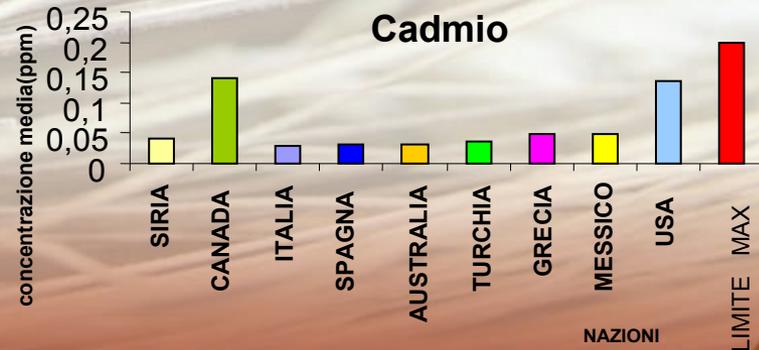
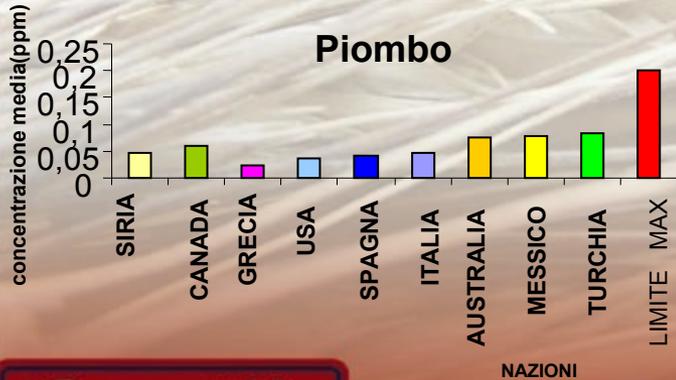
Casillo

METALLI PESANTI

Distribuzione percentuale dei campioni 2006
in relazione al contenuto in metalli pesanti



Distribuzione geografica



Casillo

**Monitoraggio della contaminazione con micotossine
e metalli pesanti del frumento duro: campioni MP
(Attività 1.1 - SP)**

Conclusioni:

- 1. Buona qualità del frumento in termini di contenuto in micotossine e metalli pesanti**
- 2. Creazione di un articolato ed esaustivo data base della qualità di facile consultazione e che permette una rapida rielaborazione analitico/statistica dei dati in relazione alle esigenze dell'azienda (valutazione della qualità del grano, verifica dei fornitori..)**

**Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi
all'analisi chimica (IMAGE) e naso elettronico (NE):
campioni MP**

(Attività 2.1 – 2.2 RI)

Campioni

Frumento duro da micoteche e collezioni di diversi centri
di ricerca europei.

Dalla contaminazione in laboratorio alla contaminazione
naturale

Contaminazione del frumento duro da DON

Casillo

MIUR 6674 - Attività 2.1 – 2.2

Livelli di contaminazione con DON dei campioni di frumento duro (analisi HPLC)

Identificativo campione	DON (mg/kg)	Identificativo campione	DON (mg/kg)
0	<0,001	15	1.20
1	0.44	16	1.25
2	0.52	17	1.38
3	0.60	18	1.40
4	0.87	19	1.50
5	1.10	20	1.63
6	1.14	21	1.70
7	1.33	22	1.77
8	1.87	23	1.83
9	2.13	24	2.00
10	0.30	25	2.15
11	0.50	26	2.25
12	0.50	27	2.30
13	0.90	28	2.32
14	1.00	29	2.50

Casillo

MIUR 6674 - Attività 2.1 – 2.2

**Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi
all'analisi chimica (IMAGE) e naso elettronico (NE):
campioni MP**

Analisi statistica

**Metodi di tipo multivariato
analisi esplorative dei dati
analisi discriminative**



**Analisi delle componenti principali (PCA)
Analisi discriminanti multivariate (LDA)
Metodi di regressione multivariata**

**Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi
all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP
(Attività 2.1 - RI)**

Articolazione dell'attività:

- 1) Acquisizione dell'immagine digitale e suo trasferimento ad un computer attraverso un apposito software dopo opportuna calibrazione dello stesso**
- 2) Rimozione dei difetti più grossolani come distorsioni e rumore di fondo per il miglioramento della qualità di immagine secondo le necessità delle fasi successive**
- 3) Individuazione di oggetti di interesse caratterizzati da proprietà geometriche o cromatiche utilizzabili come indicatori diagnostici**

**Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi
all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP
(Attività 2.1 - RI)**

Articolazione dell'attività:

- 4) Elaborazione dell'immagine al fine di rendere accessibili ad elaborazione statistica gli oggetti di interesse individuati**
- 5) Analisi statistica dei dati ottenuti**

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Acquisizione immagini

Sono stati valutati principalmente due diversi sistemi di acquisizione dell'immagine: **stereomicroscopio (Olympus SZX9)** dotato di telecamera digitale (CoolSNAP-Pro cf color, Media Cybernetics Inc., Silver Springs, USA) collegata a personal computer e **scanner**, pure collegato a personal computer.

In entrambi i casi, per l'analisi delle immagini è stato utilizzato un software specifico (Image-Pro Plus 4.5.1, Media Cybernetics Inc., Silver Springs, USA).

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Indicatori misurati

	Identificativo parametro	Descrizione del parametro
1	Area	Superficie dell'oggetto
2	Aspect	Rapporto tra asse maggiore e asse minore dell'ellisse circoscritta all'oggetto
3	Area/Box	Rapporto tra l'area dell'oggetto e l'area di un rettangolo circoscritto all'oggetto
4	Box X/Y	Rapporto tra larghezza e altezza del poligono corrispondente all'oggetto
5	Center-X	Coordinata X del centroide dell'oggetto
6	Center-Y	Coordinata Y del centroide dell'oggetto
7	Density (mean)	Media della densità luminosa
8	Angle	Angolo tra asse verticale ed asse maggiore dell'ellisse equivalente all'oggetto
9	Hole Area	Somma delle "Holes" contenute in un oggetto
10	Hole Ratio	Area/(area + Holes area)
11	Axis (major)	Lunghezza dell'asse maggiore dell'ellisse circoscritta all'oggetto
12	Axis (minor)	Lunghezza dell'asse minore dell'ellisse circoscritta all'oggetto
13	Diameter (max)	Lunghezza massima della linea che passi per il centro e unisca due punti sul margine dell'oggetto
14	Diameter (min)	Lunghezza minima della linea che passi per il centro e unisca due punti sul margine dell'oggetto
15	Diameter (mean)	Lunghezza media del diametro misurata in due intervalli passanti per il centro dell'oggetto
16	Radius (max)	Distanza massima tra il centro dell'oggetto ed il margine
17	Radius (min)	Distanza minima tra il centro dell'oggetto ed il margine
18	Holes	Numero di lacune all'interno della superficie dell'oggetto
19	Perimeter	Lunghezza del perimetro dell'oggetto
20	Radius Ratio	Rapporto tra i paramtri "radius max" e "radius min"
21	Roundness	Risultao per ciascun oggetto della formla: $\text{perimeter}^2/4*\pi*\text{area}$
22	Cluster	Numero di oggetti contenuti in una specifica area selezionata (AOI)
23	Density (red)	Intensità luminosa nel rosso
24	Density (green)	Intensità luminosa nel verde
25	Density (blue)	Intensità luminosa nel blu
26	Per-Area	Rapporto tra superficie dell'oggetto e superficie totale dell'immagine
27	Class	Numero di classi da cui deriva l'oggetto (previa classificazione)

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Indicatori misurati

28	Size (length)	Lunghezza del caliper lungo l'asse maggiore dell'oggetto
29	Size (width)	Lunghezza del caliper lungo l'asse minore dell'oggetto
30	Perimeter2	Lunghezza della "outline" dell'oggetto
31	IOD	Integrate Optical Density. Rapporto intensità/densità di ciascun oggetto
32	Perim. (convex)	Perimetro del margine convesso dell'oggetto
33	Perim. (ellipse)	Perimetro dell'ellisse circoscritta all'oggetto
34	Perim. (ratio)	Rapporto tra i parametri "perimeter convex" e "perimeter";
35	Area (polygon)	Area del poligono circoscritto all'oggetto, lo stesso poligono è usato per il parametro "perimeter"
36	Fractal Dim.	Dimensione frattale dell'oggetto
37	Center-X (mass)	Coordinate X del centroide dell'oggetto partendo dal lato sin dell'immagine
38	Center-Y (mass)	Coordinate Y del centroide dell'oggetto partendo dal lato sin dell'immagine
39	Count (adjusted)	Valore pesato del numero di oggetti (vengono eliminati oggetti derivanti da irregolarità dei bordi di oggetti veri)
40	Box Width	Altezza del poligono circoscritto all'oggetto
41	Box Height	Larghezza del poligono circoscritto all'oggetto
42	Feret (min)	Lunghezza minima del caliper dell'oggetto
43	Feret (max)	Lunghezza massima del caliper dell'oggetto
44	Feret (mean)	Lunghezza media del caliper dell'oggetto
45	Density (min)	Densità luminosa minima dell'oggetto
46	Density (max)	Densità luminosa massima dell'oggetto
47	Density (std.dev.)	SD della densità luminosa dell'oggetto
48	Dendritic length	Lunghezza dei "dendriti" che si dipartono dall'oggetto
49	Dendrites	Numero di "dendriti" che si dipartono dall'oggetto
50	End points	Distanza del punto estremo del "dendrite" dall'oggetto
51	Margination	Distribuzione di intensità luminosa tra il centro dell'oggetto e il margine e il suo margine
52	Heterogeneity	Frazione di pixels che variano più del 10% dalla intensità luminosa totale dell'oggetto
53	Clumpiness	Misura di eterogeneità ed è parametro riferibile all'attestatura; frazione dei pixels eterogenei in un oggetto dopo processo di erosione
54	Density (sum)	Somma dei valori di intensità luminosa per ciascun pixel degli oggetto contati

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Conclusioni:

- 1. I risultati ottenuti dall'applicazione dell'analisi statistica ai dati sperimentali derivati dal sistema di IMAGE non abbiano portato a indicazioni contraddistinte da carattere di innovazione se paragonate alle informazioni già disponibili in bibliografia o ad attrezzature già presenti sul mercato**
- 2. Lo studio di difetti di forma, di tessitura o variazioni cromatiche della cariossido sottoposti ad analisi statistica sia univariata che chemometrica non hanno consentito l'elaborazione e validazione di un metodo caratterizzato da performances ritenute sufficientemente elevate per la determinazione e previsione della concentrazione di micotossine nei campioni**

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Conclusioni:

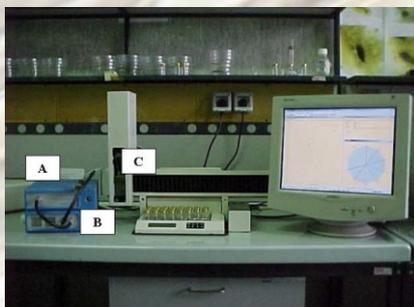
- 3. Non sufficiente livello di precocità, sensibilità e specificità degli indici diagnostici individuati e presi in considerazione per la specifica rilevazione della presenza di micotossine**

**Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi
all'analisi chimica (NE): campioni MP
(Attività 2.2 - RI)**

Articolazione dell'attività:

- 1) Individuazione e definizione dei parametri operativi d'impiego NE**
- 2) Analisi campioni di frumento duro**
- 3) Definizione protocolli di analisi statistica dei dati**
- 4) Valutazione della capacità discriminante dell'analisi olfattometrica**
- 5) Valutazione della capacità predittiva dell'analisi olfattometrica**

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP



***PEN 2 (Air sense Analytics GmbH, Sherwin, Germany – 10
MOS), (A) accessoriato con un modulo EDU2 (B:
arricchitore/desorbitore termico) ed un sistema di
campionamento automatico (C)***

Casillo

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Individuazione e definizione dei parametri operativi d'impiego NE (senza/con desorbitore)

Naso elettronico:

<i>heating (riscaldamento e stabilizzazione del campione)</i>	40 °C
<i>injection (campionamento del naso)</i>	180"
<i>cleaning (pulizia del sistema)</i>	4'

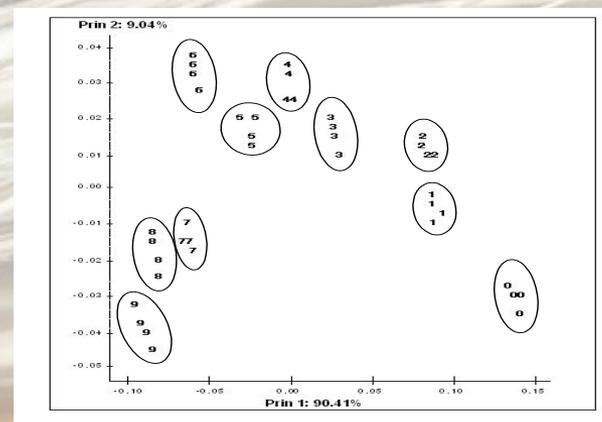
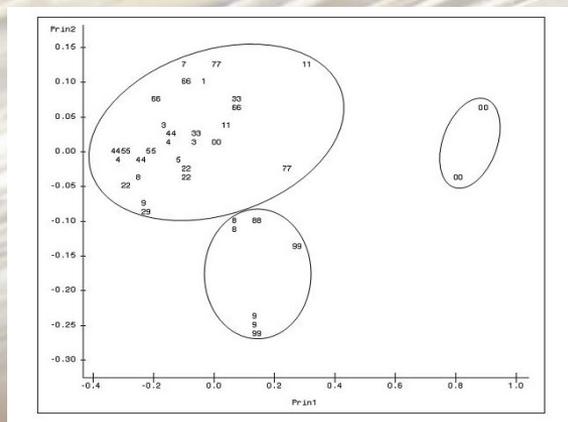
Naso elettronico con desorbitore:

<i>heating (riscaldamento e stabilizzazione del campione)</i>	40°C
<i>sampling (adsorbimento):</i>	300"-25°C
<i>post sampling (svuotamento tubi):</i>	60"
<i>desorbition (desorbimento)</i>	180-250 °C
<i>injection</i>	180"
<i>flush time (cleaning + cooling: pulizia sensori)</i>	180"-330"

Casillo

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (NE): campioni MP

Valutazione della capacità discriminante dell'analisi olfattometrica

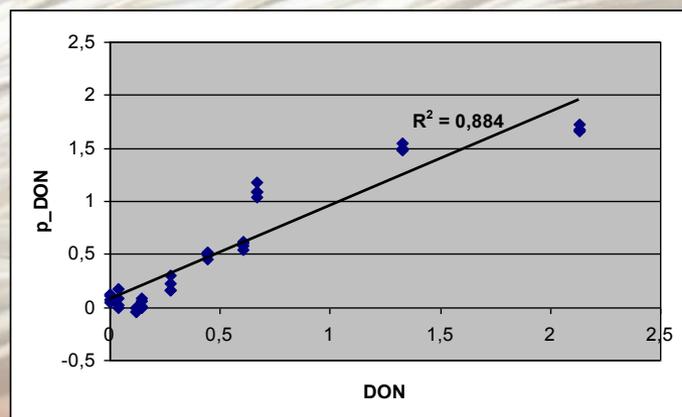


PCA (A senza desorbitor; B con desorbitor)

Casillo

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Valutazione della capacità predittiva dell'analisi olfattometrica



Correlazione fra valori reali di contaminazione (DON) e valori predetti (p_DON)
dal modello PLSr.

Casillo

Studio di nuovi possibili indici diagnostici alternativi all'analisi chimica (IMAGE): campioni MP

Conclusioni:

- 1. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare i parametri operativi dell'analisi olfattometrica evidenziando come il NE presenti una migliore sensibilità analitica in associazione con arricchitore/desorbitore**
- 2. Il naso elettronico è potenzialmente in grado di discriminare i campioni sulla base del loro livello di contaminazione con DON**
- 3. La validazione del modello statistico ha inoltre confermato l'efficienza del metodo anche in predizione**

**Progettazione del processo prototipale di diagnosta:
IMAGE
(Attività 3.1 -SP)**

Tale attività non è stata sviluppata in quanto, in relazione ai risultati ottenuti nello sviluppo dell'attività 2.1 che non hanno consentito l'elaborazione e validazione di un metodo basato sull'IMAGE caratterizzato da performance ritenute sufficientemente elevate per la determinazione e previsione della concentrazione di micotossine nei campioni, sono venuti meno i presupposti previsti al momento della stesura del progetto.

**Progettazione del processo prototipale di diagnostica:
NE
(Attività 3.2 -SP)**

Aumento robustezza del metodo:

Valutazione della capacità discriminante dell'analisi
olfattometrica

Valutazione della capacità discriminante anche in
funzione della soglia legislativa attualmente in
vigore.

**Progettazione del processo prototipale di diagnostica:
NE
(Attività 3.2 -SP)**

Valutazione della capacità predittiva dell'analisi olfattometrica

L'attuale soglia è infatti di 1750 µg/kg come limite massimo per la presenza di DON per grano duro ed avena non trasformati (Reg. 856/2005, abrogato da Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione del 19/12/2006, tenore applicato dal 1 luglio 2006), che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti in prodotti alimentari.

Analisi olfattometrica: modello classificativo

classe	numerosità	Campioni classificati correttamente
1 (DON=0 ppm)	16	16
2 (0<DON<1.75 ppm)	19	18 (1 campione classificato come appartenente alla classe 3)
3 (DON>1.75ppm)	10	10

Applicazione del modello classificativo LDA per l'attribuzione ad una classe d'appartenenza di campioni a concentrazione ignota.

Progettazione del processo prototipale di diagnostica: NE

Conclusioni

Ottenimento di un modello piu' robusto per incremento delle dimensioni del data set

Il naso elettronico è in grado di:

1. discriminare i campioni in base alla presenza ed assenza di contaminazione con DON
2. classificare correttamente i campioni di frumento duro contaminati da deossinivalenolo (DON) in relazione ai livelli legislativi attualmente in vigore (Reg. (CE) 856/2005, che prevede un limite di 1.75ppm di micotossina).

Progetto: Prospettive di successo

- 1. Il programma, sulla base delle attività già concluse al termine del periodo oggetto del presente rapporto tecnico, mostra ottime possibilità di successo.**
- 2. I risultati che ad oggi si prevede di raggiungere saranno di assoluto rilievo scientifico-tecnologico per il settore in considerazione del carattere di innovatività delle tecniche diagnostiche prese in considerazione**
- 3. L'acquisizione delle conoscenze raggiunte al momento ha evidenziato come tra le due tecnologie innovative prese in considerazione (IMAGE e NE), il NE è quello che presenta maggiori possibilità di trasferimento nella realtà aziendale quale metodo diagnostico *real time* di analisi.**

Progetto: Benefici attesi

I principali benefici, tecnico-economici, attesi dallo sfruttamento delle ricadute industriali del progetto sono i seguenti:

- 1. Migliore qualità e sicurezza del prodotto. La qualità e la sicurezza del prodotto sarà sicuramente migliorata grazie alla possibilità di controllare il grado di contaminazione in ogni fase del processo, sin dall'immissione del frumento in produzione.**
- 2. Nuovi prodotti sul mercato. Lo sfruttamento dei risultati del progetto darebbe la possibilità di realizzare nuovi prodotti da immettere sul mercato. Ciò grazie al fatto che sarà possibile migliorare il grado di flessibilità delle lavorazioni, garantendo al tempo stesso la migliore qualità e sicurezza del prodotto per il consumatore finale.**