

# Tecniche di decontaminazione di derrate inquinate da micotossine



Luigi Menghini

Università "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

100.000 muffe

400 potenzialmente tossiche

5% producono metaboliti tossici

*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

Tra le principali micotossine troviamo

*Aflatossine* e *Zearalenone*

Turkey X disease

Le micotossine sono prodotti del metabolismo secondario di alcuni funghi

*Aspergillus* FLAVUS TOXIN (B1e2), (G1e2), M

- Ubiquitarietà dei produttori
- Diversità dei substrati
- Condizioni di crescita

# SUBSTRATI

## Potenzialmente tutti i cibi

Si ritrovano **NORMALMENTE** in alimenti e foraggi a base di cereali legumi, soia, nocciole, ecc.

Gli alimenti più frequentemente inquinati sono: cereali (mais in particolare), semi oleosi (soprattutto arachide), e semi di cotone, formaggi, insilati, farine, arachidi.

# Produzione influenzata da fattori di stress

## Crescita e produzione influenzate da:

- tipo di substrato
- composizione chimica e stato fisico del substrato
- specie fungina
- quantità di sali
- umidità
- temperatura
- integrità dei "gusci"

Regioni tropicali, a clima caldo ed umido

**Table 1. Occurrence of *Aspergillus* in some agricultural commodities**

Commodity	Country	Species	Reference
Peanuts	Sudan	<i>A. flavus</i>	Elamin <i>et al.</i> , 1988
	Egypt	<i>A. flavus</i> + <i>A. niger</i>	Moubasher <i>et al.</i> , 1980
	S. Africa	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Dutton & Westlake, 1985
Maize	India	<i>A. flavus</i>	Gaur & Siradhana, 1989
	China	<i>A. flavus</i>	Zhen-Zhen, 1989
	Uganda	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Sebunya & Yourtee, 1990
	Nigeria	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i> + <i>A. niger</i>	Aja Nwachukwu & Emejuiwe, 1994
	USA	<i>A. flavus</i>	Guo <i>et al.</i> , 1995
Wheat	China	<i>A. flavus</i>	Zhen-Zhen, 1989
	Russia	<i>A. flavus</i>	L'Vova <i>et al.</i> , 1993
Rice	China	<i>A. flavus</i>	Zhen-Zhen, 1989
	India	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Jayaraman & Kalyanasundaram, 1990
Millet	India	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Mishra & Daradhiyar, 1991
Soybean	Argentina	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Pinto <i>et al.</i> , 1991
Sunflower oil	China	<i>A. flavus</i>	Zhen-Zhen, 1989
	Russia	<i>A. flavus</i>	L'Vova <i>et al.</i> , 1993
Coconut	India	<i>A. flavus</i>	Bilgrami & Choudhary, 1993
Pistachio nuts	USA	<i>A. niger</i> + <i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Doster & Michailides, 1994
	Turkey	<i>A. flavus</i>	Heperkan <i>et al.</i> , 1994
Figs	Switzerland	<i>A. flavus</i> + <i>A. parasiticus</i>	Steiner <i>et al.</i> , 1988
Mustard seed	India	<i>A. flavus</i>	Sahay & Prasad, 1990

# VARIABILITÀ

Produzione di AFB1 è più alta su riso che su arachidi

*A. parasiticus*, T min di crescita 6-8°C,  
massima 44-46°C, optimum 25-35°C

*A. flavus* produce aflatossine tra 12 e 42 °C,  
range ottimale 28-30 °C

Semi rotti, piccoli, immaturi, rancidi, scoloriti,  
con abrasioni sono più a rischio

# TOSSICITÀ

- Capacità di passare inalterate i processi metabolici accumulandosi nei tessuti
- Possono essere secrete nel substrato o rimanere all'interno del micelio

## ESPOSIZIONE

Diretta ed indiretta

Stima FAO 1985: nel mondo il 25% delle derrate è contaminato da micotossine



# RISCHIO SANITARIO

Salute umana e salute degli animali

## CONTAMINAZIONE

diretta, indiretta, "da contatto"

Rischio economico

Table 2. Occurrence of aflatoxins in some foods and feed

Food	Country	Contaminated/ total examined	Aflatoxin	Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Reference
Rice	China	33/252	B1	5-50	Zhen-Zhen, 1989
	India	1/1	B1	20	Park & Njapau, 1989
Maize	Kenya	70/78	— <sup>a</sup>	30-920	Ellis <i>et al.</i> , 1991
	USA	2370/2633	—	10-700	Ellis <i>et al.</i> , 1991
	Mexico	86/96	—	2.5-30	Ellis <i>et al.</i> , 1991
	Brazil	40/328	B1	> 20	Sabino <i>et al.</i> , 1989 <sup>b</sup>
	Denmark	6/197	Total <sup>b</sup>	5-174	Madsen & Rasmussen, 1988
	France	3/3	B1	20	Park & Njapau, 1989
	India	47%	B1	> 20	Kaushal, 1990
	S. Africa	—	B1	0-25	Ruffell & Trinder, 1990
Sorghum	India	—	B1	7-75	Usha <i>et al.</i> , 1994
Copra	Tonga island	1/2	B1	37	Lovelace & Aalbersberg, 1989
Millet	India	49/75	B1	17-2110	Mishra & Daradhiyar, 1991
Soybeans	USA	11/11	B1	< 20	Park & Njapau, 1989
		3/24	B1	< 6	Jacobsen <i>et al.</i> , 1995
	Argentina	9/94	B1	1-36	Pinto <i>et al.</i> , 1991
	Sweden	20/116	B1	50-400	Pettersson <i>et al.</i> , 1989
Oat, barely, and wheat	Egypt	9/150	B1, B2	4-15, 2-25	Aziz & Youssef, 1991
Meat	UK	8/93	Total	10-40	Sharman <i>et al.</i> , 1991
	Sweden	16/27	—	5-67	Akerstrand & Möller, 1989
Potato	Fiji island	7/20	B1	6-12	Lovelace & Aalbersberg, 1989
Linseed	India	46/105	B1	120-810	Samarajeewa <i>et al.</i> , 1990
Bakery products	Spain	1/50	B1, G1	67, 46	Simón & Frenandez, 1984
Cottonseed	Argentina	5/5	B1	20-200	Park & Njapau, 1989
Sunflower	Spain	1/1	B1	20	Park & Njapau, 1989
Mustard seed	India	44/100	—	75	Sahay & Prasad, 1990
Milk	Sweden	19/267	M1	> 0.05	Pettersson <i>et al.</i> , 1989
	Spain	14/47	M1	20-100	Blanco <i>et al.</i> , 1988
Human milk	Abu Dhabi	443/445	M1	0.002-3.0	Saad <i>et al.</i> , 1995

<sup>a</sup> —, not mentioned.<sup>b</sup> B1 + G1 + B2 + G2.

**Table 3. Occurrence of aflatoxin in peanuts and peanut products**

	Country	Contaminated/ total examined	Aflatoxin	Concentration ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Reference
Peanuts	Argentina	3/3	B1	20–200	Park & Njapau, 1989
	Senegal	72/72	B1	20–200	Park & Njapau, 1989
	Brazil	940/1044	— <sup>a</sup>	30–5000	Ellis <i>et al.</i> , 1991
		20/20	B1	80–6450	Fonseca <i>et al.</i> , 1989
		26/86	B1, G1	10–2000, 20–800	Araujo <i>et al.</i> , 1994
	Mexico	26/29	—	700	Park & Njapau, 1989
	USA	108/120	—	24	Park & Njapau, 1989
	Philippines	56/98	—	3–2888	Garcia, 1989
	Fiji island	11/22	B1	1–18	Lovelace & Aalbersberg, 1989
	India	10/20	B1	33–440	Singh <i>et al.</i> , 1982
	China	1/2	B1	20	Zhen-Zhen, 1989
Butter	UK	69/77	—	38–535	Ellis <i>et al.</i> , 1991
	USA	246/2510	Total <sup>b</sup>	20–100	Gagliardi <i>et al.</i> , 1991
	Nigeria	28/32	B1	37–455	Akano & Atanda, 1990
Cake	USA	223/401	Total	31–100	Applebaum <i>et al.</i> , 1982
	India	31%	B1	2–1500	Rati & Shantha, 1994

<sup>a</sup>—, not mentioned.

<sup>b</sup> B1 + G1 + B2 + G2.

**IL CASO DELLE ARACHIDI**  
Tutta la filiera è contaminata  
A. flavus come micoflora del terreno  
Le condizioni ambientali

# CONTAMINAZIONE DA MICOTOSSINE: STRATEGIE

-prevenzione

-decontaminazione delle derrate contaminate

-inibizione dell'assorbimento nel tratto  
digerente

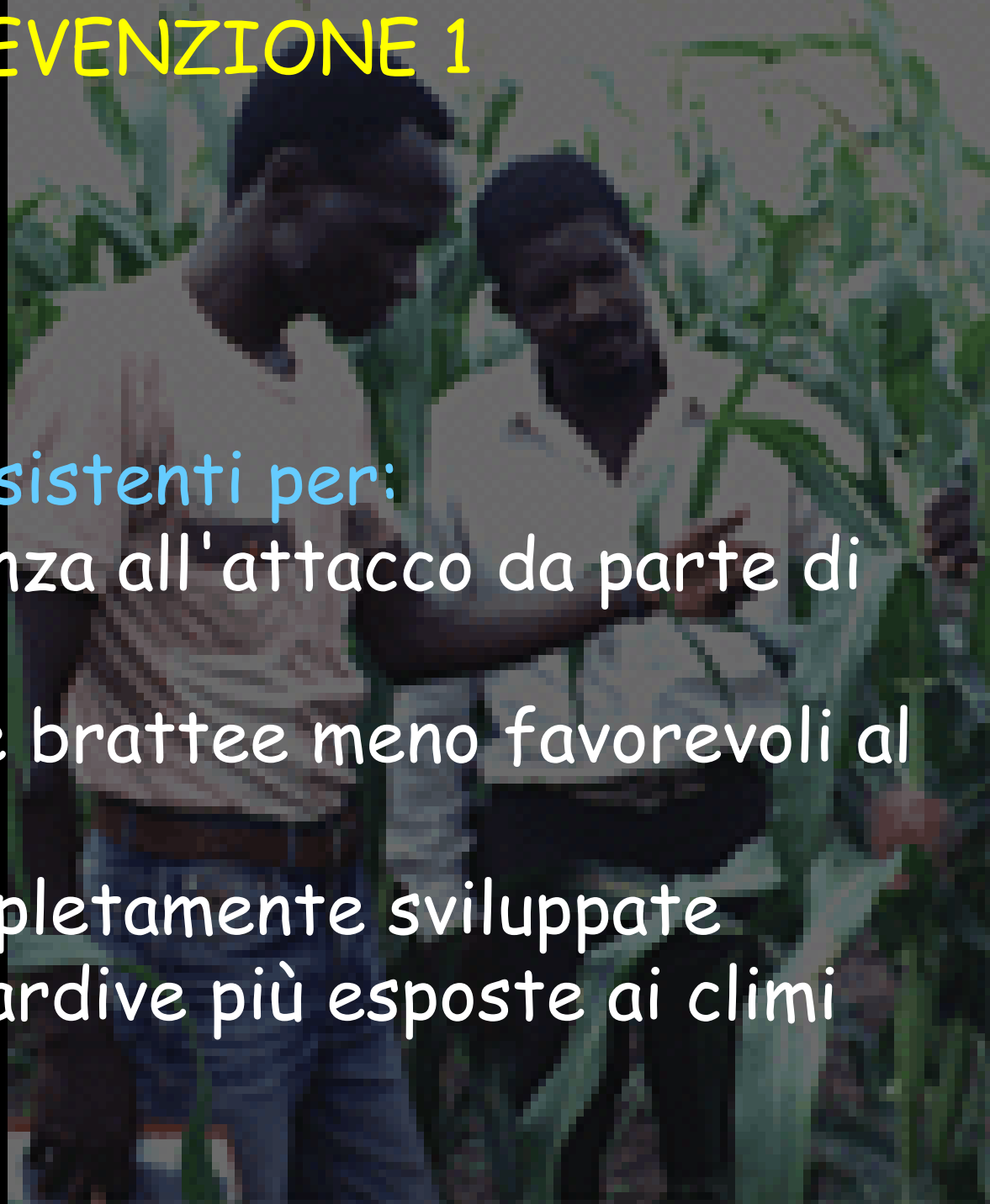
# PREVENZIONE 1

In campo:

- pratiche colturali

Scelta di ibridi resistenti per:

- maggiore resistenza all'attacco da parte di insetti
- disposizione delle brattee meno favorevoli al ristagno di acqua
- brattee non completamente sviluppate
- varietà troppo tardive più esposte ai climi autunnali



# PREVENZIONE 1

In campo:

- pratiche colturali
- selezione ibridi resistenti
- selezione caratteri morfologici (brattee)
- selezione specie precoci



# PREVENZIONE 2

Trattamenti di inibizione:

- della crescita di muffe
- produzione tossine

con:

- inibitori della crescita

- inibitori della biosintesi (dichlorvos - insetticida organofosforico- e caffeina)

- alcuni surfattanti (inibizione crescita e produzione)



# PREVENZIONE 2

## TRATTAMENTI

- inibitori della crescita
- inibitori della biosintesi (dichlorvos - insetticida organofosforico- e caffeina)
- surfattanti (inibizione crescita e produzione)





## PREVENZIONE 3

Contaminazione  
secondaria:

- raccolta
- essiccazione
- conservazione
- trasformazione
- manipolazione
- trasporto

evitare lesioni o  
rottture del seme

# PREVENZIONE

Tecniche e condizioni operative  
Trattamenti

INATTIVAZIONE/DETOSSIFICAZIONE

CHIMICI  
FISICI  
BIOLOGICI

# REQUISITI DI UN SISTEMA DI DETOSSIFICAZIONE (FAO/FDA)

- Prodotti non tossici (nel prodotto e nei foraggi)
  - Proprietà nutrizionali
- Caratteristiche fisiche e sensoriali
  - Economicamente conveniente
  - Applicabilità tecnologica
  - Efficace su miceli e spore
- Impatto ambientale del processo

# METODICHE PROPOSTE

Separazione meccanica

Trattamenti a caldo

Estrazione con solventi

Detossificazione con agenti chimici/biologici

Adsorbenti

# SEPARAZIONE

Rimozione manuale del  
materiale contaminato

Rimozione  
densitometrica

Durante la macinazione



# TRATTAMENTI CHIMICI

AF → composti meno tossici

Condizioni di P e T di reazione drastiche

Non sicure (prodotti o residui tossici)

Scarsa gradevolezza (modificazioni funzionali, nutrizionali, organolettiche)

Attualmente in uso: ammonificazione e sodio bisolfito per alimentazione animale



# TRATTAMENTO CON AMMONIACA

In fase gassosa

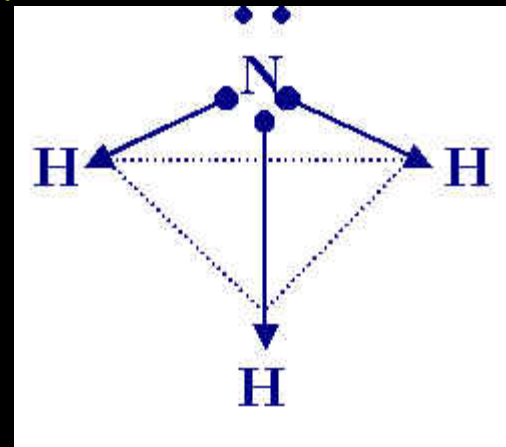
In soluzione

Con precursori che ne rilasciano

**Efficacia correlata con:**

quantità usata  
tempi di reazione  
temperatura  
pressione

presenza di formaldeide

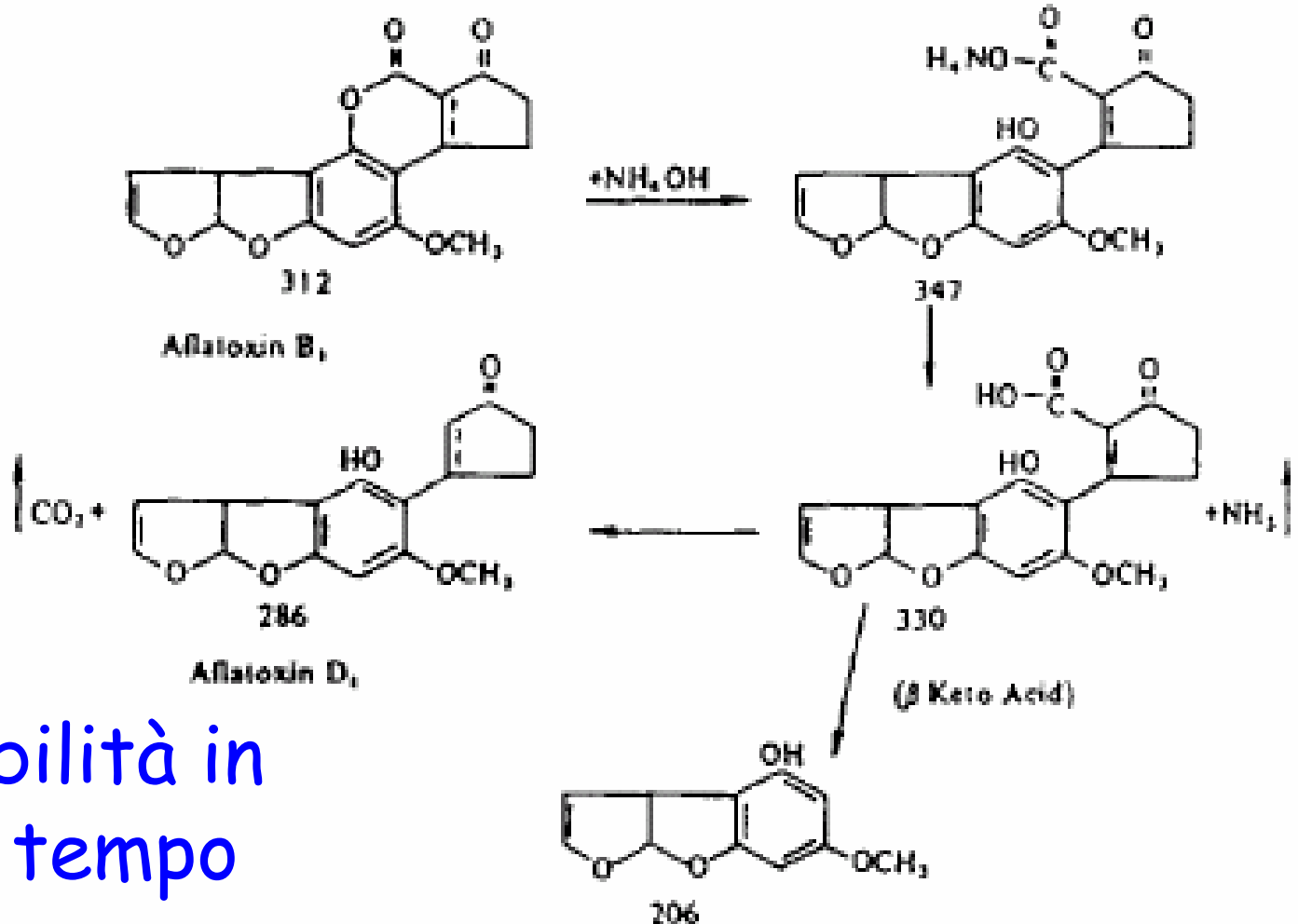




# AMMONIACA

Gas, liquido, precursori produttori

Apertura  
dell'anello  
lattonico



Irreversibilità in  
funz. del tempo

Quantità, tempo, temperatura, pressione, formaldeide



# VANTAGGI

tossicità di AFD1 rispetto AFB1 è da 130 a 20.000 volte minore, mentre tossicità di AFM1 è simile ad AFB1



# SVANTAGGI

- aggressività dell'ammoniaca
- può diventare esplosiva
- imbrunimento del foraggio
- aumento del contenuto totale di azoto e dell'azoto non proteico con riduzione della solubilità dell'azoto ed abbattimento del contenuto di alcuni AA (citisina, metionina, lisina).



# TRATTAMENTO CON SODIO BISOLFITO

Meno efficace dell'ammoniaca

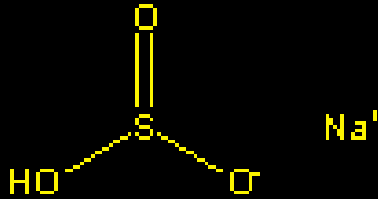
Stessi svantaggi

Ma costo molto minore

Già in uso

Sodio Bisolfito

$\text{NaHSO}_3 = 104,07$



## MECCANISMO

Ancora poco chiaro

Alterazione anello furanico → NO legame con  
DNA → riduzione mutagenicità

# TRATTAMENTO CON CALCIO IDROSSIDO

Detossificante da solo e in associazione con  
formaldeide

Pratica già in uso



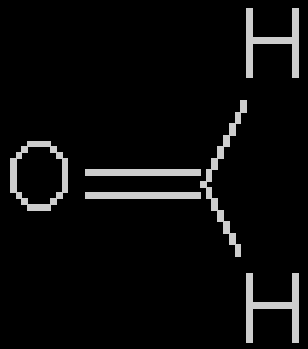
## VANTAGGI

Costi contenuti  
Facilità di utilizzo



## SVANTAGGI

Modifiche organolettiche  
Efficacia dose dipendente  
Efficacia diversa sulle tossine



# TRATTAMENTO CON FORMALDEIDE

Efficacia moderata

Meccanismo di reazione

Efficacia maggiore in associazione con  
ammoniaca e calcio idrossido

Efficacia in funzione della tossina e dello stato  
fisico del substrato

# ALTRI TRATTAMENTI

Essenzialmente **ossidanti** quali:

sodio ipoclorito  
permanganato di potassio  
perossido di idrogeno  
sodio borato

Scarsa documentazione

# TRATTAMENTI CHIMICI

## CONCLUSIONI

✓ Efficacia



✗ sicurezza dei prodotti di reazione

✗ caratteristiche nutrizionali

✗ costi



# FISICI

Estrazione con solventi

Adsorbimento

Inattivazione da calore o irradiazione

# ESTRAZIONE

Applicata agli oli di arachidi e di cotone per alimentazione animale

Solventi:

Et-OH 95%, H<sub>2</sub>O/Acetone 10/90, isopropanolo 80%,  
Esano/Me-OH, Me-OH/H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, Esano/Et-  
OH/H<sub>2</sub>O, Acetone/esano/H<sub>2</sub>O

rapporto V solvente/ Massa campione

Ottima efficacia

Costi elevati

estratti tossici

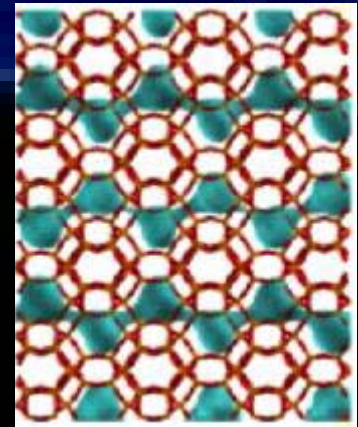
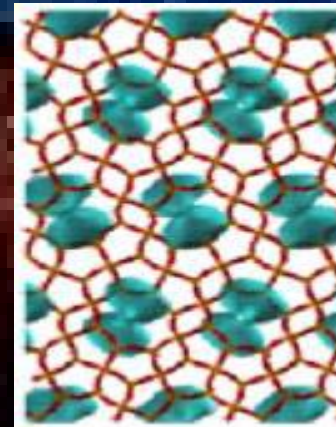
**non applicabile su larga scala**



# ADSORBENTI

## VANTAGGI

Costi contenuti  
facile applicabilità



## SVANTAGGI

Risultati contrastanti  
meccanismo non chiaro  
Uniformità matrice  
interazioni matrice-substrato

# TEMPERATURA

T di decomposizione delle AF tra 237-306°C

Condizioni da cucina inefficaci  
distruzione non completa,

Variabili:

grado di contaminazione

temperatura e tempi di trattamento

Natura del substrato, tipo di AF  
pH

Ioni, pretrattamenti, T (pastorizzazione)

Maggiore è la contaminazione, più efficace è  
l'inattivazione da calore



# VARIABILI CALORE

## Pretrattamento di irradiazione

lampada la tungsteno → apertura dell'anello lattonico con  
formazione di acido carbossilico → a caldo perso per  
decarbossilazione

## Presenza di ioni

in autoclave l'inattivazione è direttamente funzionale alla  
quantità di NaCl

## Pastorizzazione del latte: risultati contrastanti

AFM1 non è stabile

Variabili: laboratori, substrati, tempi, livello di contaminazione  
iniziale, metodo analitico, tipo di contaminazione (naturale o  
artificiale)

# MICROONDE

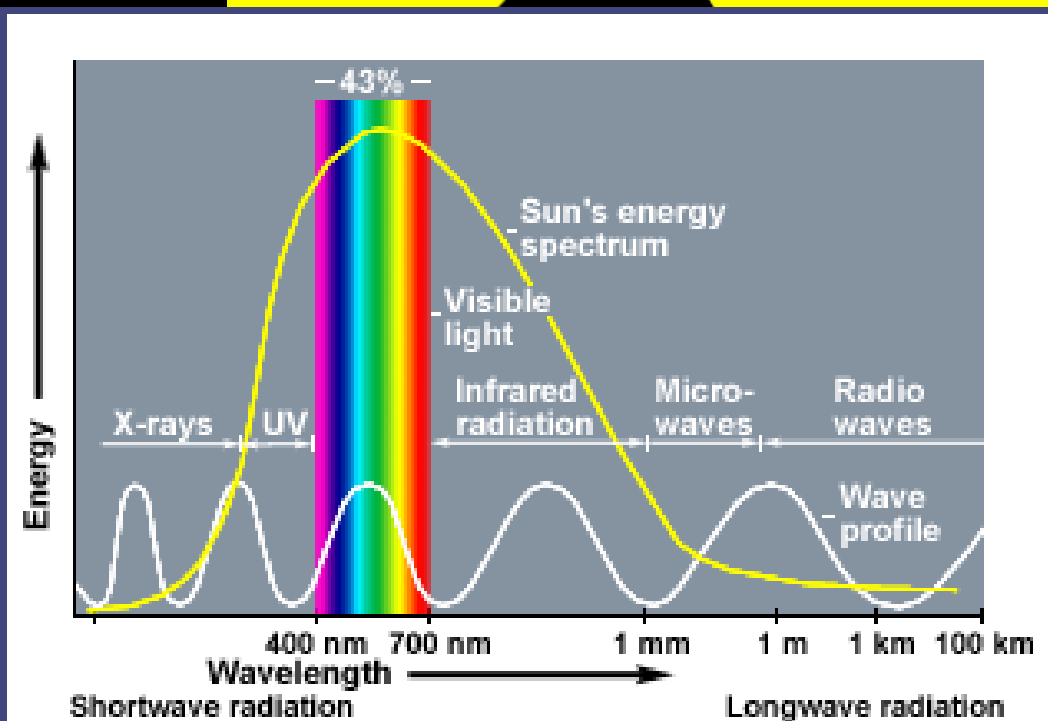
Riscaldamento per microonde è il più promettente

Efficacia in funzione della potenza e della durata



# IRRADIAMENTO

Ionizzanti raggi x, raggi gamma, UV

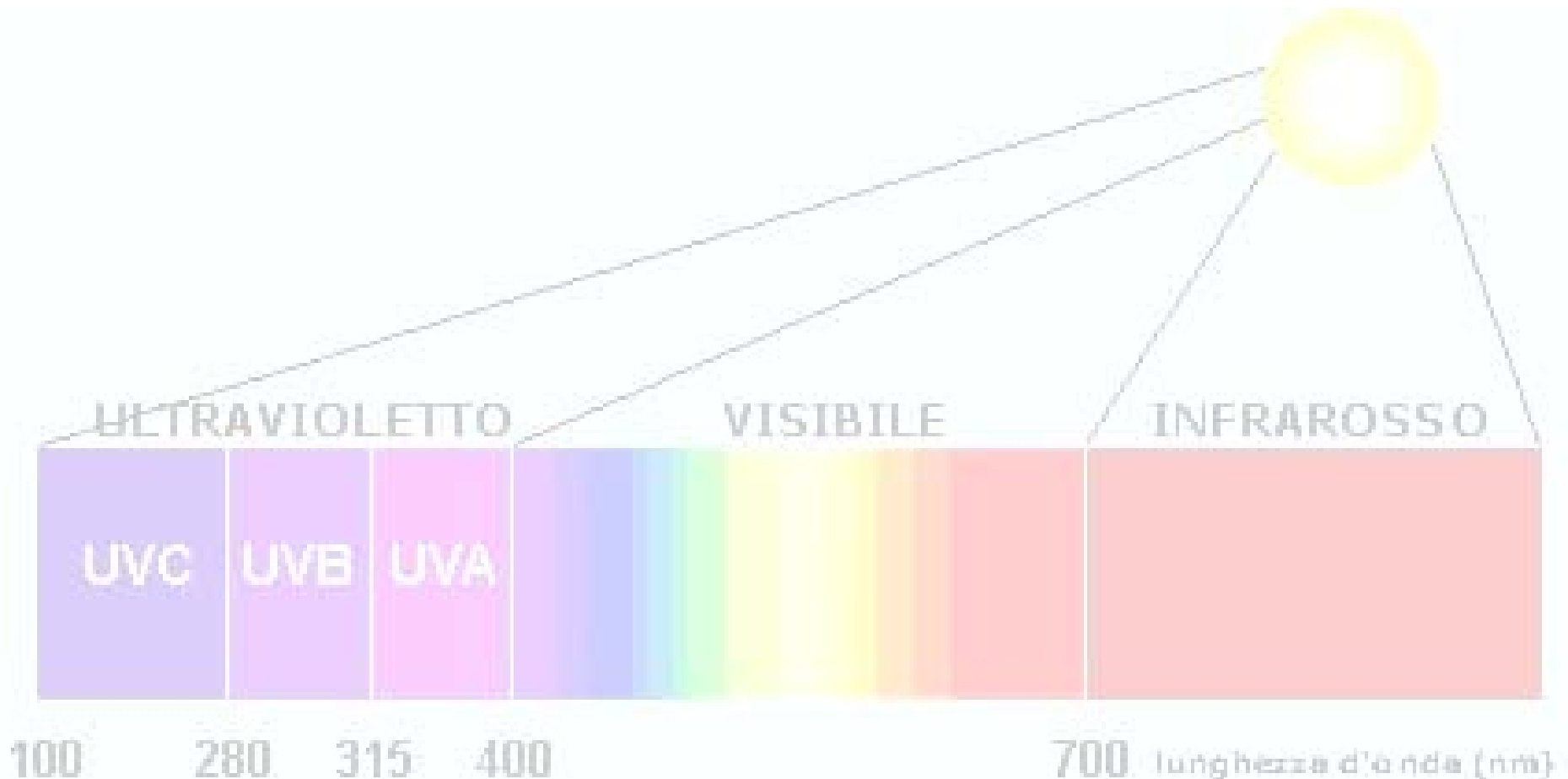


Non ionizzanti  
radio,  
microonde, IR  
e VIS

Alimenti irradiati e salute?

# RADIAZIONI UV

AF sono sensibili alle radiazioni UV  
AFB1 UV max 222, 265, 362 nm



# RADIAZIONI UV

AF sono sensibili alle radiazioni UV

AFB1 UV max 222, 265, 362 nm

Variabili:

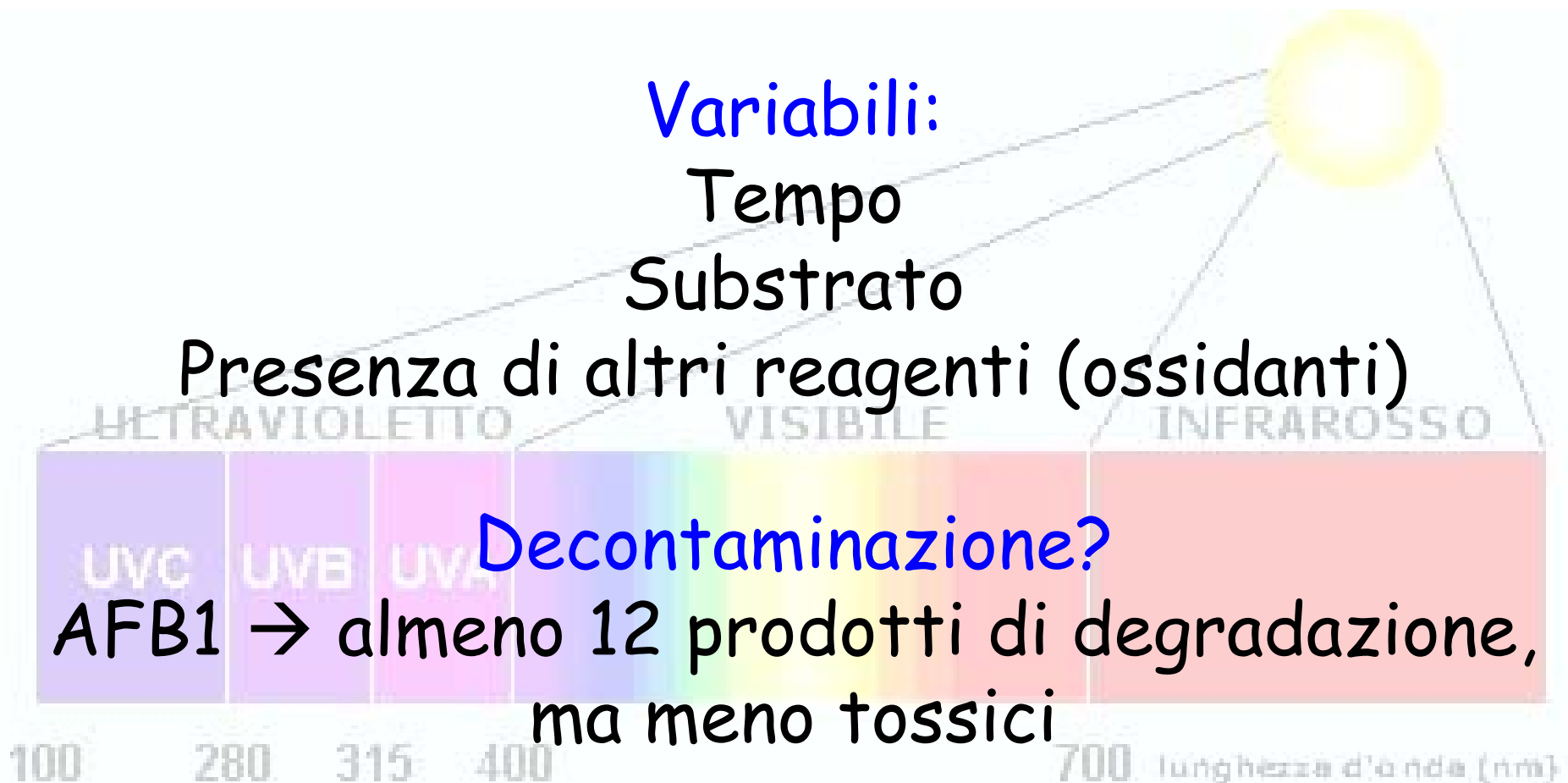
Tempo

Substrato

Presenza di altri reagenti (ossidanti)

Decontaminazione?

AFB1 → almeno 12 prodotti di degradazione,  
ma meno tossici



# RADIAZIONI UV

AF sono sensibili alle radiazioni UV

AFB1 UV max 222, 265, 362 nm

## RAGGI GAMMA

trattamento più efficace

Meccanismo: formazione di radicali

## RADIAZIONE SOLARE

Scarsa riproducibilità

Applicabilità limitata dalla scarsa selettività





# RAGGI GAMMA

trattamento più efficace

Parametri: tempo, intensità, presenza di acqua.

Meccanismo: formazione di radicali

Applicabilità limitata dalla scarsa selettività



# RADIAZIONE SOLARE

Table 6. Destruction of aflatoxins in foods by solar energy

Exposure time	Country	Food	Destruction (%)	Reference
6 h	India	Peanut cake <sup>a</sup>	50	Shantha & Murthy, 1981
6 h	India	Casein <sup>a</sup>	83	Shantha & Murthy, 1981
10 h	Nigeria	Maize, millet <sup>b</sup>	30, 16	Okonkwo & Nwokolo, 1978
14 h	India	Peanut flakes <sup>a</sup>	90	Shantha <i>et al.</i> , 1986
14 h	India	Peanut flakes <sup>b</sup>	50	Shantha <i>et al.</i> , 1986
15 min	India	Peanut oil <sup>b</sup>	99	Shantha & Murthy, 1977
10, 40 min	USA	Olive oil <sup>a</sup>	55, 95	Mahjoub & Bullerman, 1988

<sup>a</sup> Artificially contaminated.

<sup>b</sup> Naturally contaminated.

Efficacia poco riproducibile  
Più efficace su contaminazione artificiale  
Contaminazione naturale → influenza di legami  
con proteine

# RADIAZIONE SOLARE

Table 6. Destruction of aflatoxins in foods by solar energy

Exposure time	Country	Food	Destruction (%)	Reference
6 h	India	Peanut cake <sup>a</sup>	50	Shantha & Murthy, 1981
6 h	India	Casein <sup>a</sup>	83	Shantha & Murthy, 1981
10 h	Nigeria	Maize, millet <sup>b</sup>	30, 16	Okonkwo & Nwokolo, 1978
14 h	India	Peanut flakes <sup>a</sup>	90	Shantha <i>et al.</i> , 1986
14 h	India	Peanut flakes <sup>b</sup>	50	Shantha <i>et al.</i> , 1986
15 min	India	Peanut oil <sup>b</sup>	99	Shantha & Murthy, 1977
10, 40 min	USA	Olive oil <sup>a</sup>	55, 95	Mahjoub & Bullerman, 1988

<sup>a</sup> Artificially contaminated.

<sup>b</sup> Naturally contaminated.

Efficacia poco riproducibile  
Più efficace su contaminazione artificiale  
Contaminazione naturale → influenza di legami  
con proteine

# BIOLOGICI

microrganismi acido-produttori possono metabolizzare ed inattivare AF

**Flavobacterium aurantiacum:**  
converte AFB1 → AFB2A  
1000 volte meno tossica

Via batterica come via integrativa  
Alterazioni sostanziali

La tossina è assorbita o metabolizzata?

# VIE BIOLOGICHE CONCLUSIONI

microrganismi funzionano da degradatori

Identificare nuovi ceppi più attivi e più  
efficaci

meccanismo di resistenza (uptake selettivo  
sulle membrane, decomposizione enzimatica,  
formazione di complessi, ecc)

Effetti limitati, valori nutritivi e proprietà  
organolettiche alterate

# CONCLUSIONI

## Prevenzione:

- Limitare la contaminazione, tecniche colturali, di trasformazione, ecc
- Utilizzo di specie resistenti

## LA MIGLIORE TECNICA?

### Efficacia in funzione di:

natura dell'alimento, composizione, forma fisica, tipo di aflatossina, livello di contaminazione, grado di associazione tra aflatossina e costituenti dell'alimento

# RIMOZIONE COMPLETA O PARZIALE

FAO/WHO Expert committee:

la presenza delle aflatossine dovrebbe essere  
limitata a "livelli irriducibili" ovvero alla  
"concentrazione di una sostanza che **non può  
essere rimossa** da un alimento senza rimuovere  
l'alimento stesso o senza comprometterne le  
caratteristiche"

**Table 8. Maximum permitted level of aflatoxin B1 in different animal feeds established by the EEC<sup>a</sup>**

Feed	Level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
<i>Straight feeds<sup>c</sup></i>	
Peanut, copra, palm kernels, cotton seed, babassu, maize and products derived therefrom	20
<i>Compound feeds<sup>d</sup></i>	
Complete feeds	
Feeds for cattle, sheep and goat (except dairy cattle, calves and lambs)	50
Feeds for pigs and poultry (except young animals)	20
Other complete feeds	10
Complementary feeds	
Feeds for cattle, sheep and goats (with exception of dairy animals)	50
Feeds for pigs and poultry (with exception of young animals)	30
Other complementary feeds	5

<sup>a</sup> EEC (1991).

<sup>b</sup> Based on feed moisture content of 12%.

<sup>c</sup> Feed composed of a single item.

<sup>d</sup> Feed composed of a mixture of items.



**Table 8. Maximum permitted level of aflatoxin B1 in different animal feeds established by the EEC<sup>a</sup>**

Feed	Level ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>b</sup>
<i>Straight feeds<sup>c</sup></i>	
Peanut, copra, palm kernels, cotton seed, babassu, maize and products derived therefrom	20
<i>Compound feeds<sup>d</sup></i>	
Complete feeds	
Feeds for cattle, sheep and goat (except dairy cattle, calves and lambs)	50
Feeds for pigs and poultry (except young animals)	20
Other complete feeds	10
Complementary feeds	
Feeds for cattle, sheep and goats (with exception of dairy animals)	50
Feeds for pigs and poultry (with exception of young animals)	30
Other complementary feeds	5

<sup>a</sup> EEC (1991).

<sup>b</sup> Based on feed moisture content of 12%.

<sup>c</sup> Feed composed of a single item.

<sup>d</sup> Feed composed of a mixture of items.