



Cinque domande sulle aflatossine

Risponde Carlo Brera, Dip. di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'Iss

1. Cosa sono le aflatossine, in quali alimenti si trovano e quali condizioni climatico-ambientali, nonché errori di coltivazione, le favoriscono?

Le Aflatossine sono prodotte dal metabolismo secondario di alcuni ceppi fungini di *Aspergillus flavus* (da cui il nome) e *Aspergillus parasiticus*, che si sviluppano su numerosi substrati vegetali come cereali (con particolare riferimento al mais), semi oleaginosi (come le arachidi), spezie, granaglie, frutta secca ed essiccata, sia durante la coltivazione che durante il raccolto e l'immagazzinamento. I requisiti per la produzione di aflatossine da parte dei diversi tipi di funghi produttori sono alquanto aspecifici e corrispondono a temperature comprese tra 25°C e 32 °C e a valori di acqua libera (A_w) tra 0.82 e 0.87. Le aflatossine vengono prodotte preferenzialmente su substrati ricchi di carboidrati e mentre le aflatossine B1 e B2 sono prodotte dall'*A. flavus* e dall'*A. parasiticus*, le G1 e G2 sono prodotte solo dal secondo.

La produzione di aflatossine da parte dell'*A. flavus* risulta inoltre particolarmente abbondante in stagioni con temperature superiori e piovosità inferiori alla media, come è accaduto nelle annate 2003 e 2012. Inoltre, la presenza di insetti spesso coincide con alti livelli di aflatossine specie nel caso della piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*), in quanto gli insetti sono da considerare tra i maggiori responsabili della contaminazione sia per la veicolazione delle spore fungine, sia per il danneggiamento alla pianta con un'aumentata condizione di stress che aumenta il rischio di esposizione della stessa all'attacco fungino.

Tra le pratiche agricole che maggiormente comportano fattori di rischio specialmente nella coltivazione del mais si possono individuare: la mancata concia del seme, la lavorazione su sodo, la monocoltura, l'impiego di ibridi precoci, l'uso di non appropriate procedure di irrigazione, la mancanza di una lotta biologica in campo, l'uso di varietà particolarmente suscettibili all'attacco fungino ed uno squilibrio della componente minerale del suolo con rapporti non bilanciati di azoto, fosforo e potassio e la pratica di posticipare la raccolta, con il rischio di abbassare troppo l'umidità alla raccolta.

2. Quali le più pericolose per la salute umana e cosa provocano?

Le aflatossine sono sostanze chimicamente riferibili alla difuranocumarina. Fra le 17 aflatossine finora isolate solo cinque sono considerate rilevanti sia per diffusione sia per tossicità: le aflatossine B1, B2, G1, G2 e la aflatossina M1, metabolita idrossilato, che deriva dal metabolismo della aflatossina B1 da parte

di animali alimentati con mangimi contaminati con aflatossina B1.

La serie G contiene un anello lattonico, mentre la serie B contiene un anello ciclopentenoico, che è responsabile della maggiore tossicità di questa serie.

La tossina di maggiore interesse tossicologico è senza dubbio l'aflatossina B1 in quanto genotossica ed epatocancerogena. Altri effetti tossici osservati negli studi condotti su specie animali sono iperplasia dei condotti biliari, emorragia del tratto gastrointestinale e dei reni.

Nel 1993 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro, ha classificato la Aflatossina B1 nel Gruppo 1, cioè come "agente cancerogeno per l'uomo".

Essendo l'aflatossina B1 genotossica, non è possibile stabilire una soglia massima di assunzione con la dieta e pertanto il principio tossicologico di riferimento è quello di mantenere il livello di esposizione il più basso possibile (As Low As Reasonable Achievable, ALARA).

In tutte le specie animali finora testate, appare evidente che l'azione mutagena, cancerogena e di legame covalente con il DNA N7-Guanina, sia il risultato della attivazione della AFB1 a carico del citocromo P450, complesso enzimatico che porta alla formazione dell'intermedio altamente reattivo aflatossina B1-8,9-epossido in grado di legarsi alle proteine ed indurre aflatossicosi acute o al DNA inducendo la cancerogenesi.

La tossicità delle aflatossine ha caratteristiche e implicazioni differenti secondo la dose. In condizioni di aflatossicosi acute, si manifesta un'alterazione della integrità intestinale e/o una modulazione dell'espressione delle citochine, proteine secrete da diverse cellule, fondamentalmente dal sistema immunitario, come risposta ad uno stimolo immunologico o come segnale intercellulare dopo lo stimolo di una di esse.

Ambedue questi effetti possono causare sia un ritardo nella crescita dei bambini sia un effetto immunosoppressivo.

Le aflatossicosi acute nell'uomo, associate con dosi estremamente elevate di aflatossine derivanti dalla dieta, sono caratterizzate da emorragie, edema, danni acuti epatici e morte. Le condizioni che favoriscono la probabilità di aflatossicosi acute includono una limitata disponibilità di alimenti, condizioni ambientali caratterizzate da alte umidità e temperature che favoriscono l'attacco fungino sulle specie vegetali e la mancanza di azioni preventive e di azioni di controllo per monitorare i livelli di aflatossine nella filiera agro-alimentare. In Africa, sono stati riportati numerosi casi di aflatossicosi acute associate principalmente al consumo di mais altamente contaminato, come ad esempio è accaduto in Kenya nel 1982, in cui sono stati registrati 12 decessi, e nel 2004, in cui 317 persone furono colpite da sintomi riconducibili alla aflatossicosi con 125 decessi.

Negli animali, l'aflatossicosi acute si è manifestata per la prima volta nel 1960, quando più di 100.000 tacchini morirono nel Regno Unito in condizioni non conosciute al punto che la patologia responsabile di questo evento fu chiamata "Turkey X disease".

In seguito, studi più approfonditi hanno rivelato che la causa era da ricondurre al consumo di farina di arachidi fortemente contaminata da aflatossine. Analogamente, nel 1981 in Australia, sono morte diverse centinaia di vitelli alimentati con fieno misto ad arachidi, e nel 2007, in Argentina un analogo evento si è manifestato in un allevamento di cincillà.

Nelle diverse specie animali, l'esposizione cronica alle aflatossine può causare un danno alla efficienza riproduttiva, un aumento della mortalità, una riduzione del peso, anemia, ed ittero. Inoltre, nel caso di galline ovaiole, le aflatossicosi causano un ingrandimento dello strato adiposo del fegato ed una considerevole riduzione nella produzione di uova.

Alcuni studi epidemiologici hanno correlato l'esposizione cronica all'aflatossina B1 con la mutazione del gene soppressore del tumore p53, condizione questa ritenuta responsabile dell'induzione dell'apoptosi, comunemente osservata nei soggetti portatori di epatocarcinoma cellulare (HCC) provenienti da varie regioni geografiche. Quest'inversione è stata ampiamente verificata nei pazienti portatori di HCC originari della Cina (parte continentale), dell'Africa e

del Messico, paesi in cui la contaminazione del cibo con aflatossina B1 è elevata, ma raramente nei soggetti provenienti da Hong Kong, Singapore, Giappone, Europa e nelle popolazioni caucasiche che risiedono negli Stati Uniti, dove gli alimenti contengono concentrazioni ridotte di aflatossina B1.

Uno studio caso-controllo condotto su 18.000 persone di Shanghai, ha rivelato un aumento statisticamente significativo del rischio relativo di HCC nei soggetti in cui era riscontrata la presenza nelle urine di metaboliti dell'aflatossina B1, tra cui l'aflatossina M1. Inoltre, il rischio della insorgenza del tumore era 7 nei portatori di epatite B (HBV) e 59 negli individui con marcatori biologici di infezione HBV ed aflatossina B1. Da questi riscontri scientifici è possibile tuttora accreditare l'ipotesi che il ruolo dell'aflatossina B1 nella insorgenza dell'HCC sia essenzialmente quello di amplificare il rischio determinato dall'infezione HBV.

In particolare, il Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) considera il potere cancerogeno della Aflatossina B1 sostanzialmente maggiore nei portatori di HBV HBsAg+ (circa 0.3 casi di cancro/anno/100.000 persone/ng of aflatossina B1/kg di peso corporeo per diem), rispetto ai soggetti HBsAg-, nei quali l'incidenza di cancro scende a circa 0.01 casi di cancro/anno/100.000 persone/ng di aflatossina B1/kg di peso corporeo per diem). Inoltre il JECFA ha evidenziato il potenziale ruolo della vaccinazione contro il virus dell'epatite B come fattore di riduzione del rischio cancerogeno da parte della aflatossina B1.

Tra i metaboliti dell'Aflatossina B1, il più rilevante per la salute pubblica è la forma metabolica idrossilata dell'aflatossina B1, la aflatossina M1, molecola più polare e meglio trasportabile attraverso il circolo sanguigno, che si ritrova essenzialmente nel latte di bovini, ovini e caprini con una percentuale di trasferimento che oscilla tra l'1% ed il 3% a seconda delle specie animali. Il trasferimento della AFM1 è stata riscontrata anche nel latte materno.

Il suo potere epatocancerogeno è inferiore a quello della Aflatossina B1 ed è compreso tra il 2 ed il 10% rispetto a quello della AFB1.

3. Quali limiti impone il quadro normativo dell'UE alla presenza negli alimenti di aflatossine? E quali i limiti imposti dagli Usa, produttori di circa la metà del mais mondiale?

A livello comunitario, il Regolamento (UE) 1881/2006, recentemente modificato dal regolamento (UE) 165/2010 ha fissato limiti massimi tollerabili, riportati in Tabella 1, per l'aflatossina B1, le aflatossine totali, (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) e l'aflatossina M1 in prodotti alimentari quali cereali, frutta secca, spezie, prodotti per l'infanzia e latte.

I criteri seguiti nei Regolamenti per la fissazione dei livelli si basano essenzialmente sulla differenza tra i prodotti alimentari destinati all'uso umano per i quali sia necessario impiegare trattamenti fisici per la riduzione del tenore di aflatossina prima che l'alimento sia idoneo al consumo rispetto a quei prodotti alimentari già pronti per il consumo. Inoltre nei due Regolamenti è vietato l'uso di agenti chimici per decontaminare le partite di prodotti contaminati e la possibilità di miscelare partite conformi a quelle non conformi.

Si evidenzia inoltre che i limiti massimi tollerabili sono stati fissati sia sul prodotto finito che sull'ingrediente.

Nel settore zootecnico, il Regolamento (UE) 574/2011 ha recentemente modificato la Direttiva comunitaria 2002/32 sulle sostanze indesiderabili nei mangimi, fissando limiti massimi tollerabili per la sola aflatossina B1 in varie tipologie di mangimi, così come riportati nella Tabella 2.

Nel Regolamento sono riportati valori massimi diversificati a seconda che si tratti di mangimi semplici (materie prime), complementari e composti o che siano destinati ad animali produttori di latte.

Relativamente alla normativa statunitense, si deve considerare che negli Stati Uniti il principio guida è stato quello di stabilire dei livelli tollerabili basati su una valutazione squisitamente commerciale e pragmatica senza però introdurre fattori di rischio per il consumatore o le specie animali. Diversamente, in Europa, il principio guida è quello di tutelare al massimo la salute pubblica individuando sia livelli massimi tollerabili tecnologicamente raggiungibili sia valori basati sull'adozione del principio di precauzione.

Ad esempio il limite massimo della aflatossina M1 nel latte è maggiore di 10 volte quello comunitario (0,5 µg/kg vs 0,05 µg/kg), così come quello relativo agli alimenti in generale dove il limite massimo (20 µg/kg) è ugualmente maggiore di 10 volte quello fissato in alcuni alimenti come le arachidi ed i cereali, escluso il mais ed il riso, dalla legislazione comunitaria.

Per quanto riguarda i mangimi, negli anni '60 i limiti massimi tollerabili erano coincidenti con quelli attualmente vigenti in Europa, ma nel corso dei successivi vent'anni sono stati introdotti cambiamenti rilevanti con un aumento del limite di circa 15 volte per le farine di semi di cotone, arachidi e derivati da utilizzare come ingredienti dei mangimi per vitelloni, suini e polli e per i bovini ed i suini all'ingrasso, introducendo, inoltre, diversificazioni per le diverse fasi dello sviluppo degli animali.

Si riportano, di seguito, i livelli di intervento attualmente vigenti negli USA:

- 300 µg/kg per prodotti del granturco e delle arachidi da destinare a vitelloni all'ingrasso o finissaggio
- 300 µg/kg per farina di semi di cotone da destinare a vitelloni, suini o pollame (a prescindere dall'età o dallo stato riproduttivo)
- 200 µg/kg per prodotti a base di granturco ed arachidi da destinare a suini all'ingrasso o finissaggio di peso uguale o superiore ai 45 kg (100 libbre)
- 100 µg/kg per prodotti a base di granturco ed arachidi da destinare a bovini da carne e suini riproduttori o a pollame adulto
- 20 µg/kg per granturco, prodotti a base di arachidi e altri mangimi per gli animali e loro ingredienti, esclusa la farina di semi di cotone, da utilizzare per animali in fase di sviluppo
- 20 µg/kg per granturco, prodotti a base di arachidi, farina di semi di cotone, ed altri mangimi ed ingredienti destinati agli animali da latte, per specie animali o destinazioni d'uso non comprese ai punti precedenti o quando non siano conosciute.

4. Quale è il parere dell'EFSA al riguardo?

Recentemente l'EFSA ha pubblicato una opinione su un tema di salute pubblica molto rilevante quale quello relativo alla presenza di aflatossine in alcune tipologie di frutta secca come le mandorle, i pistacchi e le nocciole. Le conclusioni a cui l'EFSA è arrivata ha portato successivamente all'aumento dei limiti massimi tollerabili delle aflatossine nei prodotti indicati. Si riporta testualmente quanto riportato sul sito dell'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/aflatoxins.htm>).

5. Come si possono combattere le aflatossine?

Le aflatossine come del resto anche le altre micotossine sono sostanze fortemente termostabili pertanto i trattamenti termici comunemente impiegati nei processi industriali di trasformazione e nelle comuni preparazioni domestiche non sono in grado di ridurre il livello originale di queste sostanze.

Per quanto attiene specificatamente le aflatossine, il principio guida per contenere i livelli di contaminazione è quello di adottare un approccio cosiddetto "olistico", vale a dire una associazione di azioni concertate lungo tutta la filiera agro-alimentare, "dal campo alla tavola". La produzione di aflatossine può avvenire sia in campo che durante le fasi di stoccaggio dopo il raccolto.

Relativamente alle azioni preventive da effettuare si riportano quelle relative a due delle matrici alimentari più a rischio da contaminazione da aflatossina B1, il mais e le spezie.

Per quanto riguarda il mais, una delle azioni preventive per ridurre il rischio agronomico in campo è quella di raccogliere il mais ad un tenore di umidità non inferiore al 22%. Questa condizione è di estrema importanza per evitare che, nella fase post-raccolta, in condizioni di umidità tali da favorire il proliferare della crescita delle spore fungine, la probabile presenza di aflatossine aumenti in modo incontrollato.

Altra fase cruciale è senz'altro quella della essiccazione del prodotto dopo la fase di raccolta, sia per quanto riguarda l'intervallo temporale che intercorre dalla raccolta alla essiccazione sia il gradiente di tempo e temperatura che caratterizza le modalità con cui il processo di essiccazione avviene. Sono infatti da evitare shock termici molto drastici in quanto questa condizione provocherebbe spaccature e microfessure nella cariosside di mais con un conseguente aumento delle vie preferenziali di attacco delle spore fungine in fase di stoccaggio.

Quanto detto può essere riassunto in una sorta di elenco di alcuni punti essenziali:

- Non lasciare essiccare il mais in campo, raccogliendo a seconda del mese a livelli di umidità intorno al 25-27%, e comunque non inferiore al 22%;
- Anticipare la raccolta, diminuendo il tempo di permanenza in campo del mais dopo la maturazione fisiologica;
- Regolare al meglio la trebbiatrice per ridurre le rotture ed eliminare la maggiore quantità di impurità possibile;

- Ridurre l'intervallo di tempo tra la raccolta e l'essiccazione;
- Mantenere l'umidità finale della granella adeguata alla tipologia dell'impianto, alla durata dello stoccaggio ed alle caratteristiche del prodotto in entrata;
- Eliminare le parti piccole e leggere e le cariossidi spezzate

Relativamente alle spezie, si possono riassumere alcune tipiche azioni preventive nelle diverse fasi della produzione:

Fase di Pre-raccolto

- ✓ Diserbo, miglioramento della composizione del terreno, aratura, fertilizzazione, ed irrigazione appropriata
- ✓ Utilizzo di semi concitati per prevenire l'infezione e appropriate densità di semina
- ✓ Scelta appropriata della stagione di semina in modo da raccogliere nella stagione più secca
- ✓ Uso di pesticidi per prevenire l'azione distruttiva degli infestanti
- ✓ Rotazioni colturali
- ✓ Pulizia e disinfezione delle attrezzature utilizzate durante la coltivazione.

Fase di raccolto

- ✓ Raccogliere nel momento di massima maturazione del baccello (massima intensità del colore e Aw più bassa)
- ✓ Selezione manuale dei baccelli infestati (personale formato)
- ✓ Rimozione dei baccelli infestati o danneggiati dall'area di piantagione per evitare la contaminazione del terreno per contatto.

Fase di post-raccolto

- ✓ Movimentare il raccolto dalla azienda agli essiccatoi il prima possibile ed essiccare i frutti entro 48 h. In questo caso, i contenitori, i mezzi di trasporto devono essere puliti e disinfettati prima dell'uso. I frutti devono essere sempre protetti da pioggia o umidità.
- ✓ Nel caso di periodi più lunghi prima dell'essiccazione mantenere i frutti ad una umidità relativa inferiore all'80% ed ad una T di 7-12°C (prevenzione della proliferazione delle muffe aflatossigeniche).

Essiccazione

- ✓ Essiccare a valori di umidità inferiori o uguali all'11%. Un prodotto secco è composto dal 33% di semi, dall'8% del gambo e dal 59% del frutto.
- ✓ Utilizzare essiccatori meccanici ad aria calda a basse U_{RH} e Temperature di 45-65°C (10-12 h). In alternativa, l'essiccazione può avvenire alla luce diretta del sole (dai 3 ai 20 giorni a seconda del clima)
Nelle aree molto umide e temperature miti è preferibile utilizzare gli essiccatori meccanici.

- ✓ Conservare i frutti nelle aree di essiccazione alle Aw tipiche della produzione di aflatossine (0.82 - 0.95) per un periodo non superiore ai 5 gg
- ✓ Non essiccare il prodotto a diretto contatto del suolo, ma proteggerlo con teli.

Pertanto, sulla base delle condizioni di rischio agronomico descritte si riportano le seguenti raccomandazioni per minimizzare la contaminazione da aflatossine nel mais e nelle spezie:

- ✓ Selezione varietale
- ✓ Evitare stress idrici prima del raccolto
- ✓ Assicurare tempi rapidi tra raccolto ed essiccazione
- ✓ Rimuovere le cariossidi (mais) ed i frutti (spezie) infestati o danneggiati
- ✓ Tagliare i frutti (spezie) prima dell'essiccamento in piccoli pezzi ma in tempi brevi
- ✓ Essiccare a T di 60°C per le prime 6 ore (artificialmente) (spezie) e nell'arco delle 24-36 ore nel caso del mais.
- ✓ Essiccare ad umidità pari al 13-14% (mais) ed all'8%-11% (spezie)
- ✓ Imballare in tempi rapidi in contenitori di carta e a tenuta (spezie)
- ✓ Stoccare i frutti (spezie) in condizioni ambientali fresche, areate e non umide
- ✓ Macinare i frutti (spezie) poco prima della spedizione.