



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI  
RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

UTILIZZO DELL'OZONO PER LA  
DETOSSIFICAZIONE DI AFLATOSSINE  
IN CEREALI

Relatore  
Prof. Luca Sella

Laureando  
Kevin Busato

Matricola n.  
2006868

ANNO ACCADEMICO 2023/2024



## INDICE

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUZIONE.....	7
2 AFLATOSSINE	
2.1 Caratteristiche.....	9
2.2 Funghi produttori.....	12
2.3 Tossicità e rischi per la salute del consumatore.....	14
2.4 Metodi correntemente utilizzati per la detossificazione delle aflatossine nell'industria alimentare.....	18
3 UTILIZZO DELL'OZONO PER DETOSSIFICARE LE AFLATOSSINE NEI CEREALI	
3.1 Generalità.....	23
3.2 Utilizzo in mais e prodotti derivati.....	24
3.3 Utilizzo in frumento.....	28
4 MECCANISMO D'AZIONE DELL'OZONO	
4.1 Contro le aflatossine.....	31
4.2 Contro <i>Aspergillus flavus</i> .....	33
5 TOSSICITÀ DEI PRODOTTI DI DEGRADAZIONE GENERATI DALL'OZONO.....	37
6 PRO E CONTRO DELL'UTILIZZO DI OZONO COME AGENTE DETOSSIFICANTE	
6.1 Aspetto biologico.....	39
6.2 Qualità organolettica e nutrizionale.....	40
6.3 Aspetto economico.....	42
7 LEGISLAZIONE RIGUARDO L'USO DELL'OZONO IN POST RACCOLTA.....	45
8 CONCLUSIONI.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	49



## RIASSUNTO

I cereali, principalmente mais e frumento, sono la principale fonte di carboidrati nella dieta di tutto il mondo. Il cambiamento climatico porta a stagioni primaverili ed estive sempre più calde e siccitose, facilitando l'infezione delle colture da parte di alcuni funghi produttori di tossine. Tra queste, le aflatossine sono dei metaboliti tossici prodotti da due specie di *Aspergillus* che causano danni acuti e cronici alla salute umana, oltre ad arrecare ingenti perdite economiche per lo scarto di granella contaminata. Per questo gli studiosi sono alla continua ricerca di metodi innovativi per la detossificazione delle aflatossine in cereali e nei prodotti derivati.

Tra i metodi chimici sperimentali, in questo elaborato viene presentato l'uso dell'ozono (O<sub>3</sub>) per la detossificazione delle aflatossine in cereali. L'O<sub>3</sub> è una molecola ossidante che non lascia residui dopo il trattamento, e può essere sfruttata come sistema per la degradazione delle aflatossine, con formazione finale di prodotti secondari a ridotta o nulla tossicità.

L'ozonizzazione, ad oggi permessa solo per il trattamento delle acque potabili in Europa, porta a molti altri vantaggi, ad esempio, intacca solo minimamente la qualità organolettica e nutrizionale del prodotto trattato, limita lo sviluppo di microrganismi e insetti, e anche dal punto di vista economico è un metodo vantaggioso rispetto ai trattamenti chimici correntemente utilizzati.

## ABSTRACT

Cereals, mainly corn and wheat, are the main source of carbohydrates in the world's diet. Climate change leads to increasingly hot and dry spring and summer seasons, facilitating infection of crops by certain toxin-producing fungi. Among these, aflatoxins are toxic metabolites produced by two species of *Aspergillus* that cause acute and chronic damage to human health, as well as causing huge economic losses from the discarding of contaminated grain. Therefore, researchers are continuously searching for innovative methods to detoxify aflatoxins in grain and grain products.

Among the experimental chemical methods, the use of ozone ( $O_3$ ) for detoxification of aflatoxins in grain is presented in this paper.  $O_3$  is an oxidizing molecule that leaves no residue after treatment, and can be exploited as a system for the degradation of aflatoxins, with final formation of secondary products with reduced or no toxicity.

Ozonation, to date permitted only for the treatment of drinking water in Europe, leads to many other advantages, for example, it only minimally affects the organoleptic and nutritional quality of the treated product, limits the development of microorganisms and insects, and is also economically an advantageous method compared to currently used chemical treatments.

# 1 INTRODUZIONE

Il mais (*Zea mays*, L.) e il frumento tenero (*Triticum aestivum*, L.) sono tra i due cereali più coltivati in Italia e nel mondo. Nel 2023, la produzione nazionale si aggira intorno a 5.216.908,8 tonnellate in 507.520 ettari per il mais [ISTAT, 2023] e 3.068.989,5 tonnellate in 601.070 ettari per il grano [ISTAT, 2023].

La destinazione di questi cereali sono principalmente due: la trasformazione in prodotti/ingredienti per l'alimentazione umana e l'utilizzo per la zootecnia. Sia per la produzione di cibi per la dieta umana, sia per produrre mangimi per animali da reddito (con limiti meno restrittivi), si devono rispettare dei requisiti chimici, fisici e microbiologici della materia prima che garantiscano la sicurezza igienico-sanitaria del prodotto.

Un problema molto riscontrato oggi è la presenza di micotossine che contaminano la granella dei cereali, specialmente aflatossine. Questi metaboliti secondari sono tossici per la salute dell'uomo e degli animali, si attivano cambiando conformazione nel fegato e inducono diversi sintomi, nel peggiore dei casi possono portare alla formazione di carcinomi epatocellulare (HCC). La micotossina, in base alla quantità ingerita nel tempo, causa tossicità acuta o cronica. Oltre a minacciare la salute umana e animale, le aflatossine minacciano anche l'economia degli agricoltori e delle industrie alimentari con stime future di perdite per l'industria del mais statunitense che vanno da 52,1 milioni di dollari a 1,68 miliardi di dollari all'anno [Mitchell et al., 2016].

Questi metaboliti tossici sono prodotti principalmente da due funghi *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, i quali si sviluppano sia in campo, sia nei magazzini di stoccaggio della granella. Se le cariossidi dei cereali non vengono essiccate entro 24 ore dalla raccolta fino al raggiungimento del 14% di umidità, si possono sviluppare i funghi sopracitati (soprattutto *A. flavus* perché più tollerante allo stress idrico) con conseguente produzione di aflatossine. La difficoltà si presenta in special modo in annate siccitose con alte temperature primaverili/estive (30-38°C), che sono sempre più frequenti soprattutto nel periodo di fioritura della pianta di mais (luglio-agosto) e nel periodo di fioritura e maturazione del grano (maggio-giugno). La pianta, a causa

del forte stress idrico subito, abbassa le difese, ne conseguono sia attacchi da parte di insetti, sia microfessurazioni della granella e creazione quindi di ottime vie di infezione per il fungo produttore di tossine. In aggiunta il vegetale attiva delle risposte difensive, ad esempio specie reattive dell'ossigeno (ROS), causando in *A. flavus* una ancora maggiore produzione di AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>.

La vera sfida in industria alimentare sta quindi nell'andare a trovare dei metodi efficaci per detossificare la materia prima, ma anche i prodotti derivati, contaminati in campo e in stoccaggio, e contenenti quindi alte concentrazioni di aflatossine.

Ad oggi i metodi permessi per la detossificazione sono abbastanza ridotti per quanto riguarda gli alimenti, dato che il Regolamento UE 915/2023, determina i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti, e indica i metodi fisici che possono essere utilizzati per la degradazione di tossine in prodotti per la dieta umana. Invece, per la riduzione del contenuto di aflatossina in mangimi zootecnici la legge permette anche l'utilizzo di metodi chimici, molto efficienti rispetto ai soli metodi fisici.

L'impossibilità di utilizzo di metodi fisici come calore secco o umido, irraggiamento gamma o UV, microonde e materiali assorbenti, non adatti per alcune produzioni alimentari industriali o poco performanti, portano ad un continuo studio e ricerca di nuove tecnologie e trattamenti; anche per trovare delle soluzioni agli aspetti negativi che derivano l'uso di prodotti chimici.

Tra i vari metodi chimici viene proposto l'utilizzo dell'ozono in diverse forme (già utilizzato in molti Stati nel mondo ma non ancora permesso in Unione Europea), visto l'assenza di residui nell'alimento dopo il trattamento, la bassa tossicità delle sostanze secondarie che si formano dalla detossificazione delle aflatossine [Luo (c) et al., 2014] e i buoni risultati che si ottengono secondo le ricerche descritte.



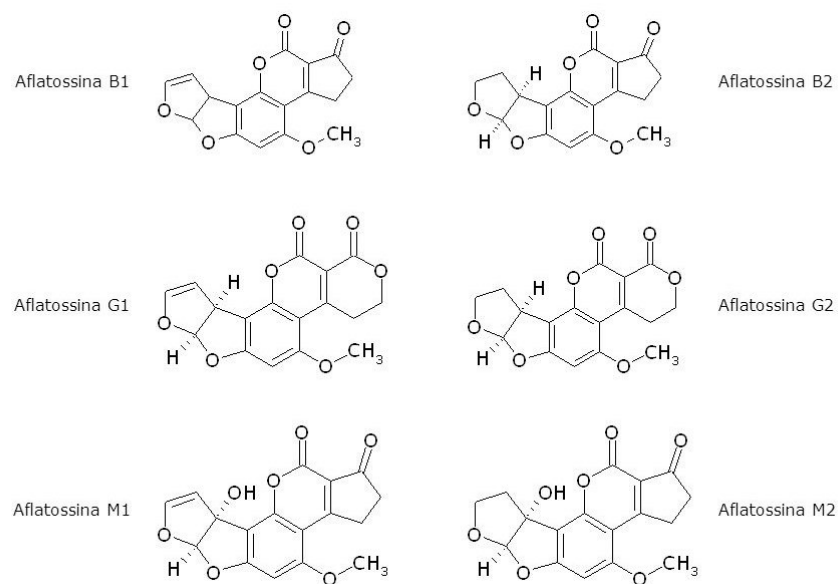
## 2 AFLATOSSINE

### 2.1 Caratteristiche

Nel 1960 ci fu una grave intossicazione che colpì il settore avicolo in Inghilterra, divenuta nota con il nome di "Turkey-X disease". Le ricerche effettuate consentirono l'isolamento dell'agente eziologico ovvero una miscela di composti tossici fluorescenti, le aflatossine (AF).

In natura sono state isolate 18 tipi di aflatossine, anche se le più diffuse negli alimenti sono sei: B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> che emettono fluorescenza blu (Blue) se irradiate con luce UV a 365nm, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> che invece emettono fluorescenza verde (Green) a 365nm. Le ulteriori due aflatossine rilevanti sono dette M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> (da Milk perché trovate nel latte), prodotte da un'idrossilazione metabolica microbica all'interno dell'intestino umano e animale dell'aflatossina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>.

Chimicamente questi metaboliti secondari fungini sono derivati difuranocumarinici, più precisamente 6-metossi-difuro-cumarone, formula bruta C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> (AFB<sub>1</sub>) e metossi-difuro-cumaro-lattone, formula bruta C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> (AFG<sub>1</sub>). La struttura chimica (**figura 1**) dell'AFB<sub>1</sub> è costituita da due anelli furanici (difuro) legati a un anello benzenico a sua volta condensato ad un anello lattonico. La frazione cumarinica formatasi è legata ad un ciclopentanone. Nel benzene in posizione sei è presente un gruppo metilico con l'ossigeno (metossi). Per l'AFG<sub>1</sub> varia solamente la sostituzione del ciclopentanone con un lattone condensato con la frazione cumarinica. AFB<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) e AFG<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>) sono i diidroderivati rispettivamente della AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>. Le aflatossine sono a basso peso molecolare (inferiore a 500u.m.a.), ad alto punto di fusione (269°C per AFB<sub>1</sub>) ed elevata termostabilità (fino a 250°C) [Piro & Biancardi, 2010].



**Fig 1.** Struttura chimica delle principali aflatossine [Piro & Biancardi, 2010].

La via biosintetica delle aflatossine in *A. flavus* consiste in circa 23 reazioni enzimatiche e ha almeno 15 intermedi, l'intero processo di sintesi è codificato da 25 geni identificati all'interno di una regione di DNA di 70 kb sul cromosoma III [Abbas et al., 2009].

In *A. parasiticus* il percorso generale che porta alla formazione delle tossine segue questo schema semplificato: acetato  $\rightarrow$  polichetide  $\rightarrow$  antrachinoni  $\rightarrow$  xantoni  $\rightarrow$  aflatossine. Il substrato iniziale (**figura 2**) è l'acetato che viene convertito grazie all'espressione di tre geni (aflA, aflB, e aflC), in acido norsolorinico (NOR). Questo primo intermedio stabile della via (NOR) viene convertito in averantina (AVN) da un enzima reduttasi/deidrogenasi comandati dai geni (aflD, aflE, e aflF) [Yu et al., 2004]. Yabe et al. (1991) hanno dimostrato per la prima volta come AVN viene successivamente convertita in idrossi-averantina (HAVN) grazie all'espressione del gene aflG che codifica per una monoossigenasi del citocromo P450 [Yu et al., 2004]. Nel 2000 Chang et al., clonando il gene aflH, che codifica per un alcool deidrogenasi, dimostrarono come l'interruzione di aflH provocava l'accumulo di HAVN nel micelio fungino. Questo risultato suggerì loro che HAVN viene convertito in averufina (AVF) dall'enzima codificato dal gene aflH. AVF viene ulteriormente ossidata da un'ossidasi

(gene aflI) formando un altro intermedio, il versiconal-emiactal-acetato (VHA). I geni aflJ e aflK sono impiegati nella sintesi dell'enzima coinvolto nella conversione rispettivamente di VHA in versiconale (VAL) e in versicolorina B (VERB). Questo è un passaggio chiave nella formazione dell'aflatossina poiché chiude l'anello bisfuranico dell'aflatossina. Questo anello è necessario per legarsi al DNA dell'ospite e conferisce quindi l'azione genotossica all'aflatossina. Nello step successivo della via biosintetica dell'aflatossina, c'è un punto di diramazione che separa la biosintesi di AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> da quella di AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>. Avviene la formazione di versicolorina A (VERA) dalla versicolorina B (VERB), grazie al gene aflL, a sua volta trasformata con l'attività di enzimi (gene aflM e aflN) in dimetilsterigmatocistina (DMST), che porta alla futura formazione delle AF tipo 1. Invece altri geni non ancora definiti sono responsabili della conversione diretta da VERB a dimetildiidrosterigmatocistina (DMDHST) che porta alla futura formazione di AF tipo 2. Entra poi in gioco O-metiltransferasi I che ha due distinte attività in *A. parasiticus*: la conversione di DMST in sterigmatocistina (ST) e la conversione del DMDHST in diidrosterigmatocistina (DHST) [Yabe et al.,1989]. Si giunge quindi alla formazione della AFB<sub>1</sub> e della AFG<sub>1</sub> dalla reazione dell'enzima monoossigenasi NADPH-dipendente (gene aflQ) che reagisce con O-metilsterigmatocistina (OMST), formata dalla conversione della ST (gene aflP). Allo stesso modo, lo stesso enzima (gene aflQ) reagisce con diidro-O-metilsterigmatocistina (DHOMST), formata dalla conversione della DHST (gene aflP) portando alla formazione della AFB<sub>2</sub> e della AFG<sub>2</sub> [Yu et al., 2004].

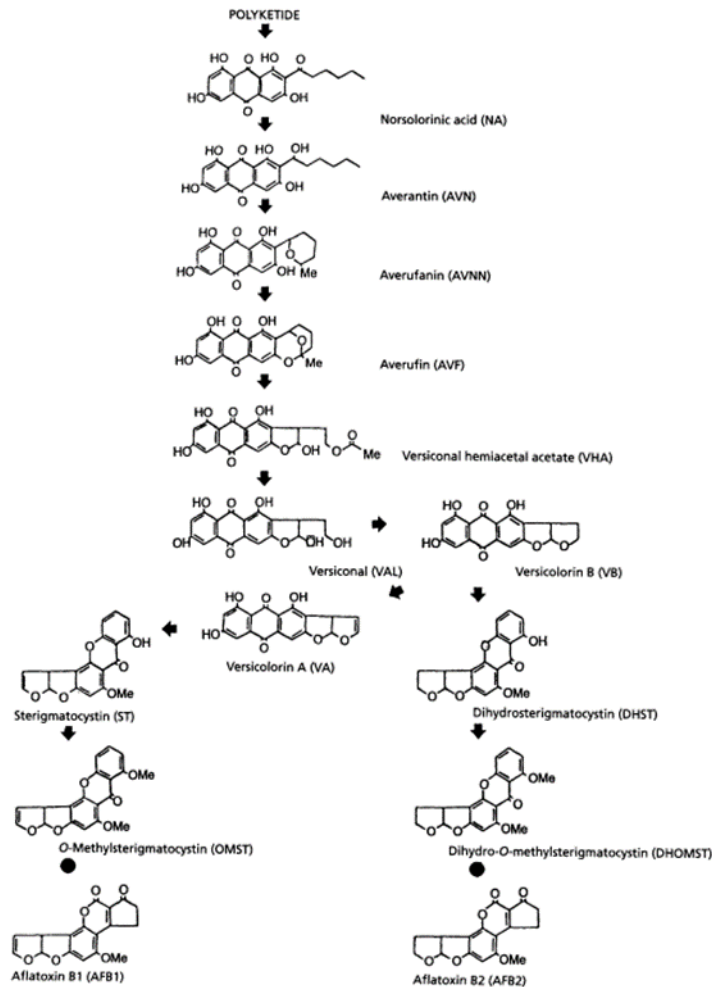


Fig 2. Biosintesi dell'aflatoxina B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> [Trail et al., 1995].

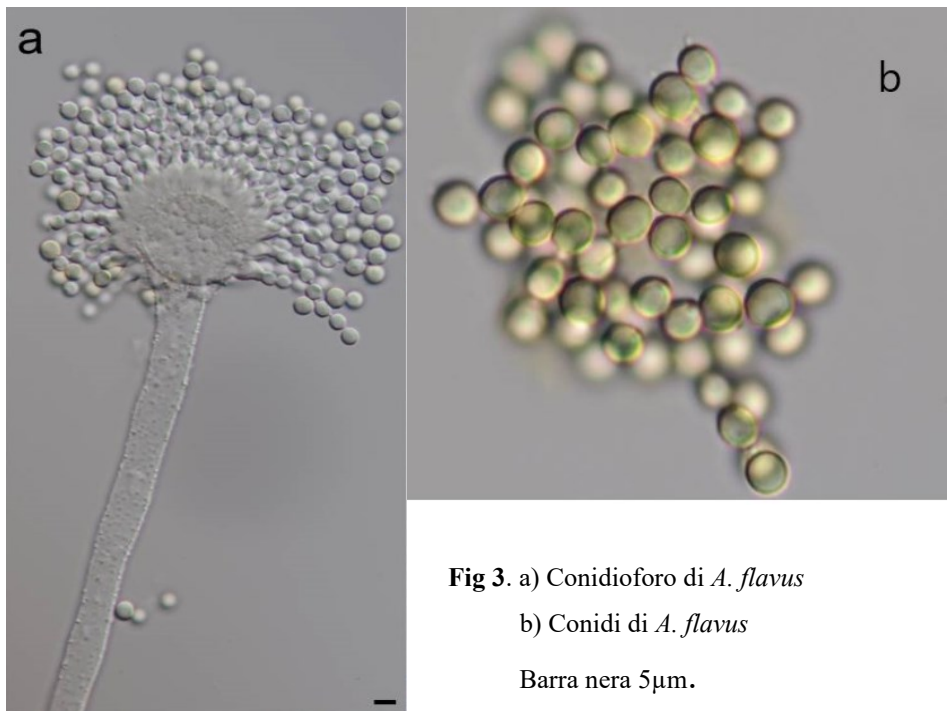
## 2.2 Funghi produttori

Le aflatoxine sono prodotte da funghi appartenenti al Phylum *Ascomycota*, famiglia *Trichocomaceae*, genere *Aspergillus* in particolare nei cereali dalla specie *A. flavus*, ceppi L e S che produce solo AFB e *A. parasiticus* che produce sia AFB sia AFG.

Le colonie di *Aspergillus* variano nell'aspetto, in un primo momento sono giallastre, poi col passare del tempo si trasformano in toni più scuri come il giallo-verde e marrone.

Le ife che compongono il micelio di questi funghi si caratterizzano per essere settate e avere un diametro approssimativo compreso tra 2,8 e 4,4  $\mu\text{m}$  [Haack et al., 2006]. Al microscopio si può notare i conidiofori (figura 3), dalle ife ramificate dove è presente la cellula basale si sviluppa lo stipite che termina con una vescicola. In questo ingrossamento sono inserite le metule, seguono le fialidi dove alle estremità si trovano

i conidi. Quest'ultimi sono considerati i propaguli infettivi che costituiscono il punto di partenza per lo sviluppo del micelio del fungo, per quanto riguarda la riproduzione asessuata. La riproduzione sessuata, molto rara in *Aspergillus* (Deuteromiceti), avviene con la fusione dei gameti maschili e femminili prodotti dai relativi organi sessuali, i quali possono essere presenti anche nello stesso fungo (omotallici).



**Fig 3.** a) Conidioforo di *A. flavus*  
b) Conidi di *A. flavus*  
Barra nera 5 $\mu$ m.

Questi funghi micotossigeni colonizzano principalmente il suolo per questo si possono trovare in cereali come mais o frumento ma anche in arachidi, cotone, noci e spezie. Il maggior problema che causano sugli alimenti è la produzione di tossine, principalmente aflatossine, prodotte in grande quantità più ci si avvicina alla temperatura ottimale tra i 25°C e i 28°C per *A. flavus*, invece per *A. parasiticus* varia in un range tra i 25 e i 35°C. La sintesi delle micotossine si blocca in entrambe le specie al di sotto dei 13°C e al di sopra dei 42°C. *A. flavus* colpisce soprattutto le granaglie nei magazzini dato che è in grado di tollerare basse umidità fino al 15%, cresce ad una

Aw minima di 0,78 e produce la tossina ad una Aw minima di 0,84 [Piro & Biancardi, 2010].

Lo studio condotto da Medina et al. (2017) ha inoltre dimostrato come non ci sia nessuna differenza significativa nella produzione di AFB<sub>1</sub> a diverse temperature (30 e 37 °C) con acqua disponibile (Aw di 0,99). Influisce maggiormente la diversa disponibilità d'acqua, infatti, dall'esperimento si è notato una maggiore produzione di AFB<sub>1</sub> con acqua disponibile (Aw 0,99) rispetto in condizioni di stress idrico (Aw 0,91). Il pH sub-acido (intervallo ottimale di pH tra 5 e 6) induce la formazione della tossina rispetto ad un pH basico. Valori di pH inferiore a 6 favoriscono AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>; invece, valori di pH maggiore a 6 favoriscono AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> sintetizzate solo da *A. parasiticus* [Medina et al., 2017].

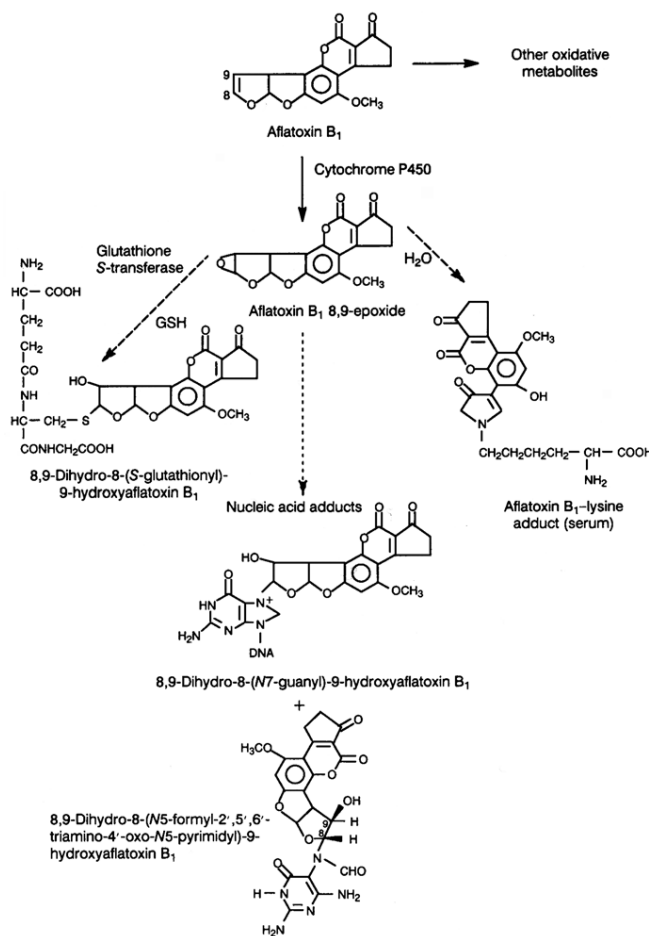
Nel caso dei cereali, soprattutto nel mais e frumento, in stagioni siccitose e con alte temperature (superiori ai 28°C) possono crearsi microlesioni della granella, dovuta oltre che dal clima anche dagli insetti, ad esempio, dalla piralide del mais (*Ostrinia nubilalis*) in Europa. Le conseguenze sono danni alla pianta e alla spiga, che finiscono per essere delle vie preferenziali utilizzate dai funghi per infettare le cariossidi. *A. flavus* essendo una specie fungina molto resistente alla bassa presenza d'acqua rispetto ad altri funghi, si sviluppa ancor più velocemente non avendo competitori. È stata dimostrata una correlazione tra il danno causato dalla piralide alla pianta e l'aumento della percentuale di aflatossina nella granella. Con una percentuale inferiore al 2% di attacco del cereale da parte di *Mussidia nigrivenella* diffusa in Africa meridionale, si ottiene una media di 11,7µg/kg di aflatossina. Con una più alta classe di danno (maggiore del 10%) la media di aflatossine si è alzata a 514,6µg/kg [SETamou et al., 1998].

### 2.3 Tossicità e rischi per la salute del consumatore

Nel 1992, un gruppo di lavoro dell'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) descrisse tutti gli studi sull'uomo rilevanti che erano stati condotti. La maggior parte di questi studi erano stati effettuati nei Paesi in via di sviluppo dell'Africa sub-

sahariana o dell'Asia, dove la morte per carcinomi epatocellulari era abbastanza comune, è infatti il fegato il principale bersaglio di questi metaboliti secondari. I ricercatori facenti parte del gruppo di lavoro dello IARC indicarono che esistevano prove sufficienti di cancerogenicità nell'uomo. Le aflatossine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> rientrano infatti nel gruppo 1 (esiste un'alta correlazione tra sostanza e l'induzione di cancro). Le aflatossine M<sub>1</sub> e M<sub>2</sub> invece, hanno una cancerogenicità circa 10 volte inferiore a AFB<sub>1</sub> [IARC, 2002] per questo sono inserite nel gruppo 2B - potenzialmente cancerogeno per l'uomo: questa categoria viene utilizzata per agenti per i quali c'è limitata evidenza di cancerogenicità nell'uomo e meno che sufficiente evidenza di cancerogenicità negli animali da esperimento.

La cancerogenicità deriva dalla conversione dell'AFB<sub>1</sub> nell'8,9-epossido da parte degli enzimi del citocromo che attivano la tossina. L'8,9-epossido (**figura 4**) è in grado di legarsi a varie strutture, tra cui all'enzima glutatione transferasi, agli acidi nucleici (DNA) e agli amminoacidi della siero albumina (prodotta principalmente nel fegato).



La proporzione di aflatossina convertita in 8,9-epossido (principalmente dagli enzimi del citocromo) rispetto ad altri metaboliti molto meno citotossici e con ridotta mutagenicità prodotti nella stessa via, è diversa in base all'età (differenza principale tra adulti e bambini), tra singoli esseri umani e tra specie animali [Essigmann et al, 1982; IARC, 2002].

**Fig 4.** Legame dell'8,9-epossido con l'enzima glutatione transferasi a sinistra, gli acidi nucleici al centro e la lisina costituente della siero albumina a destra [Essigmann et al, 1982].

La tossicità delle AF si divide in acuta e cronica. L'avvelenamento acuto si verifica quando si ingerisce cibo contaminato con alte concentrazioni di micotossina in un ridotto intervallo di tempo. Attualmente l'incidenza che si verifichi la forma acuta è molto bassa nei Paesi sviluppati, si riscontra maggiormente ma comunque sporadicamente nei Paesi in via di sviluppo (ad esempio Kenya, 2004) dove costretti dalle circostanze economiche, si consuma mais contaminato contenente aflatossine tra 6,25 e 15,6 mg/Kg di mais, con un'assunzione media giornaliera pro capite di 2-6 mg di aflatossine [Krishnamachari et al., 1975; Lewis et al., 2005].

Nel 2007 e nell'aggiornamento del 2020, anche il gruppo CONTAM (EFSA) si è espresso sulla tossicità acuta causata da AFB<sub>1</sub>, dopo aver analizzato vari esperimenti inerenti all'epatotossicità acuta negli animali da esperimento. Nei roditori sono stati riportati valori DL50 orali (morte del 50% delle cavie per somministrazione orale) compresi tra 1 e 18 mg/kg peso cavia [Dhanasekaran et al., 2011]. Per AFG<sub>1</sub> i valori della DL50 misurati sono di 1,5–2,0 mg/kg di peso cavia. Né AFB<sub>2</sub> né AFG<sub>2</sub> hanno mostrato letalità nei ratti a dosi singole fino a 200 mg/kg di peso corporeo [Wogan et al., 1971]. La forma acuta, oltre ad essere letale nel peggiore dei casi, porta anche a diversi sintomi, tra cui vomito, dolore addominale, edema polmonare o cerebrale, necrosi e fegato grasso.

La tossicità cronica è la forma più comune di aflatossicosi ed è causata dal consumo di quantità relativamente ridotte del metabolita tossico per un periodo prolungato. Gli effetti tossici dipendono da fattori quali età, specie, sesso, stato nutrizionale, dose assunta.

Quattro sono le principali conseguenze collegate ad una assunzione di ridotte concentrazioni di aflatossine per un lungo periodo di tempo: insorgenza di carcinoma epatocellulare (HCC), effetti tossici al sistema riproduttivo e al feto, genotossicità e immunotossicità. Al primo posto c'è l'insorgenza del HCC, nello studio di Wogan et al. (1971) si è cercato di trovare una possibile correlazione tra la manifestazione della patologia e l'assunzione di AFB<sub>1</sub>. In questo esperimento scientifico sono stati alimentati dei ratti con una dieta contenente AFB<sub>1</sub> a concentrazioni di 0, 1, 5, 15, 50 e



100 µg/kg per un massimo di 109 settimane (tabella 1).

Concentrazione nell'alimento (µg/Kg)	Durata dell'esperimento (settimane)	Incidenza del tumore	Tempo di apparsa del primo tumore (settimane)
0	109	0/18	-
1	105	2/22	104
5	93	1/22	93
15	96	4/21	96
50	97	20/25	82
100	88	28/28	54

Tab 1. Esperimento su ratti, dimostrazione della tossicità cronica a diverse concentrazioni di AFB<sub>1</sub> [Wogan et al., 1971].

Nel 2020, il gruppo CONTAM (Panel di EFSA) aggiornando un parere scientifico del 2007, ha concluso che l'AFB<sub>1</sub> è chiaramente cancerogena in numerose specie animali. Nei roditori i tumori principali erano al fegato (soprattutto HCC), ma sono stati osservati tumori anche al polmone, ai reni e al colon.

Gli effetti cronici sul sistema riproduttivo, a carico soprattutto di individui maschi, causati dalle aflatossine sono un ritardo nello sviluppo, il cambiamento morfologico, e la riduzione di peso dei testicoli. Inoltre, è ridotto sia l'indice meiotico (utile per la produzione di spermatozoi), sia la vitalità dello sperma [CAST, 2003].

Una terza conseguenza sono i problemi genotossici. Le aflatossine inibiscono la duplicazione del DNA perché hanno un'elevata affinità per gli acidi nucleici (si attaccano soprattutto ai residui di guanina). L'8,9-epossido legandosi al DNA altera l'espressione genica, provocando anche malfunzionamenti nella successiva sintesi proteica [Dhanasekaran et al., 2011].

Visti gli effetti dannosi che questa micotossina ha nell'uomo e negli animali vengono fissati i tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti (tabella 2), tra cui anche nei cereali, dal Regolamento UE 915/2013 in abrogazione del Reg. UE 1881/2006 [G.U.C.E. del 25 Aprile 2023].

Tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti (1)

		Micotossine			
1.1 Aflatossine		Tenore massimo (µg/kg)			Osservazioni
		B <sub>1</sub>	Somma di B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>	
					Per la somma di aflatossine, i tenori massimi si riferiscono alle concentrazioni lower bound, che sono calcolate ipotizzando che tutti i valori inferiori al limite di quantificazione siano pari a zero.

1.1.12	Cereali e prodotti derivati da cereali, ad eccezione dei prodotti di cui ai punti 1.1.13, 1.1.18 e 1.1.19	2,0	4,0	-	Compresi i prodotti trasformati a base di cereali. I prodotti derivati da cereali si riferiscono ai prodotti contenenti almeno l'80 % di prodotti a base di cereali.
1.1.13	Granturco e riso da sottoporre a cernita o ad altro trattamento fisico prima dell'immissione sul mercato per il consumatore finale o per l'impiego come ingredienti di alimenti	5,0	10,0	-	
1.1.18	Alimenti per la prima infanzia e alimenti trasformati a base di cereali destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia (°)	0,10	-	-	Il tenore massimo si applica alla materia secca (°) del prodotto come immesso sul mercato.
1.1.19	Alimenti a fini medici speciali destinati ai lattanti e ai bambini nella prima infanzia (°)	0,10	-	0,025	Il tenore massimo si applica, nel caso del latte, dei prodotti a base di latte e dei prodotti analoghi, ai prodotti pronti per l'uso (immessi sul mercato come tali o ricostituiti secondo le istruzioni del fabbricante), mentre nel caso dei prodotti diversi dal latte, dai prodotti a base di latte e dai prodotti analoghi, si applica alla materia secca (°).

**Tab 2.** Parte dei limiti di legge redatto dalla Commissione Europea sul tenore massimo di aflatoxina B<sub>1</sub> e totali in cereali [G.U.C.E. del 25 Aprile 2023].

## 2.4 Metodi correntemente utilizzati per la detossificazione delle aflatoxine nell'industria alimentare

Ad oggi, sono i metodi fisici i più utilizzati per la detossificazione delle aflatoxine nella granella di cereali e nei prodotti derivati ad uso alimentare.

Principalmente si va a fornire energia, così da degradare la micotossina in molecole non tossiche o con ridotta tossicità. L'energia utilizzata per il trattamento può essere fornita sotto varie forme, di seguito sono descritte le più impiegate nel settore alimentare, tra cui calore secco o umido, radiazioni gamma, radiazioni ultraviolette (UV).

La sensibilità e l'efficienza della disintossicazione con l'uso di diversi tipi di radiazioni è influenzata dal dosaggio energetico e dalla protezione impartita da proteine e altri costituenti alimentari che riducono l'effetto degradativo del trattamento sulle micotossine [Samarajeewa et al., 1990].

Le aflatoxine sono stabili al riscaldamento a secco a temperature inferiori al loro punto di fusione (269 °C). La degradazione termica avviene quindi ad alte temperature da circa 237°C a 306°C, questo range dipende dal tempo di trattamento termico [Milani et al., 2014]. Si è comunque visto che trattamenti attuati nel mais come bollitura, arrostitimento, cottura al forno, cottura a vapore, cottura alcalina (nixtamalizzazione), tostatura ed estrusione vanno a idrolizzare l'anello lattonico in AF tipo 2 (siti vulnerabile alla degradazione), riducendo la concentrazione di AF nei prodotti alimentari. Inoltre, è stato dimostrato che più l'umidità dell'alimento è alta, maggiore

è la riduzione delle AF (l'acqua aiuta ad aprire l'anello lattonico). Ciò comporta che il calore umido è molto più efficiente rispetto al calore secco [Torres et al., 2001; Mendez et al., 2004].

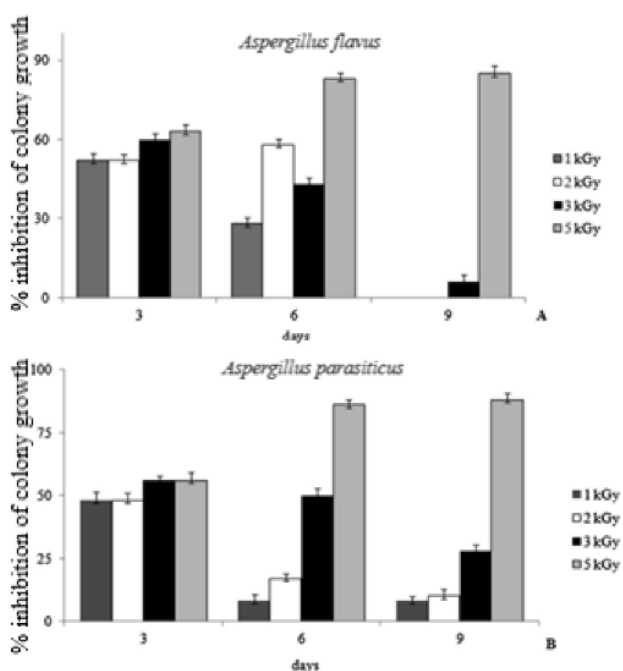
Stoloff et al. (1981) hanno studiato gli effetti della bollitura delle semole di mais, giungendo ad una riduzione media delle aflatossine del 28%, la successiva frittura del prodotto bollito ha determinato una riduzione del 34–53%. La tostatura può ridurre la quantità di aflatossina del 40–80% nel mais [Conway et al., 1978], e anche l'estrusione da sola è in grado di ridurre il contenuto di aflatossina del 50–80%, se viene aggiunto inoltre idrossido d'ammonio (0,7–1,0%) o bicarbonato d'ammonio (0,4%), la diminuzione dell'aflatossina è superiore al 95% [Hameed et al., 1993]. Nel processo di nixtamalizzazione (cottura alcalina) del mais intero si attua una combinazione tra acqua e ossido di calcio, tale procedimento riduce del 51-78% i livelli di aflatossine [Torres et al., 2001]. Questi metodi/cotture possono essere sfruttati solo da chi produce determinati alimenti, ad esempio, nixtamalizzazione per la produzione di farina di mais per tortillas, tortilla chips e chips di mais, inoltre le alte temperature possono intaccare la qualità organolettica dell'alimento stesso e per questo molte volte sono metodi non ottimali e non utilizzabili in industria alimentare.

La seconda grande categoria di metodi fisici utilizzati per detossificare i cereali e prodotti derivati per dieta umana sono le radiazioni, le quali si possono dividere in due tipi: ionizzanti e non ionizzanti. Le radiazioni ionizzanti più impiegate sono i raggi gamma, utilizzati principalmente negli ambienti di lavorazione degli alimenti. Sfruttando i fotoni ad alta energia (radiazione elettromagnetica) si inducono danni chimici al DNA di microorganismi patogeni e deterioranti (muffe, lieviti, batteri) e insetti. L'irraggiamento con raggi gamma a basse dosi (al di sotto di 20 kGy) non compromettono la sicurezza alimentare, le proprietà nutrizionali e la qualità sensoriale degli alimenti [WHO, 1999]. Al contrario, ad alte dosi (maggiori di 20 kGy), oltre a detossificare le micotossine, possono causare cambiamenti nelle molecole dell'alimento irradiato producendo sostanze pericolose per la salute umana. Questo metodo di natura non termica, per la detossificazione delle aflatossine è stato molto

studiato, giungendo a conclusioni abbastanza discordanti. Alcuni autori sostengono che la riduzione può essere ottenuta solo con alte dosi di radiazioni (20 kGy), altri invece indicano che anche basse dosi (5 kGy) bastino per diminuire la quantità di micotossine sopracitate [Hooshmand et al., 1995; Aziz et al., 2006].

Markov et al. (2015) hanno studiato di quanto si riduceva la quantità di AFB<sub>1</sub> in mais naturalmente contaminato (da 57 a 1210 µg/kg), una volta trattato con radiazioni gamma uguali o al di sotto di 10 kGy poiché secondo le raccomandazioni dell'WHO tale irradiazione non provoca alcun cambiamento delle proprietà nutrizionali e organolettiche degli alimenti trattati, rendendoli conformi per il consumo umano [WHO, 1999]. I risultati ottenuti con 5 kGy su cariossidi di mais sono stati soddisfacenti con una riduzione del 60-80%; aumentando l'irradiazione, aumenta anche la percentuale di diminuzione di AFB<sub>1</sub>; infatti, a 10 kGy è stato ottenuto un calo del 90%. Le radiazioni gamma possono portare a ridurre anche la crescita dei due principali funghi produttori di aflatossine (*A. flavus* e *A. parasiticus*), andando a impedire la germinazione delle spore. La **figura 5** dimostra in vitro la percentuale di inibizione della crescita della colonia rispetto alla crescita della colonia controllo. Con basse dosi (1-2-3 kGy) si ha una riduzione della crescita di *A. flavus* e *A. parasiticus* del 48-60% nei primi giorni di incubazione (cioè, nei primi 3 giorni). Tuttavia, solo

con la dose più alta (5 kGy) si è raggiunto un buon risultato, con inibizione della germinazione fino al 90% anche dopo 9 giorni [Markov et al., 2015].



**Fig 5.** Effetto dell'uso di radiazioni gamma su *A. flavus* e *A. parasiticus* in vitro [Markov et al., 2015].

Le radiazioni non ionizzanti più utilizzate sono le radiazioni dell'ultravioletto (UV-B, UV-C) e le microonde; esse hanno un'intensità sufficiente a provocare un aumento della temperatura che causa dei cambiamenti molecolari, solitamente non pericolosi per l'uomo.

Studi sull'irradiazione ultravioletta indicano che il sito di fotodegradazione dell'aflatossina è il doppio legame nell'anello furanico terminale dell'AFB<sub>1</sub>. Questo preciso sito determina la funzione tossica della micotossina perché viene convertito in 8,9-epossido che a sua volta si lega ad amminoacidi ed enzimi portando a un malfunzionamento del metabolismo della cellula ospite [Samarajeeva et al., 1989].

Le lunghezze d'onda utilizzate sono tre principalmente: 254nm (UV-C), 265nm (UV-C) e 365nm (UV-A, ionizzante). Le aflatossine hanno un massimo assorbimento a 365 nm, questo porta la tossina ad essere più suscettibile alla degradazione. Da prove e studi effettuati da Ghanghro et al. (2016) si è evidenziato come su frumento tenero sia efficace la radiazione UV a 254nm. Chicchi di grano sciolto sono stati esposti ad un'intensità di 0,1 mW/cm<sup>2</sup> a 254 nm (UV-C), a 15 cm di distanza dal tubo che emetteva la luce UV per diversi tempi di esposizione (5, 20, 80 e 160 minuti). I risultati ottenuti hanno mostrato una riduzione media di AF totali del 23%, 44%, 73% e 85%; confermando che maggiore è il tempo di esposizione al trattamento, e maggiore è la percentuale di aflatossine totali degradate [Ghanghro et al., 2016].

Gli svantaggi nell'uso dell'irraggiamento gamma e UV sono la scarsa penetrazione; quindi, la massa di prodotto che si può trattare per ogni ciclo è ridotta. Infatti, perché le radiazioni siano efficaci, devono superare il pericarpo superficiale del cereale, perciò, lo strato di prodotto da trattare deve essere sottile. Le radiazioni gamma e UV possono portare, in alcuni casi, alla formazione di composti con sapore e odore sgradevole che intaccano poi i prodotti derivati come farine, usate come ingrediente per i cibi. Infine, c'è il rischio di ossidazione dei lipidi, ad esempio in farine integrali caratterizzate dalla presenza del germe, ricco in olii, con conseguente produzione di aromi sgradevoli (off-flavours).

I metodi fisici sopra descritti sono permessi dal Regolamento UE 915/2023 della Commissione Europea del 25 aprile 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti (che ha abrogato il Regolamento UE 1881/2006).

I metodi chimici, molto performanti nella riduzione delle aflatossine, non sono permessi per trattare cibi destinati all'alimentazione umana, bensì solo per detossificare mangimi ad uso zootecnico. I buoni risultati che si ottengono con il trattamento chimico del prodotto portano ad una continua ricerca per ridurre al minimo i residui tossici che potrebbero rimanere nell'alimento, ridurre la perdita di caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto. Si cerca inoltre di limitare l'ossidazione dei lipidi e la degradazione delle vitamine e dei composti fenolici presenti nell'alimento. Si forniscono studi anche per incentivare il rilascio da parte della Commissione Europea, dopo parere favorevole di EFSA, dell'autorizzazione all'uso di questi trattamenti chimici in alimenti destinati a dieta umana, già ampiamente utilizzati in alcuni Stati nel mondo.

## 3 UTILIZZO DELL'OZONO PER DETOSSIFICARE LE AFLATOSSINE NEI CREALI

### 3.1 Generalità

L'ozono si trova principalmente sottoforma di gas ed è naturalmente presente in quantità ridotte in atmosfera. È un potente ossidante composto da tre atomi di ossigeno, ed essendo molto instabile sia in fase gassosa sia in soluzione, si decompone in radicali idrossile, idroperossido e superossido [Greene et al., 2012]. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la Food and Drug Administration (FDA) e l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) hanno approvato l'uso dell'ozono in fase gassosa e acquosa nel settore alimentare per l'igiene delle superfici, la sanificazione delle attrezzature e degli stabilimenti alimentari, la decontaminazione delle acque reflue, la disinfezione dei materiali da imballaggio e il controllo dei microrganismi patogeni e deterioranti nei prodotti per consumo umano. La produzione dell'ozono avviene dalla reazione dall'ossigeno biatomico ( $O_2$ ) con i radicali liberi. Per generare radicali liberi si procede con la rottura di forti legami  $O=O$  richiedendo un grande apporto di energia. Ci sono vari metodi per apportare energia, quindi produrre  $O_3$  tra cui l'elettrolisi dell'acqua, l'utilizzo di metodi fotochimici o radiochimici [El-Desouky et al., 2012]. I più utilizzati industrialmente sono l'utilizzo di radiazioni UV e il metodo della scarica a corona. In quest'ultimo metodo, le molecole di  $O_2$  vengono sottoposte ad alte scariche elettriche per dissociarle in radicali liberi, che reagendo ulteriormente con l'ossigeno biatomico portano alla formazione dell'ossigeno triatomico (ozono). L' $O_3$  gassoso viene prodotto sul sito operativo dato che non può essere immagazzinato in bombole, poiché ritornerebbe spontaneamente a formare  $O_2$ .

L'ozono può essere applicato in tre diverse forme, gassoso, acquoso e umido (con vapore) [Mallakian et al., 2017], ed è un potente ossidante, che reagisce con il doppio legame 8,9 dell'anello furanico terminale dell'aflatossina (**figura 6**) attraverso un attacco elettrofilo, provocando la formazione di ozonidi primari (molozonidi), seguita da

riarrangiamento in derivati monozonidi come aldeidi, chetoni, acidi organici e sottoprodotti, tra cui CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O [Conte et al., 2020].

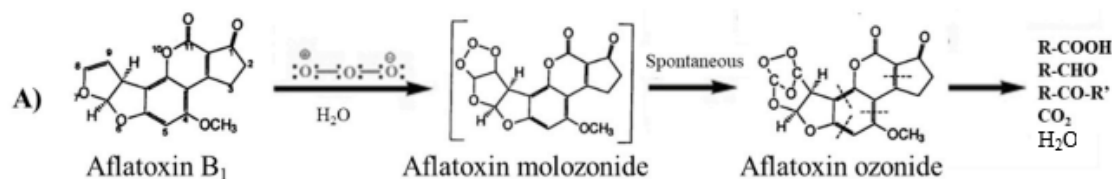


Fig 6. Reazione di degradazione tra AFB<sub>1</sub> e O<sub>3</sub> [Conte et al., 2020].

L'ozonizzazione è una tecnica già utilizzata e permessa in Unione Europea per il controllo di microrganismi (funghi, batteri, virus) nelle acque potabili dato il suo vantaggio di non lasciare residui dopo il trattamento, al contrario ad esempio del cloro, anch'esso molto usato nell'industria alimentare come disinfettante. Si vuole quindi studiare l'uso dell'ozono come possibile soluzione per la detossificazione di aflatossine prodotte da *Aspergillus* in mais e frumento.

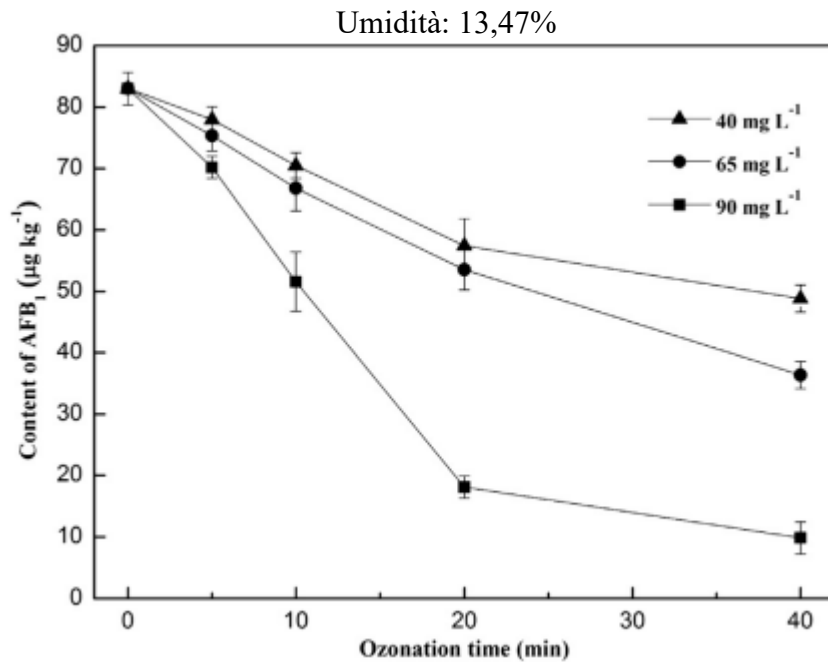
### 3.2 Utilizzo in mais e prodotti derivati

Per il trattamento della granella di mais (ma anche per la maggior parte dei cereali) si utilizza l'ozono in due fasi: gassoso oppure acquoso (O<sub>3</sub> sciolto in acqua). La forma gassosa ha un minor impatto sulla qualità dell'alimento rispetto alle altre due forme (acquoso e vaporizzato) [Mallakian et al., 2017]. Il gas, una volta prodotto nel luogo di trattamento, viene insufflato all'interno dei silos contenente la partita di granella. Così facendo l'ozono reagisce con i vari organismi e molecole presenti nei silos, quindi insetti, microrganismi, altri gas e soprattutto con le aflatossine, che potrebbero essere presenti all'interno e/o sulla superficie delle cariossidi di mais [Tiwari et al., 2010].

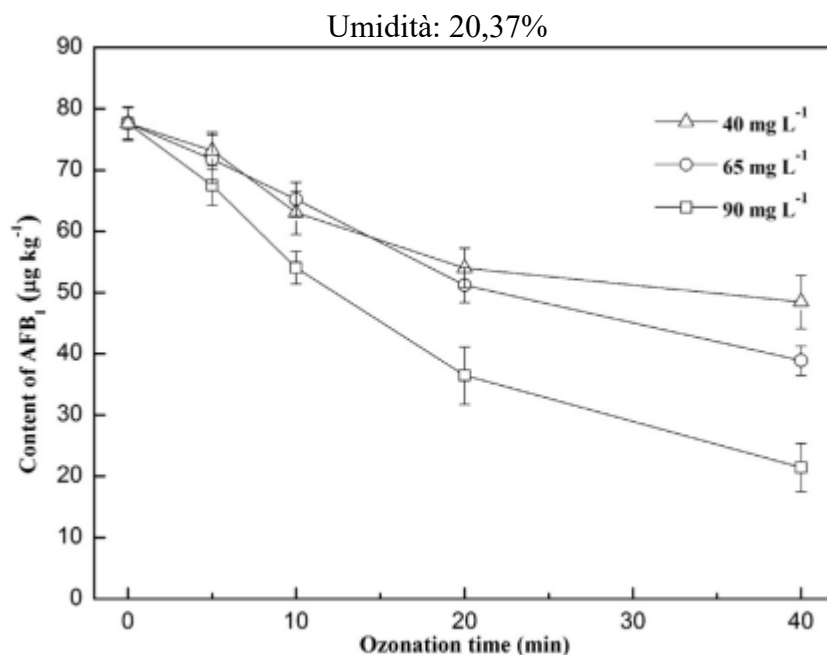
Luo (a) et al. (2014) hanno studiato la riduzione dell'aflatossina, in mais trattato con ozono gassoso. Due campioni di mais aventi umidità differenti (13,47% e 20,37%) sono stati divisi in più sottocampioni e posti all'interno di un distinto reattore. Le tre diverse concentrazioni di ozono utilizzate sono 40, 65 e 90 mg/L per 4 tempi di trattamento diversi (0, 5, 10, 20 e 40 minuti). Il contenuto iniziale di aflatossine nei



campioni con umidità del 13,47% era di 83,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; invece, nei campioni con umidità del 20,37% la contaminazione iniziale era di 77,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Fig 7.** Degradazione dell'AFB<sub>1</sub> in mais con umidità del 13,47% a diverse concentrazioni di ozono e tempi di trattamento [Luo (a) et al., 2014].



**Fig 8.** Degradazione dell'AFB<sub>1</sub> in mais con umidità del 20,37% a diverse concentrazioni di ozono e tempi di trattamento [Luo (a) et al., 2014].

Per ogni campione sono state svolte tre repliche, sono stati quindi riportati i risultati medi per ogni combinazione tra concentrazione di ozono e tempo di trattamento.

Come si può vedere dalla **figura 7**, il trattamento delle cariossidi con 40 mg/L di ozono per 40 minuti fa abbassare il contenuto di AFB<sub>1</sub> da 83,0 µg/kg a circa 50 µg/kg. Il trattamento con 90 mg/L di ozono per 40 minuti, riduce la contaminazione da 83 µg/kg a circa 10 µg/kg. Concentrazioni maggiori di ozono determinano quindi una riduzione dell'aflatossina B<sub>1</sub> più elevata.

Stesso accade con i tempi dei trattamenti: più si prolungano e maggiore è la riduzione di AFB<sub>1</sub>. Infatti, con 65 mg/L di ozono utilizzati, dopo 5 minuti si osserva una diminuzione del 10%, dopo 20 minuti del 33% e dopo 40 minuti del 56%; questo accade in percentuali diverse anche con concentrazioni di 40 mg/L e 90 mg/L di O<sub>3</sub>.

Analizzando i grafici, si può osservare come fino a 20 minuti di trattamento le curve che descrivono l'effetto delle concentrazioni di 40 e 90 mg/L abbiano una maggiore pendenza rispetto ai successivi minuti (da 20 minuti in poi), quindi fino a 20 minuti la degradazione di aflatossina B<sub>1</sub> in mais è molto più veloce rispetto a tempi maggiori. Questo però non succede per la concentrazione di 65 mg/L; in questo caso la pendenza e quindi la velocità di detossificazione è abbastanza lineare nel tempo.

Come raffigurato nella **figura 8**, anche per i campioni con umidità del 20,37% si osservano gli andamenti sopra descritti, con diverse percentuali di riduzione.

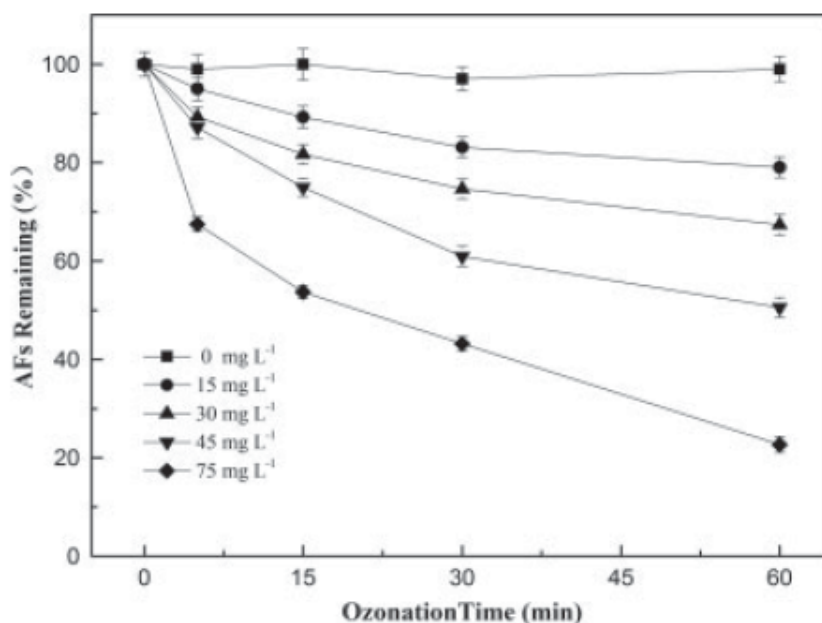
Comparando la **figura 7** e la **figura 8** si nota come AFB<sub>1</sub> è stata facilmente degradata dall'ozono in mais con contenuto d'acqua del 13,47%, una volta esposta la granella intera alle tre diverse concentrazioni di ozono (40, 65 e 90 mg/L) per 40 minuti; infatti, i tassi di degradazione di AFB<sub>1</sub> erano rispettivamente 41,1 - 56,2 - 88,1%.

Al contrario, quando il mais con il 20,37% di contenuto d'acqua è stato trattato con ozono nelle stesse condizioni, i tassi di degradazione dell'AFB<sub>1</sub> erano 37,5 - 49,9 - 72,4% [Luo (a) et al., 2014].

Il miglior risultato ottenuto con valori di umidità bassa (13,47%) rispetto agli alti (20,37%) è un aspetto molto positivo per il trattamento dei cereali (mais) dato che normalmente nella filiera cerealicola la granella viene essiccata fino al raggiungimento dei valori di umidità del 13-14 %, al fine di limitare lo sviluppo di funghi produttori di

tossine. In queste condizioni si avrebbe quindi una migliore efficienza del futuro trattamento con ozono.

Anche su farina di mais sono stati effettuati studi con metodo analogo, quantificando inizialmente le aflatossine totali (somma di AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, dato che con HPLC con rilevatore a fluorescenza l'AFG<sub>2</sub> non è stata rilevata). Dalla **figura 9** si può notare che sono stati effettuati trattamenti con quattro diverse concentrazioni (15-30-45-75 mg/L) di ozono per diversi tempi di trattamento (5 – 15 – 30 – 60 minuti). La riduzione delle aflatossine totali con 75 mg/L di ozono per 60 minuti è stata del 77,3% passando da un contenuto di 68,1 µg/kg a 15,4 µg/kg.



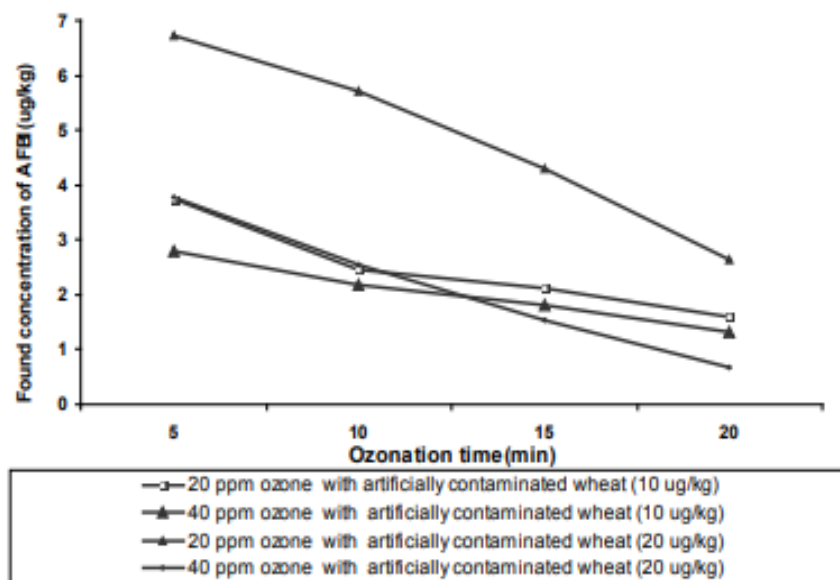
**Fig 9.** Riduzione delle aflatossine totali in farina di mais dopo trattamento con differenti concentrazioni di ozono e tempi di trattamento [Luo (b) et al., 2014].

Se dividiamo il totale per le singole aflatossine, le percentuali di riduzione di AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> sono rispettivamente di 78,76%, 72,09% e 70,73%. Come indicato anche dallo studio effettuato da McKenzie et al. (1997), le aflatossine B<sub>2</sub> e G<sub>2</sub> sono prodotte in minor quantità, però sono molto più resistenti alla degradazione grazie all'assenza del doppio legame nel furano terminale tra C8 e C9, richiedendo circa il 20% in più di O<sub>3</sub> per una rapida degradazione paragonabile a quella del gruppo 1. Ciò è confermato anche da altri studi in diverse matrici alimentari, ad esempio in peperoncino rosso dove

AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> sono sensibili all'ozono e si degradano facilmente con una concentrazione di 1,1 mg/L entro 5 minuti. Invece AFB<sub>2</sub> è più resistente all'ozono, richiedendo 50 minuti per degradarsi completamente con 34,3 mg/L di ozono [Inan et al., 2007].

### 3.3 Utilizzo in frumento

L'ozonizzazione è stata testata anche in granella di frumento per vederne gli effetti sulla riduzione delle aflatossine, portando a ottimi risultati anche in questo caso studio.



**Fig 10.** Riduzione dell'aflatossina B<sub>1</sub> in frumento tenero dopo differenti concentrazioni di ozono e tempi di trattamento [El-Desouky et al., 2012].

Le cariossidi di frumento divise in campioni sono state contaminate artificialmente con 10 µg/kg e 20 µg/kg e successivamente trattate con due diverse concentrazioni di ozono gassoso (20 mg/L e 40 mg/L). Come si può vedere dalla **figura 10**, la riduzione di AFB<sub>1</sub> è stata dell'84,1% con 20ppm passando da 10µg/kg a 1,59µg/kg dopo 20 minuti di trattamento; e dell'86,7% con 40 ppm passando da 10µg/kg a 1,33µg/kg dopo 20 minuti. La degradazione della medesima aflatossina è stata dell'86,7% con 20ppm passando da 20µg/kg a 2,65µg/kg dopo 20 minuti; e del 96,6% con 40ppm passando da 20µg/kg a 0,67µg/kg dopo 20 minuti di trattamento [El-Desouky et al., 2012].

Se prendiamo ad esempio il campione con contaminazione di  $10\mu\text{g}/\text{kg}$ , dopo 5 minuti di trattamento con  $20\text{ mg}/\text{L}$  di ozono si riduce la contaminazione a  $3,7\mu\text{g}/\text{kg}$ . A questo punto se raddoppia il tempo di ozonizzazione (10 minuti) mantenendo costante la concentrazione di  $\text{O}_3$  usata, la quantità di micotossina passa a  $2,5\mu\text{g}/\text{kg}$ . Invece se si tratta uno stesso campione contaminato con  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  di  $\text{AFB}_1$  con una concentrazione di  $40\text{ppm}$  (il doppio dei  $20\text{ ppm}$  della concentrazione precedente di  $\text{O}_3$ ) per 5 minuti, la riduzione della micotossina giunge a  $2,8\mu\text{g}/\text{kg}$ ; questo dimostra che l'aumento della concentrazione di ozono utilizzato porti ad una più alta velocità di degradazione nel tempo, ma l'influenza maggiore nella riduzione di  $\text{AFB}_1$  nel grano è il tempo di trattamento. Tale risultato è dovuto all'interazione dell'ozono con diversi fattori intrinseci ed estrinseci quali caratteristiche superficiali del chicco, contaminazione microbica, presenza di insetti e il contenuto di umidità, che portano a diffondere meno velocemente il gas. Quindi maggiori tempi di ozonizzazione portano ad una migliore diffusione e di conseguenza efficacia [Tiwari et al., 2010].  $\text{O}_3$ , infatti, si muove attraverso la granella del cereale posta nei silos, essenzialmente in due fasi. La prima fase porta a una limitata diffusione dato che l'ozono è degradato da reazioni di ossidazione con i materiali biologici interni e superficiali delle cariossidi (anche degradazione delle aflatossine). La successiva fase è la libera circolazione di  $\text{O}_3$  (quindi un maggiore movimento del gas) fino all'incontro di ulteriori siti reattivi esterni ai semi. Questa fase porta quindi a un ulteriore beneficio, cioè, limita lo sviluppo di infestanti delle derrate (insetti) e di microrganismi patogeni o deterioranti (ad esempio funghi produttori di tossine) [Kells et al., 2001].



## 4 MECCANISMO D'AZIONE DELL'OZONO

### 4.1 Contro le aflatossine

McKenzie et al. (1997), Prudente (2008) e Diao et al. (2012) hanno cercato di spiegare con precisione come agisce l'ozono contro l'aflatossina B<sub>1</sub>, degradandola in vari intermedi e giungendo alla formazione di sei prodotti di degradazione. Dagli studi effettuati in acetonitrile hanno riscontrato due vie di degradazione delle aflatossine con l'uso di ozono.

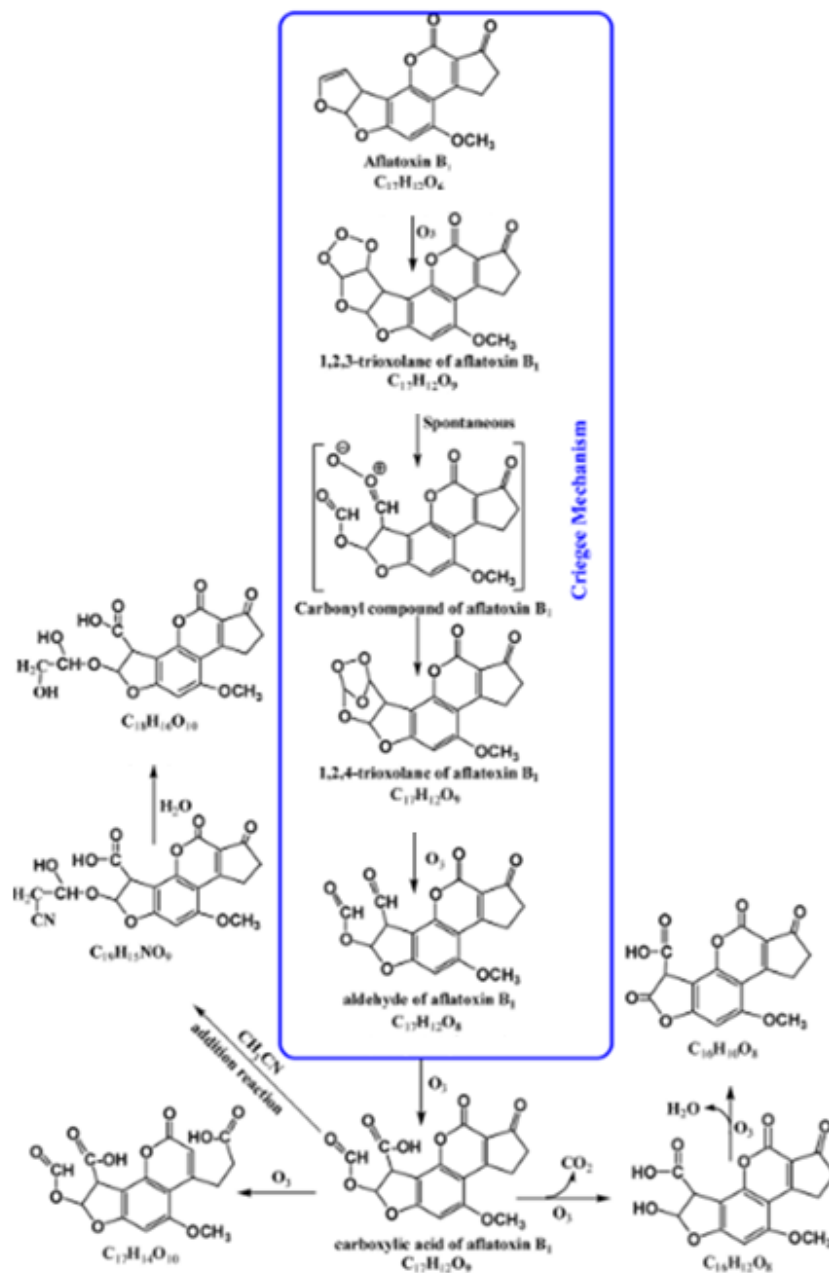


Fig 11. Primo percorso di degradazione delle aflatossine con utilizzo dell'ozono in acetonitrile [Diao et al., 2012].

La prima via (**figura 11**) per la degradazione dell'aflatossina B<sub>1</sub> con l'ozonizzazione si basa sul meccanismo di Criegee ( riquadro **blu** in **figura 11**). Inizialmente avviene un'addizione di O<sub>3</sub> all'alchene del furano terminale (nel doppio legame tra C8 e C9) con formazione di un ozonuro primario detto molozonide (1,2,3 triossolano). Il molozonide essendo molto instabile, si decompone spontaneamente in un composto carbonilico, che con un riarrangiamento porta alla formazione di un ozonide secondario (1,2,4 triossolano). Quest'ultimo composto subisce un'ulteriore ossidazione da parte dell'ozono e forma prima l'aldeide e infine l'acido carbossilico dell'AFB<sub>1</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>9</sub>). Tre sono i possibili percorsi che l'acido carbossilico può subire.

Nella prima via, l'ozono ossida il gruppo formile dell'anello furanico in ossidrilico producendo C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub> e rilascia CO<sub>2</sub>. Il gruppo ossidrilico può essere ulteriormente ossidato sulla base del furano, e formare un anello lattonico (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>) con eliminazione di H<sub>2</sub>O.

Nel secondo percorso, avviene l'addizione dell'acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) sul gruppo aldeidico dell'etere formico nel furano terminale di AFB<sub>1</sub>, formando il composto C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>9</sub>. A sua volta quest'ultimo composto potrebbe essere idrolizzato originando C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>10</sub>, sostituendo il gruppo nitrile con il gruppo idrossile.

Nel terzo percorso avviene una reazione di ossidazione del gruppo carbonilico del ciclopentanone che si trova legato all'anello lattonico dell'acido carbossilico di AFB<sub>1</sub>. L'ozono rompe il legame tra lattono e ciclopentanone e forma un composto con due gruppi carbossilici (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>10</sub>).

La seconda via (**figura 12**) di degradazione di AFB<sub>1</sub> mediante ozonizzazione, indicata da Diao et al. (2012), il gruppo metossi presente nell'anello benzenico viene ossidato e forma un etereperossido. Questa molecola molto instabile, rilasciando acido formico, spontaneamente si trasforma in C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>. A questo punto possono avvenire due reazioni: la prima è un attacco elettrofilo sull'anello benzenico con formazione di un ulteriore gruppo ossidrilico (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>). Il secondo percorso consiste nella scissione del gruppo carbonilico sull'anello lattonico (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) causato dalla reazione con O<sub>3</sub>, con



rilascio di CO<sub>2</sub>. Il composto formatosi, continua ad essere ossidato attraverso l'attacco elettrofilo dell'ozono fino a formare C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> [Diao et al., 2012].

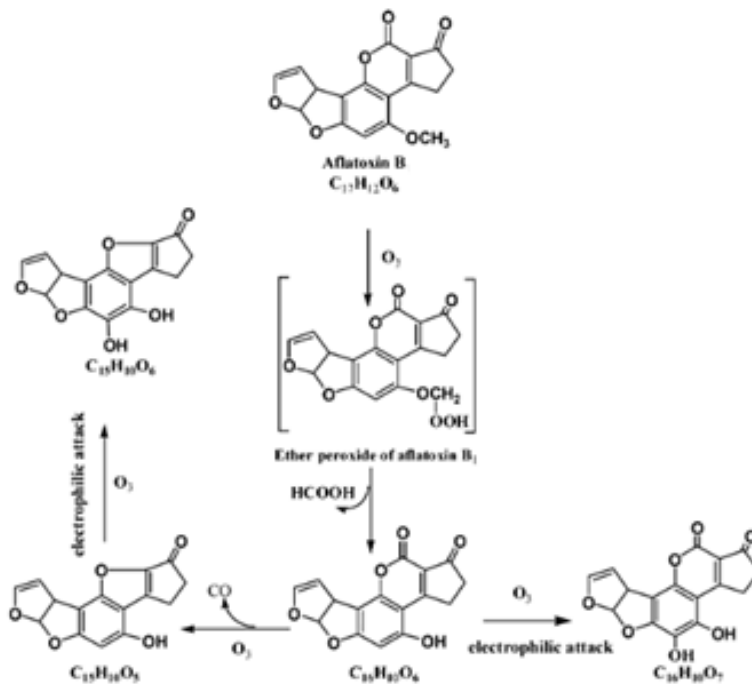


Fig 12. Secondo percorso di degradazione delle aflatossine con utilizzo dell'ozono [Diao et al., 2012].

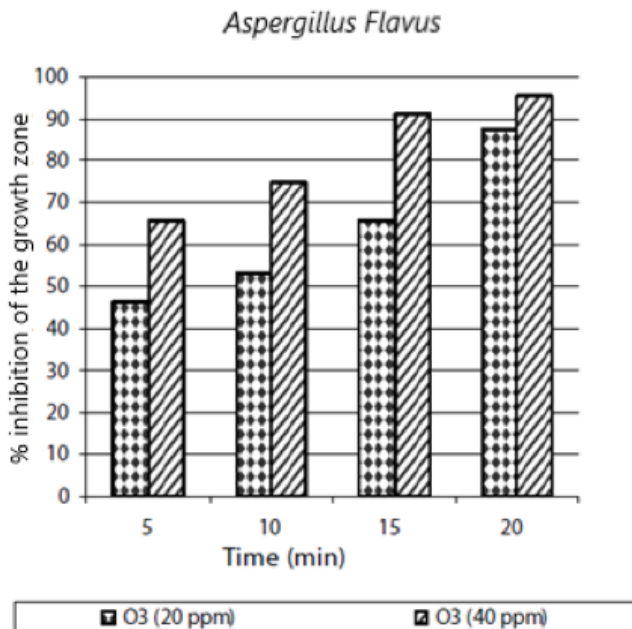
#### 4.2 Contro *Aspergillus flavus*

L'ozono agisce in primo luogo ossidando i lipidi insaturi delle membrane dei microrganismi (tra cui i funghi micotossigeni) portando alla rigidità di esse con conseguenze negative quali ad esempio la fuoriuscita del contenuto citoplasmatico. Un ulteriore effetto dell'ozono sulla crescita dei funghi può derivare dalla modificazione del DNA: incidendo negativamente con trascrizione e sintesi proteica, l'ozono determina un malfunzionamento del metabolismo dei microrganismi e una minor velocità nella divisione cellulare.

L'ozonizzazione riduce inoltre la capacità in *A. flavus* e *A. parasiticus* di produrre aflatossine e inibisce la crescita del fungo, come dimostra l'esperimento riportato nella **figura 13** [El-Desouky et al., 2012; Hussein et al., 2015; Conte et al., 2020].

In questo esperimento si è calcolato di quanto si inibisce la crescita di *A. flavus* in vitro su PDA (Potato dextrose agar) come terreno di coltura, misurando la diminuzione della dimensione della colonia. Sono stati eseguiti i trattamenti con due diverse concentrazioni di ozono:

- 20ppm per 5-10-15-20 minuti con conseguente riduzione compresa tra il 46,4% e l'87,8%.
- 40 ppm sempre per analoghi tempi di ozonizzazione con una riduzione compresa tra il 65,6 e il 95,6% [El-Desouky et al., 2012].



**Fig 13.** Inibizione della crescita di *A. flavus* in vitro (PDA) dopo ozonizzazione a 20ppm e 40ppm [El-Desouky et al., 2012].

Per l'inattivazione in vitro di colonie pure di lieviti e muffe sono sufficienti basse concentrazioni di ozono e brevi tempi di contatto. Tuttavia, data la presenza di materiale organico negli alimenti che funge da protezione per il fungo, la sensibilità dei microrganismi all'O<sub>3</sub> gassoso diminuisce. La resistenza dei microrganismi all'ozono è influenzata da ulteriori fattori, tra cui il metodo di applicazione dell'ozono, il ceppo del microrganismo, lo stato fisiologico delle cellule, il livello di crescita, il pH del mezzo, la temperatura, l'umidità e la presenza di altre sostanze come acidi, lipidi, proteine e zuccheri [Sharma et al., 2002].

L'ozonizzazione gassosa si è rivelata molto efficace nell'inattivare le spore fungine: il 96,6% sono state inattivate applicando 0,33 mg di ozono/g grano/min per 5 minuti, come si può notare nella **figura 14** [Wu et al., 2006]. Anche in orzo, i risultati ottenuti sono simili, si è raggiunto il 39% di inattivazione dopo 5 minuti di trattamento con 0,01 mg/g/min; e il 96% con 0,16 mg/g/min. Si è confermato ancora una volta che

all'aumentare del tasso di ozono, aumenta anche il livello di inattivazione [Maeba et al., 1988; Allen et al., 2003].

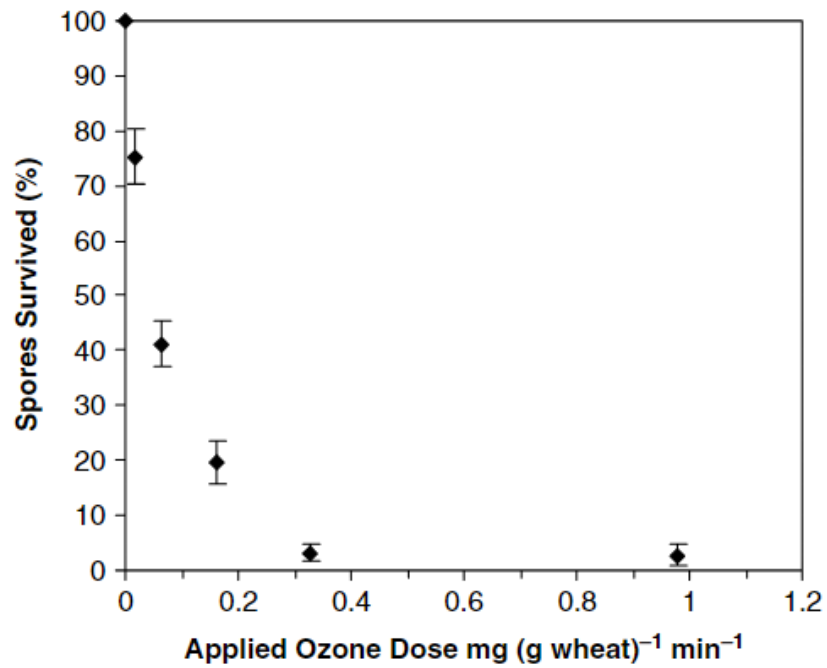


Fig 14. Inattivazione delle spore con diverse dosi di ozono per 5 minuti di trattamento [Wu et al., 2006].



## 5 TOSSICITÀ DEI PRODOTTI DI DEGRADAZIONE GENERATI DALL'OZONO

La tossicità e cancerogenicità dell'AFB<sub>1</sub> è imputata all'anello furanico terminale contenente il doppio legame tra C8 e C9; pertanto, la detossificazione con l'uso dell'ozono cerca di rimuovere quel determinato doppio legame [Afsah-Hejri et al., 2020].

Luo et al. (2013) e Luo (c) et al. (2014) hanno indicato che la reazione dell'ozono con l'aflatossina avviene proprio nel doppio legame dell'anello furanico terminale, ciò comporta che i prodotti di degradazione sembrano avere una tossicità più bassa rispetto a quella dell'aflatossina di partenza.

Precedenti test di tossicità su tacchini e ratti alimentati con mais contaminato da AFB<sub>1</sub> e trattato con ozono gassoso o con ozono acquoso hanno dimostrato che dopo l'ozonizzazione la tossicità era notevolmente ridotta o scomparsa data l'assenza di sintomi negli animali [McKenzie et al., 1998; Prudente et al., 2002; Naguib et al., 2011].

Diao et al. (2012), Luo et al. (2013) e Luo (c) et al. (2014) hanno identificato sei prodotti di degradazione dell'ozono per AFB<sub>1</sub> (**figura 15**), nessuno dei quali ha mostrato effetti avversi nei test di tossicità. Sebbene non sia stata segnalata alcuna tossicità per gli alimenti contenenti micotossine trattati con ozono, esiste preoccupazione circa la tossicità dei prodotti di degradazione dopo la digestione. Secondo Freire e Sant'Ana (2018), tali prodotti di degradazione possono convertirsi nuovamente nella micotossina madre durante la digestione. A causa del numero ridotto di studi effettuati e dei potenziali rischi per la salute, sono necessarie ulteriori ricerche sulla struttura chimica e sulla tossicità dei prodotti di degradazione dopo l'ozonizzazione, tenendo in considerazione anche l'influenza degli enzimi presenti durante la digestione. La capacità delle aflatossine di mutare il DNA legandosi alle basi azotate è imputata essenzialmente al metabolita reattivo (8,9-epossido) dell'aflatossina, dato che l'aflatossina stessa di per sé non è particolarmente genotossica [Pelkonen et al., 1997].

Quindi attenendosi agli studi svolti ad oggi, si può affermare che l'ozonizzazione porta alla completa degradazione della tossina, o a modificazioni chimiche parziali, evitando che l'aflatossina si converta nel fegato nell'intermedio genotossico [McKenzie et al., 1998].

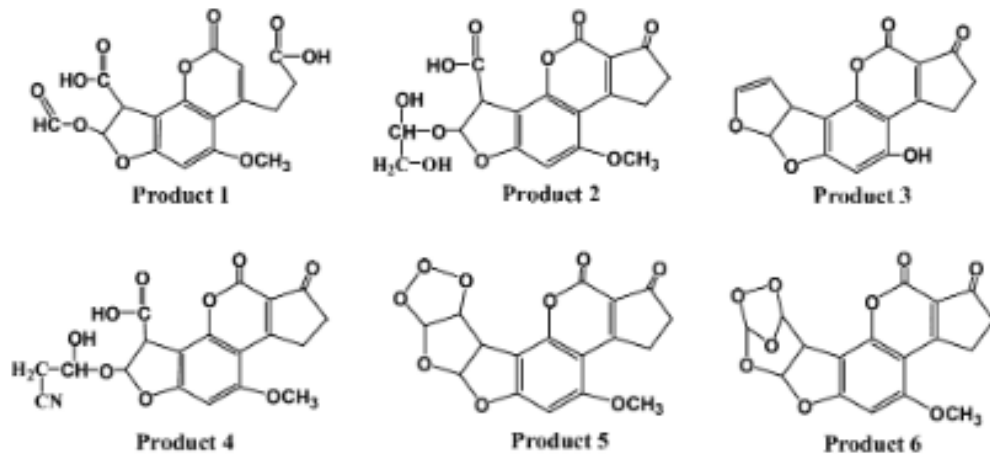


Fig 15. Possibili strutture dei sei prodotti di degradazione dell'AFB<sub>1</sub> dopo ozonizzazione [Diao et al., 2012].

## 6 PRO E CONTRO DELL'UTILIZZO DI OZONO COME AGENTE DETOSSIFICANTE IN CEREALI E FARINE

### 6.1 Aspetto biologico

Oltre alla detossificazione delle aflatossine in cereali, l'inibizione della crescita dei funghi tossigeni e la riduzione dell'attivazione delle spore, descritti in precedenza, l'ozonizzazione porta ad ulteriori vantaggi.

Un primo beneficio è il controllo degli insetti tipici dei cereali, tra cui *Tribolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*, ed *Ephestia elutella* [Sousa et al., 2008]. L'ozono ha un'azione tossica sul sistema respiratorio degli insetti, infatti provoca danni ossidativi alle cuticole e ai tubi ramificati nel corpo dell'insetto deputati alla respirazione [Lu et al., 2009]. In aggiunta, O<sub>3</sub> determina rotture del filamento di DNA che causano malformazioni e disfunzioni nel metabolismo dell'insetto, portandolo nel lungo periodo alla morte [Bornholdt et al., 2002; Ballinger et al., 2005].

L'effetto tossico dell'ozono sugli infestanti dipende da molti fattori: dallo stadio del ciclo vitale in cui si trova l'insetto (larva, pupa, adulto), ad esempio le larve di *T. castaneum* sono molto più sensibile rispetto all'adulto [Erdman, 1980]; dalla specie e da tempo e concentrazione del trattamento (tabella 3) [Leesch, 2003].

Food grain	Insects	Conditions	Mortality rate
Maize	RFB ( <i>Tribolium castaneum</i> )	50 ppm for 3 days	94.5% IMM
	MW ( <i>Sitophilus zeamais</i> )		100% MW
	IMM ( <i>Plodia interpunctella</i> )		92.2% RFB
Maize	RFB ( <i>T. castaneum</i> )	25 ppm for 5 days	77.0% IMM
	MW ( <i>Sitophilus zeamais</i> )		99.9% MW
	IMM ( <i>P. interpunctella</i> )		91.4% RFB
Wheat	<i>Ephestia kuehniella</i> and <i>Tribolium confusum</i> ,	Ozone concentration of 13.9 mg/L	<i>T. confusum</i> , 72.6% (Larvae)
			1.3–22.7% (Adult)
			90–100% (larve, adult)

**Tab 3.** Percentuale di mortalità delle diverse specie di insetti infestanti in mais e in frumento, in base alla concentrazione di ozono e al tempo di trattamento [Kells et al., 2001; Isikber et al., 2009; Tiwari et al., 2010].

Nei batteri è stata studiata l'azione antimicrobica dell'ozono. Sia in gram positivi (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ed *Enterococcus faecalis*), sia in gram negativi (*Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia enterocolitica*) l'ozonizzazione causa un danneggiamento di strutture citoplasmatiche come proteine,

DNA e acidi grassi; ma soprattutto degrada le glicoproteine, i glicolipidi e gli enzimi legati alla membrana, come analogamente accade per i funghi [Ishizaki et al., 1986; Restaino et al., 1995; Guzel et al., 2004]. Oltre a ciò, l'ozono è in grado di agire sugli strati esterni della spora batterica, esponendo il cortex e il core sporale alle minacce esterne e danneggiando la germinazione della spora stessa [Foegeding et al., 1985; Komanapalli et al., 1996; Khadre et al., 2001; Young et al., 2004].

## 6.2 Qualità organolettica e nutrizionale

Dal punto di vista organolettico e nutrizionale, il trattamento con l'ozono in cereali non rilascia residui sul prodotto [Guerreiro et al., 2018] al contrario di altri metodi chimici quali ad esempio il cloro, ed ha un impatto minimo sulla qualità se usato a concentrazioni ottimali.

Studi in proteine isolate dal frumento tenero (comprese glutenine e gliadine), hanno dimostrato come il trattamento con ozono ossida principalmente il gruppo solfidrico (-SH) contenuto nell'amminoacido cisteina, ma ossida anche altri amminoacidi come triptofano, tirosina e istidina [Richard et al., 1984; Zhu, 2018]. Tuttavia, la maggior parte degli studi effettuati sulla farina di grano tenero, non ha riscontrato nessuna variazione nel contenuto proteico [Chittrakorn et al., 2014; Wang et al., 2016].

Ricerche effettuate da Naito (1990) confermano che trattando il grano con ozono (50 ppm per 1 ora) si ha la riduzione della presenza del gruppo solfidrico, ma contemporaneamente anche la creazione di nuovi ponti disolfuro (S-S). L'ozono ha indotto la formazione di legami S-S intermolecolari e altri tipi di legami incrociati originando cambiamenti nella struttura secondaria delle proteine [Gozé et al., 2017].

Nel complesso, si può concludere che il trattamento moderato con ozono induce la formazione di reticolazione, maggiori interazioni e insolubilità delle proteine (principalmente glutenina) nella farina di frumento. D'altro canto, un trattamento eccessivo può portare all'indebolimento molecolare delle proteine della farina. I cambiamenti nella composizione proteica causati dall'ossidazione con ozono, determinano cambiamenti significativi nella reologia dell'impasto [Zhu, 2018].



Combinazioni drastiche tra alte concentrazioni di ozono e lunghi tempi di trattamento provocano l'ossidazione in perossidi degli acidi grassi polinsaturi, influenzando così il valore nutrizionale delle farine e dei prodotti da esse derivati [Guzel et al., 2004].

Ad ogni modo, Mendez et al. (2003) dopo aver ozonizzato diversi campioni di cereali (mais, grano duro e grano tenero) per 30 giorni a 50 ppm, hanno indicato che il contenuto di aminoacidi e acidi grassi è rimasto costante. Anche Prudente et al. (2002) hanno riportato cambiamenti non significativi nel profilo degli acidi grassi del mais ozonizzato.

Secondo studi condotti da Zhu (2018), l'ozonizzazione non porta nemmeno a rilevanti diminuzioni dei polifenoli, questo grazie ai costituenti biologici della cariosside (proteine e amido principalmente) che tendono a impedire e ritardare la penetrazione dell'ozono e la sua interazione con i polifenoli, evitano che vengano intaccati.

Anche la frazione vitaminica non viene degradata dal trattamento di ozonizzazione in cereali [Dubois et al. 2006]. Quest'ultimi due studi non possono essere confrontati però, con altri lavori scientifici data la mancanza di rapporti su come i micronutrienti nella farina di frumento o in altri cereali possano essere influenzati dall'ozono.

Un cambiamento significativo si è notato nella forza della farina di grano tenero trattata con ozono gassoso. È cambiato il rapporto tra tenacità ed estensibilità, con un aumento del primo valore ed una diminuzione del secondo valore [Naito, 1990]. Con acqua ozonizzata (1,5 mg/L per 30 minuti) invece, le proprietà reologiche della farina di grano (forza della farina) non sono state influenzate [Ibanoglu, 2001, 2002; Mendez et al., 2003].

L'ozonizzazione effettuata nel frumento determina cambiamenti nelle proprietà meccaniche dei tessuti dei chicchi di grano (minor resistenza dell'endosperma alla rottura). Ciò implica un minor dispendio di energia nel processo di molitura, una migliore separazione della crusca dall'endosperma amidaceo e un minor livello di danno all'amido, che influenza il futuro assorbimento d'acqua per la preparazione dell'impasto [Desvignes et al., 2008; Coste et al., 2009].

Gli svantaggi dell'ozonizzazione non sono molti: Mendez et al. (2003) hanno osservato uno scolorimento del pericarpo esterno del cereale ozonizzato (50 ppm per 30 giorni) con insorgenza di odori sgradevoli. Tuttavia, sia l'odore acido che lo scolorimento marrone sono stati rimossi durante il processo di macinazione. Rich (1994) ha studiato la possibile fonte dell'odore e dello scolorimento indicando che la causa potrebbe essere l'acido nitrico, formatosi dall'umidità dell'aria prelevata dall'ambiente come fonte di ossigeno, per essere iniettata in generatori di scarica a corona per la produzione di O<sub>3</sub>.

### 6.3 Aspetto economico

Un ulteriore vantaggio del trattamento con ozono è il ridotto costo economico rispetto ad altri metodi chimici o metodi termici. Nei trattamenti termici, per raggiungere un risultato efficace nel controllo degli insetti, dei microorganismi e per la degradazione delle aflatoxine servono alte temperature che implicano un alto apporto di energia, e quindi degli alti costi (circa 1,23 euro/tonnellata di frumento). Richiede inoltre un'unità di raffreddamento rapido dopo il trattamento per ridurre il rischio di danni ai cereali come la germinazione, che, a sua volta, fa aumentare le spese del trattamento termico effettuato [Qaisrani & Beckett, 2003; Sivaranjani et al., 2021].

Per quanto riguarda i trattamenti chimici, sebbene il costo dei disinfettanti (ad esempio cloro) sia più economico rispetto all'ozono, richiedono innanzitutto un'unità di stoccaggio e controllo per mantenere il pH e la concentrazione. Inoltre, poiché l'ozono ha un'elevata proprietà ossidante, il tempo di contatto dell'ozono è comparativamente inferiore a quello del cloro, per ottenere risultati simili [Miller et al., 2013; Pandiselvam et al., 2020]. Questo implica una minor quantità di ozono utilizzato rispetto ad altri metodi chimici e quindi a costi più contenuti. Per i disinfettanti bisogna in aggiunta sommare i costi di smaltimento post-trattamento, cosa che non avviene per l'ozonizzazione. Costi piuttosto elevati da sostenere per l'impianto di ozonizzazione in un'azienda alimentare sono imputabili all'installazione iniziale del sistema. Queste alte spese possono comunque essere ammortizzate dati i bassi costi di manutenzione e

funzionamento, ma anche il maggior prezzo di vendita ottenuto grazie alla alta qualità del prodotto, che avrà inoltre una durata di conservazione più estesa [Karaca, 2010; Miller et al., 2013].

Uno svantaggio dell'utilizzo dell'ozono in azienda alimentare può essere associato al pericolo dell'operatore. Sebbene a basse concentrazioni non sia particolarmente tossico, ad alte concentrazioni può avere effetti gravi. I principali danni sono a carico delle vie respiratorie per alterazione della permeabilità degli epitelii, con conseguente riduzione della funzionalità polmonare (fino a edema).

Pertanto, la tossicità dell'ozono richiede che gli addetti al suo utilizzo siano continuamente monitorati e protetti [CNSA, 2010].



## 7 LEGISLAZIONE RIGUARDO L'USO DELL'OZONO IN POST RACCOLTA

In seguito alla documentazione fornita dall'EPRI (Electric Power Research Institute) e da un gruppo di esperti che hanno valutato l'efficacia e la sicurezza dell'ozono nella lavorazione e conservazione degli alimenti, il 26 Giugno 2001 la Food and Drug Administration (FDA), seguita poi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), la e dall'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) hanno approvato l'uso dell'ozono in fase gassosa e acquosa oltre che per la disinfezione e sanificazione delle superfici e dell'attrezzatura, la decontaminazione delle acque, la disinfezione dei materiali da imballaggio in industrie alimentari, anche per il controllo dei microrganismi e dei metaboliti tossici con applicazione dell'ozono direttamente nell'alimento. Si ammette quindi l'impiego di ozono come agente antimicrobico in fase gassosa o in soluzione acquosa nei processi produttivi (trattamento, lavorazione, conservazione) di alimenti come carne, uova, pesci, formaggi, cereali, frutta e verdura. In particolare, con il documento 21 CFR parte 173.368 (registro n°00F-1482) rilasciato da FDA, l'ozono è riconosciuto come elemento GRAS (generally recognized as safe) ossia un additivo alimentare secondario sicuro per la salute umana.

Tuttavia, in Europa l'utilizzo di ozono ai fini alimentari è stato introdotto nel 2003, solo per la disinfezione e sterilizzazione dell'aria e dell'acqua durante i processi d'imbottigliamento. Infatti, la Direttiva 2003/40/CE della Commissione Europea del 16 maggio 2003 ha determinato 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.

Il Ministero della Sanità, in Italia con protocollo del 31 luglio 1996 n°24482, permette l'utilizzo dell'ozono nel trattamento dell'aria e dell'acqua, come presidio naturale per la sterilizzazione di ambienti contaminati da batteri, virus, spore, muffe ed acari. Il Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare (CNSA), inoltre, in data 27.10.2010,

ha espresso il seguente parere sull'utilizzo dell'O<sub>3</sub>: “La Direzione Generale della Sicurezza degli Alimenti e della Nutrizione esprime parere favorevole alla ozonizzazione delle camere di stagionatura e/o degli ambienti di stoccaggio, purché in assenza di alimenti...”. Ad oggi in Europa non è ancora permesso l'utilizzo dell'ozono direttamente su materie prime e alimenti destinati al consumo umano; tranne per l'aria, le acque potabili e pulite.

## 8 CONCLUSIONI

*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, i principali produttori di aflatossine, infettano le cariossidi dei cereali favoriti da alte temperature e stagioni siccitose che portano la coltura allo stress idrico.

Le aflatossine sono uno dei maggiori problemi riscontrati oggi sia dagli agricoltori, che dalle industrie alimentari. I cereali contaminati sopra il limite di legge europeo (Reg. UE 915/2013), non possono essere trasformati in ingredienti utilizzati principalmente per la produzione di pasta, pane e prodotti da forno, ma vengono destinati ad uso zootecnico (entro certi limiti di contaminazione) oppure ad uso energetico con deprezzamento della materia prima.

Oltre alla perdita economica, le aflatossine sono dei metaboliti tossici per l'uomo. I principali sintomi riscontrati sono correlati alla tossicità cronica, infatti il principale bersaglio delle aflatossine è il fegato, con formazione di carcinoma epatocellulare (HCC). Ulteriori effetti tossici sono stati riscontrati al sistema riproduttivo, al feto, e al sistema immunitario. Le proprietà genotossiche invece non sono dovute direttamente dall'aflatossina stessa ma bensì all'8,9-epossido, un composto che deriva dalla conversione della micotossina nel fegato.

L'utilizzo dell'ozono per degradare le aflatossine sfrutta l'azione ossidante di O<sub>3</sub>. Il trattamento non lascia residui rispetto ad altri disinfettati utilizzati, come il cloro. Molti studi effettuati in cereali hanno dimostrato l'efficacia dell'ozono per la detossificazione delle aflatossine nei cereali, con una riduzione della contaminazione da aflatossina B<sub>1</sub> fino al 96,6% in frumento tenero e fino all'88,1% in mais.

Anche se diversi studi indicano che i prodotti di degradazione sono molto meno tossici rispetto all'aflatossina madre, non si ha ancora piena certezza della loro tossicità data la difficoltà nel capire esattamente che molecole vengano a formarsi dalla degradazione delle aflatossine da parte dell'ozono e come quest'ultime reagiscano con gli organi del corpo, soprattutto con gli enzimi durante la digestione.

Questo metodo ha comunque molteplici vantaggi, in quanto le caratteristiche organolettiche e nutrizionali della granella e dei prodotti derivati si mantengono

pressoché inalterate anche dopo il trattamento di ozonizzazione, grazie alla presenza degli strati esterni (pericarpo) che proteggono l'endosperma e il germe. L'ozonizzazione limita lo sviluppo di microrganismi e insetti, e i costi del trattamento sono contenuti rispetto ai principali trattamenti chimici ad oggi usati.

Ad oggi seppur FDA, OMS e FAO abbiano dato un parere favorevole all'utilizzo dell'ozono direttamente in alimenti, in Europa questo metodo chimico è autorizzato solo per la disinfezione e sterilizzazione dell'aria e dell'acqua durante i processi d'imbottigliamento, e per la sanificazione di ambienti e strumenti di lavorazione e magazzinaggio delle industrie alimentari. Viceversa, l'utilizzo diretto su alimenti per dieta umana non è ancora permesso.



## BIBLIOGRAFIA

- Abbas HK., Wilkinson JR., Zablutowicz RM., Accinelli C., Abel CA., Bruns HA., Weaver MA.: Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews* 2009, 28(2-3):142-153.
- Allen B., Wu J., Doan H.: Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. *Journal of Environmental Science and Health* 2003, 38:617–630.
- Afsah-Hejri L., Hajeb P., Ehsani R. T.: Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2020, 19:1777-1808.
- Aziz N. H., Mattar Z. A., Mahrous S. R.: Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. *Journal of Food Safety* 2006, 26:184–201.
- Ballinger C. A., Cueto R., Squadrito G., Coffin J. F., Velsor L. W., Pryor W. A., Postlethwait E. M.: Antioxidant-mediated augmentation of nozone-induced membrane oxidation. *Free Radical Biology & Medicine* 2005, 38:515-526.
- Bornholdt J., Dybdahl M., Vogel U., Hansen M., Loft S., Wallin H.: Inhalation of ozone induces DNA strand break and inflammation in mice. *Mutation Research* 2002, 520:63-72.
- CAST: Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems; Task Force Report 2003, No. 139. Council for Agricultural Science and Technology: Ames, IA, USA, 2003.
- Chang P., Yu J., Ehrlich K. C., Boue S. M., Montalbano B. G., Bhatnagar D., Cleveland T. E.: *adhA* in *Aspergillus parasiticus* Is Involved in Conversion of 5'-Hydroxyaverantin to Averufin. *Applied and Environmental Microbiology* 2000, 66(11):4715-4719.
- Chittrakorn S., Earls D., MacRitchie F.: Ozonation as an alternative to chlorination for soft wheat flours. *Journal of Cereal Science* 2014, 60:217–221.
- CNSA, Ministero della Salute: Parere del CNSA sul trattamento con ozono dell'aria negli ambienti di stagionatura dei formaggi. CNSA, 27 ottobre 2010.
- Conte G., Fontanelli M., Galli F., Cotrozzi L., Pagni L., Pellegrini E.: Mycotoxins in Feed and Food and the Role of Ozone in Their Detoxification and Degradation: An Update. *Toxins* 2020, 486:1-19.
- Conway H. F., Anderson R.A., Bagley E.B.: Detoxification of aflatoxin-contaminated corn by roasting. *Cereal Chemistry* 1978, 55:115–117.
- Coste C., Dubois M., Pernot A. G.: Dehulling wheat grains using ozone, 2009. U.S. Patent Application No.12/282,032.
- Cotty P. J., Aflatoxin and Sclerotial Production by *Aspergillus flavus*: Influence on pH. *Phytopathology* 1988, 78(9):1250-1253.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST): Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. CAST: Ames, IA, USA, 2003.
- Desvignes C., Chaurand M., Dubois M., Sadoudi A., Abecassis J., Lullien-Pellerin V.: Changes in common wheat grain milling behavior and tissue mechanical properties following ozone treatment. *Journal of Cereal Science* 2008, 47(2):245–251.
- Dhanasekaran D., Shanmugapriya S., Thajuddin N., Panneerselvam A.: Aflatoxin and Aflatoxicosis in Human and Animals. *Biochemistry and Molecular Biology*. Guevara-González R.G., Ed.; BoD–Books on Demand: London, UK, 2011, 10:221-254.
- Diao E., Hou H., Dong H.: Ozonolysis mechanism and influencing factors of aflatoxin B<sub>1</sub>: A review. *Trends in Food Science & Technology* 2013, 33:21-26.
- Diao E., Shan C., Hou H., Wang S., Li M., Dong H.: Structures of the ozonolysis products and ozonolysis pathway of aflatoxin B<sub>1</sub> in acetonitrile solution. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2012, 60:9364–9370.
- Dubois M., Coste C., Despres A. G., Efstathiou T., Nio C., Dumont E., Parent-Massin D.: Safety of Oxygreen (R), an ozone treatment on wheat grains. Is there a substantial equivalence between oxygreen. Treated wheat grains and untreated wheat grains? *Food Additives and Contaminants* 2006, 23(1):1–15.
- EFSA: Aflatoxine nei prodotti alimentari, 2007 [online].  
<https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/aflatoxins-food>.
- EFSA CONTAM Panel. Schrenk D., Bignami M., Bodin L., Chipman J. K., Del Mazo J., Grasl-Kraupp B., Hogstrand C., Hoogenboom L. R., Leblanc J. C., Nebbia C. S., Nielsen E., Ntzani E., Petersen A., Sand S., Schwerdtle T., Vleminckx C., Marko D., Oswald I. P., Piersma A., Routledge M., Schlatter

- J., Baert K., Gergelova P., Wallace H.: Scientific opinion–Riskassessment of aflatoxins in food. EFSA Journal 2020, 18(3):6040-6112.
- El-Desouky TA., Sharoba AMA., El-Desouky A. I., El-Mansy HA., Naguib K.: Effect of Ozone Gas on Degradation of Aflatoxin B<sub>1</sub> and *Aspergillus Flavus* Fungal. Journal of Environmental & Analytical Toxicology 2012, 2(2):1-6.
- Erdman H. E.: Ozone toxicity during ontogeny of two species of flour beetles, *Tribolium confusum* and *T. castaneum*. Environmental Entomology 1980, 9 (1):16–17.
- Essigmann J. M., Croy R. G., Bennett R. A., Wogan G. N.: Metabolic activation of aflatoxin B<sub>1</sub>: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. Drug Metabolism Reviews 1982, 13:581-602.
- Foegeding P. M.: Ozone inactivation of Bacillus and Clostridium spore populations and the importance of the spore coat to resistance. Food Microbiology 1985, 2:123–134.
- Freire L. & Sant'Ana A. S.: Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. Food and Chemical Toxicology 2018, 111:189–205.
- Freitas-Silva O. & Venâncio A.: Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. Drug Metabolism Reviews 2010, 42(4):612-620.
- Ghanghro A. B., Channa M. J., Sheikh S. A., Nizamani S. M., Ghanghro I. H.: Assessment of aflatoxin level in stored wheat of godowns of hyderabad division and decontamination by UV radiation 2016, 8(1):8-16.
- Gozé P., Rhazi L., Lakhil L., Jacolot P., Paus A., Aussenac, T.: Effects of ozone treatment on the molecular properties of wheat grain proteins. Journal of Cereal Science 2017, 75:243–251.
- Greene A. K., Guzel Seydim Z. B., Seydim A. C.: Chemical and physical properties of ozone, 2012. In: O'Donnell C., Tiwari B. K., Cullen P. J., Rice R. G. (Eds.): Ozone in food Processing. Blackwell Publishing Ltd, Chichester, pp.19–32.
- G.U.C.E.: Regolamento (UE) 2023/915 della Commissione relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti e che abroga il regolamento (CE) n. 1881/2006. G.U.C.E. 25 aprile 2023, L119/103.
- Guerreiro C., Ortiz A., De Leeuw F., Viana M.: Air quality 2018 - EEA report 12 2018.
- Guzel-Seydim Z. B., Greene A. K., Seydim A. C.: Use of ozone in the food industry. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 2004, 37(4):453–460.
- Haack M. B., Olsson L., Hansen K., Lantz A. E.: Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. Applied Microbiology and Biotechnology 2006, 70:482-487.
- Hameed H. G.: Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally-contaminated corn. PhD thesis, University of Arizona 1993.
- Hooshmand H. & Klopfenstein C. F.: Effect of gamma irradiation on mycotoxin disappearance and amino acid contents of corn, wheat, and soybeans with different moisture contents. Plants Foods for Human Nutrition 1995, 47:227-238.
- Hussein H. Z., Tauma R. H., Ali A. M.: Study the effect of ozone gas and ultraviolet radiation and microwave on the degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> produce by *Aspergillus flavus* on stored Maize grains. Journal of Agriculture and Veterinary Science 2015, 8(5):5-12.
- IARC: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC MONOGRAPHS 2002, 82:169-275.
- Ibanoglu S.: Influence of tempering with ozonated water on the selected properties of wheat flour. Journal of Food Engineering 2001, 48:345–350.
- Ibanoglu S.: Wheat washing with ozonated water: effects on selected flour properties. International Journal of Food Science and Technology 2002, 37(5):579–584.
- Inan F., Pala M., Doymaz I.: Use of ozone in detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> in red pepper. Journal of Stored Products Research 2007, 43:425-429.
- Ishizaki K., Shinriki N., Matsuyama H.: Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. Journal of Applied Bacteriology 1986, 60(1):67–72.
- Isikber A. A., Öztekin S.: Comparison of susceptibility of two stored-product insect, *Ephesia kuehniella* Zeller and *Tribolium confusum* du Val to gaseous ozone. Journal of Stored Products Research 2009, 45:159-164.
- Ismail A., Gonçalves B. L., Neeff D. V., Ponzilacqua B., Coppa C., Hintzsche H., Sajid M., Cruz A. G., Corassin C. H., Oliveira C. A. F.: Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. Food Research International 2018, 113:74-85.

- ISTAT: Coltivazioni, 2023 [online]. [http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP\\_COLTIVAZIONI](http://dati.istat.it/Index.aspx?DataSetCode=DCSP_COLTIVAZIONI).
- Karaca H.: Use of ozone in the citrus industry. *Science & Engineering* 2010, 32(2):122–129.
- Karlovsky P., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I. P., Speijers G., Chiadini A., Recker T., Dussort P.: Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research* 2016, 32:179-205.
- Kells S. A., Mason L. J., Maier D. E., Woloshuk C. P.: Efficacy and fumigation characteristics of ozone in stored maize. *Journal of Stored Products Research* 2001, 37(4):371-382.
- Khadre M. A., Yousef A. E., Kim J. G.: Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science* 2001, 66(9):1242–1252.
- Komanapalli I. R. & Lau B. H. S.: Ozone-induced damage of *Escherichia coli* K-12. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1996, 46:610–614.
- Krishnamachari K. A. V. R., Nagarajan V., Bhat R. V., Tilak T. B. G.: Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in Western India. *Lancet* 1975, 305(7915):1061–1063.
- Leesch J. G.: The mortality of stored-product insects following exposure to gaseous ozone at high concentrations, 2003. In: Credland P. F., Armitage D. M., Bell C. H., Cogan P. M., Highley E. (Eds.): *Advances in Stored Product Protection, Proceedings of the 8th International Working Conference on Stored-Product Protection, 22–26 July 2002, York, UK*. CAB International, Oxon, UK, 827–831.
- Lewis L., Onsongo M., Njapau H., Schurz-Rogers H., Lubber G., Kieszak S., Nyamongo J., Backer L., Dahiye A. M., Misore A., DeCock K., Rubin C., Nyikal J., Njuguna C., Langat A., Kilei I. K., Tetteh C., Likimani S., Oduor J., Nzioki D., Kamau B. W., Onsongo J., Slutsker L., Mutura C., Mensah P., Kessel F., Park D. L., Trujillo S., Funk A., Geiseker K. E., Azziz-Baumgartner E., Gupta N.: Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives* 2005, 113:1763–1767.
- Li H., Xiong Z., Gui D., Pan Y., Xu M., Guo Y., Leng J., Li X.: Effect of ozonation and Uv irradiation on aflatoxin degradation of peanuts. *Journal of Food Processing and Preservation* 2019, 43:1-9.
- Luo X. (a), Wang R., Wang L., Li Y., Bian Y., Chen Z.: Effect of ozone treatment on aflatoxin B1 and safety evaluation of ozonized corn. *Food Control* 2014, 37:171-176.
- Luo X.(b), Wang R., Wang L., Li Y., Wang Y., Chen Z.: Detoxification of aflatoxin in corn flour by ozone. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014, 94:2253-2258.
- Luo X.(c), Wang R., Wang L., Li Y., Zheng R., Sun X., Wang Y., Chen Z., Tao G.: Analyses by UPLC Q TOF MS of products of aflatoxin B<sub>1</sub> after ozone treatment. *Food Additives & Contaminants* 2014, 31(1):105-110.
- Luo X., Wang R., Wang L., Wang Y., Chen Z.: Structure elucidation and toxicity analyses of the degradation products of aflatoxin B<sub>1</sub> by aqueous ozone. *Food Control* 2013, 31(2):331-336.
- Lu B., Ren Y., Du Y., Fu Y., Gu J.: Effect of ozone on respiration of adult *Sitophilus oryzae* (L.), *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.). *Journal of Insect Physiology* 2009, 55:885-889.
- Maeba H., Takamoto Y., Kamimura M., Miura T.: Destruction and detoxification of aflatoxins with ozone. *Journal of Food Science* 1988, 53:667–668.
- Mallakian S., Rezanezhad R., Jalali M., Ghobadi F.: The effect of ozone gas on destruction and detoxification of aflatoxin. *Bulletin de la Societè Royale des Sciences de Liège* 2017, 86:1-6.
- Marin S., Ramos A. J., Cano-Sancho G., Sanchis V.: Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 2013, 60:218-237.
- Markov K., Mihaljevic B., Domijan A., Pleadin J., Delas F., Frece J.: Inactivation of aflatoxigenic fungi and the reduction of aflatoxin B<sub>1</sub> *in vitro* and *in situ* using gamma irradiation. *Food Control* 2015, 54:79-85.
- Marshall H., Meneely J. P., Quinn B., Zhao Y., Bourke P., Gilmore B. F., Zhang G., Elliott C. T.: Novel decontamination approaches and their potential application for post-harvest aflatoxin control. *Trends in Food Science & Technology* 2020, 106:489-496.
- McKenzie K. S., Kubena L. F., Denvir A. J., Rogers T. D., Hitchenes G. D., Bailey R. H., Harvey R. B., Buckley S. A., Phillips T. D.: Aflatoxicosis in Turkey Poults is Prevented by Treatment of Naturally Contaminated Corn with Ozone Generated by Electrolysis. *Poultry Science* 1998, 77:1904-1102.
- McKenzie K. S., Sarr A. B., Mayura K., Bailey R. H., Miller D. R., Rogers T. D., Norred W. P., Voss K. A., Plattner R. D., Kubena L. F., Phillips T. D.: Oxidative Degradation and Detoxification of Mycotoxins Using a Novel Source of Ozone. *Food and Chemical Toxicology* 1997, 35:807-820.
- Medina A., Gilbert M. K., Mack B. M., OBrian G. R., Rodriguez A., Bhatnagar D., Payne G., Magan N:

- Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *International Journal of Food Microbiology* 2017, 256:36-44.
- Mendez A. A., De Jesus F. F., Castaneda R. E., Arambula V. G., Moreno M. E.: The effect of toasting and boiling on the fate of B-aflatoxins during pinole preparation. *Journal of Food Engineering* 2004, 65(4):585.
- Mendez F., Maier D. E., Mason L. J., Woloshuk C. P.: Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and processing performance. *Journal of Stored Products Research* 2003, 39(1):33-44.
- Milani J. & Maleki G.: Effects of processing on mycotoxin stability in cereals. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2014, 94:2372-2375.
- Miller F. A., Silva C. L., Brandao T. R.: A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews* 2013, 5(2):77-106.
- Mitchell N.J., Bowers E., Hurburgh C., Wu F.: Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants: Chemical, Analysis, Control Expo Risk Assess* 2016, 33:540-550.
- Naguib K. M., Hassan N. S., El-Nekeety A. A., Ibrahim M. I., Mohamed S. R., Abdel-Wahhab M. A.: Safety use of ozone gas in the degradation of aflatoxin in tobacco and prevention its toxicity in rats. *Toxicology Letters* 2011, 205:144.
- Naito S.: Effect of ozone treatment on the rheological properties of wheatflour. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 1990, 37(10):810-813.
- Nazhand A., Durazzo A., Lucarini M., Souto E. B., Santini A.: Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. *Foods* 2020, 9(5):1-26.
- Pandiselvam R., Kaavya R., Jayanath Y., Veenuttranon K., Lueprasitsakul P., Divya V., Ramesh S. V.: Ozone as a novel emerging technology for the dissipation of pesticide residues in foods—a review. *Trends in Food Science & Technology* 2020, 97:38-54.
- Pelkonen P., Lang M. A., Negishi M., Wild C. P., Juvonen R. O.: Interaction of aflatoxin B<sub>1</sub> with cytochrome P450 2A5 and its mutants: correlation with metabolic activation and toxicity. *Chemical Research in Toxicology* 1997, 10:85-90.
- Piro R. & Biancardi A. (IZSLER): Micotossine, 2010 [online].  
<https://covacontrol.org/wpcontent/uploads/2017/11/Micotossine.pdf>.
- Prudente A. D.: Evaluation of aflatoxin-related products from ozonated corn. Doctoral dissertation. Baton Rouge, LA: Louisiana State University 2008.
- Prudente JR A. D. & King J. M.: Efficacy and Safety Evaluation of Ozonation to Degrade Aflatoxin in Corn. *Journal of Food Science* 2002, 67(8):2866-2872.
- Qaisrani R. & Beckett S.: On-farm heat disinfestation trials using a continuous flow spouted bed, 2003. In *Stored Grain in Australia 2003. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra, 25-27.*
- Restaino L., Frampton E. W., Hemphill J. B., Palnikar P.: Efficacy of ozonated water against various food related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 1995, 61(9):3471-3475.
- Richard Y. & Brener L.: Removal of ammonia and other nitrogen derivatives from drinking water with ozone, 1984. In: Rice, R.G., Netzer, A.: *Handbook of Ozone Technology and Applications*, vol. II. Butterworth, Boston, 99-121.
- Rich T.: A basic comparison of ozone technology. *Water Technology Magazine* 1994, 17:51-52.
- Samarajeewa U., Sen A. C., Cohen M. D., Wei C. I.: Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods. *Journal of Food Protection* 1990, 53(6):489-501.
- SETamou M., Cardwell K. F., Schulthess F., Hell K.: Effect of Insect Damage to Maize Ears, with Special Reference to *Mussidia nigrivenella* (Lepidoptera: Pyralidae), on *Aspergillus flavus* (Deuteromycetes: Moniliales) Infection and Aflatoxin Production in Maize Before Harvest in the Republic of Benin. *Journal of Economic Entomology* 1998, 91(2):433-438.
- Sharma R. R., Demirci A., Beuchat L. R., Fett W. F.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Inoculated Alfalfa Seeds with Ozonated Water and Heat Treatment. *Journal of Food Protection* 2002, 65(3):447-451.
- Sivaranjani S., Prasath V. A., Pandiselvam R., Kothakota A., Khaneghah A. M.: Recent advances in application of ozone in the cereal industry. *Food Science and Technology* 2021, 146:111412.
- Sousa A. H., Faroni L. R. D'A., Guedes R. N. C., Totola M. R., Urruchi W. I.: Ozone as a management

- alternative against phosphine-resistant insect pest of stored products. *Journal of Stored Products Research* 2008, 44:379-385.
- Stoloff L., Trucksess M. W.: Effect of Bolling, Frying, and Baking on Recovery of Aflatoxin from Naturally Contaminated Corn Grits or Cornmeal. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 1981, 64(3):678-680.
- Torres P., Guzman-Ortiz M., Ramirez-Wong B.: Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001, 49:2825-2829.
- Tiwari B. K., Brennan C. S., Curran T., Gallagher E., Cullen P.J., O'Donnell C. P.: Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science* 2010, 51:248-255.
- Trail F., Mahanti N., Linz J.: Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology* 1995, 141:755-765.
- Wang L., Shao H., Luo X., Wang R., Li Y., Li Y., Luo Y., Chen Z.: Effect of Ozone Treatment on Deoxynivalenol and Wheat Quality. *PLoS ONE* 2016, 11:e0147613.
- World Health Organization (WHO): High-Dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses above 10 kGy. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1999.
- Wogan G. N., Edwards G. S., Newberne P. M.: Structure-Activity Relationships in Toxicity and Carcinogenicity of Aflatoxins and Analogs. *Cancer Research* 1971, 31:1936-1942.
- Wu J., Doan H., Cuenca M. A.: Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006, 81(7):1288-1293.
- Yabe K., Ando Y., Hashimoto J., Hamasaki T.: Two Distinct O-Methyltransferases in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55(9):2172-2177.
- Yabe K., Hamasaki T.: Stereochemistry during Aflatoxin Biosynthesis: Cyclase Reaction in the Conversion of Versiconal to Versicolorin B and Racemization of Versiconal Hemiacetal Acetate. *Applied and Environmental Microbiology* 1993, 59(8):2493-2500.
- Yabe K., Nakamura Y., Nakajima H., Ando Y., Hamasaki T.: Enzymatic Conversion of Norsolorinic Acid to Averufin in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 1991, 57(5):1340-1345.
- Young S. B. & Setlow P.: Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone. *Journal of Applied Microbiology* 2004, 96:1133-1142.
- Yu J., Chang P. K., Ehrlich K. C., Cary J. W., Bhatnagar D., Cleveland T. E., Payane G. A., Linz J. E., Woloshuk C. P., Bennett J. W.: Cluster Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, 70(3):1253-1262.
- Zhu F.: Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chemistry* 2018, 264:358-366.
- Zotti M., Porro R., Vizzini A., Mariotti M. G.: Inactivation of *Aspergillus* spp. By ozono treatment. *Science and Engineering* 2008, 30:423-430.