

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI**

**FACULTATEA DE AGRICULTURĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL DE DOCTORAT: AGRONOMIE
SPECIALIZAREA: PROTECȚIA PLANTELOR**

TEZĂ DE DOCTORAT

Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. Eugen ULEA

Doctorand,
Maricica VASILACHI (ALEXANDRU)

Iași,
2022

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚELE VIEȚII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI**

**FACULTATEA DE AGRICULTURĂ
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL DE DOCTORAT: AGRONOMIE
SPECIALIZAREA: PROTECȚIA PLANTELOR**

TEZĂ DE DOCTORAT

***“Studii privind prezența micotoxinelor în produsele de
origine vegetală și cauzele apariției acestora în condițiile
județului Iași”***

Conducător de doctorat,
Prof. Univ. Dr. Eugen ULEA

Doctorand,
Maricica VASILACHI (ALEXANDRU)

Iași,
2022

**UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
„ION IONESCU DE LA BRAD” FROM IAȘI**

**FACULTY OF AGRICULTURE
DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL FIELD: AGRONOMY
SPECIALIZATION: PLANT PROTECTION**

PHD THESIS

***“Studies on the presence of mycotoxins in products of
vegetable origin and the causes of their occurrence in the
conditions of Iași County”***

PhD coordinator,
Prof. Univ. Dr. Eugen ULEA

PhD student,
Maricica VASILACHI (ALEXANDRU)

Iași,
2022

CUPRINS

	Pagina
Introducere.....	1
Rezumatul tezei	5
PARTEA I - STUDIU BIBLIOGRAFIC	
Cap. 1. Considerații generale privind micotoxinele	13
Cap. 2. Factorii care influențează producerea micotoxinelor	16
2.1. Factorii de mediu.....	16
2.2. Factorii chimici.....	21
2.3. Factorii biologici.....	21
Cap.3. Principalele micotoxine care contaminează alimentele și limitele legislative privind conținutul acestora în produsele agroalimentare.....	23
3.1. Contaminarea alimentelor cu aflatoxine	24
3.2. Contaminarea alimentelor cu ochratoxine	27
3.3. Contaminarea alimentelor cu zearalenonă.....	29
3.4. Contaminarea alimentelor cu fumonisine	32
3.5. Contaminarea alimentelor cu trichotecene (deoxinivalenol, toxina T2/HT.....	33
3.6. Contaminarea alimentelor cu patulină	36
Cap. 4. Sursele de contaminare cu micotoxine	39
4.1. Sursele principale (directe)	39
4.2. Sursele secundare (indirecte)	47
Cap. 5. Prevenția și controlul contaminării cu micotoxine	49
5.1. Metode preventive	49
5.1.1. Strategii de prerencoltare	49
5.1.2. Managementul recoltelor	50
5.1.3. Managementul postrecoltării	51
5.2. Metode curative	52
5.2.1. Metode fizice	52
5.2.2. Metode chimice	54
5.2.3. Metode biologice	55
Cap.6. Efectele consumului de produse agroalimentare contaminate cu micotoxine	57
6.1. Efectele consumului de produse contaminate cu aflatoxine	60
6.2. Efectele consumului de produse contaminate cu ochratoxine.....	61
6.3. Efectele consumului de produse contaminate cu zearalenonă	63
6.4. Efectele consumului de produse contaminate cu fumonisine	65
6.5. Efectele consumului de produse contaminate cu trichotecene	66

6.6. Efectele consumului de produse contaminate cu patulină	67
---	----

PARTEA II – CERCETĂRI PROPRII

Cap.7. Contribuții proprii privind cercetarea micotoxinelor.....	69
7.1 Motivația, scopul și obiectivele cercetărilor.....	69
7.2 Materiale și metode de cercetare	70
Cap. 8. Identificarea și monitorizarea micotoxinelor	71
8.1. Pregătirea preliminară și eșantionarea probelor	71
8.2. Metode de prelevare a probelor.....	72
8.3. Strategii de prelevare a probelor.....	72
8.4. Tehnica de prelevare a probelor.....	74
Cap.9. Metode de determinare a micotoxinelor.....	79
9.1. Determinarea aflatoxinei B1.....	79
9.2. Determinarea aflatoxinelor totale	82
9.3. Determinarea ochratoxinei A	85
9.4. Determinarea zearalenonei	88
9.5. Determinarea fumonisinei	91
9.6. Determinarea deoxinivalenolului	93
9.7. Determinarea toxinei T-2/HT-2	97
9.8. Determinarea patulinei	99
Cap.10. Rezultate și discuții privind micotoxinele identificate	103
10.1. Rezultate privind identificarea și monitorizarea aflatoxinei B1	104
10.2. Rezultate privind identificarea și monitorizarea aflatoxinei totale.....	105
10.3. Rezultate privind identificarea și monitorizarea ochratoxinei A	108
10.4. Rezultate privind identificarea și monitorizarea zearalenonei.....	111
10.5. Rezultate privind identificarea și monitorizarea fumonisinei.....	114
10.6. Rezultate privind identificarea și monitorizarea deoxinivalenolului.....	117
10.7. Rezultate privind identificarea și monitorizarea toxinei T-2/HT-2.....	122
10.8. Rezultate privind identificarea și monitorizarea patulinei.....	124
Cap. 11. Concluzii generale	126
Bibliografie	134
Anexe	144

TABLE OF CONTENTS

	Page
Introduction.....	1
Thesis summary	5
PART I - BIBLIOGRAPHIC STUDY	
Capther 1. General considerations regarding mycotoxins	13
Capther 2. Factors influencing mycotoxin production.....	16
2.1. Environmental factors	16
2.2. Chemical factors	21
2.3. Biological factors	21
Capther 3. The main mycotoxins that contaminate food and the legislative limits regarding their content in agri-food products.....	23
3.1. Food contamination with aflatoxins	24
3.2. Food contamination with ochratoxins	27
3.3. Food contamination with zearalenone	29
3.4. Food contamination with fumonisins	32
3.5. Food contamination with trichothecenes (deoxynivalenol, T-2/HT-2 toxin).....	33
3.6. Food contamination with patulin	36
Capther 4. Sources of mycotoxin contamination.....	39
4.1. Primary sources	39
4.2. Secondary sources	47
Capther 5. Prevention and control of mycotoxin contamination	49
5.1. Preventive methods	49
5.1.1. Preharvest strategies	49
5.1.2. Crop management	50
5.1.3. Postharvest management	51
5.2. Curative methods	52
5.2.1. Physical methods	52
5.2.2. Chemical methods	54
5.2.3. Biological methods	55
Capther 6. The effects of consuming agro-food products contaminated with mycotoxins.....	57
6.1. The effects of consuming products contaminated with aflatoxins	60
6.2. The effects of consuming products contaminated with ochratoxin	61
6.3. The effects of consuming products contaminated with zearalenone	63
6.4. The effects of consuming products contaminated with fumonisin.....	65
6.5. The effects of consuming products contaminated with trichothecenes.....	66

6.6. The effects of consuming products contaminated with patulin	67
--	----

PART TWO- OWN RESEARCH

Capther 7. Own contributions regarding mycotoxin research	69
7.1 The motivation, purpose and objectives of the research	69
7.2 Research materials and methods	70
Capther 8. Identification and monitoring of mycotoxins	71
8.1 Preliminary preparation and sample sampling.....	71
8.2 Sampling methods	72
8.3 Sampling strategies	72
8.4 Sampling technique	74
Chapter 9. Methods for the determination of mycotoxins	79
9.1 Determination of aflatoxin B1	79
9.2 Determination of total aflatoxins	82
9.3 Determination of ochratoxin A	85
9.4 Determination of zearalenone	88
9.5 Determination of fumonisins	91
9.6 Determination of deoxynivalenol	93
9.7 Determination of T-2/HT-2 toxin	97
9.8 Determination of patulin	99
Chapter 10. Results and discussion of identified mycotoxins	103
10.1 Results on the identification and monitoring of aflatoxin B1 ...	104
10.2 Results on the identification and monitoring of total aflatoxins	105
10.3 Results on the identification and monitoring of ochratoxin A	108
10.4 Results on the identification and monitoring of zearalenone	111
10.5 Results on the identification and monitoring of fumonisins	114
10.6 Results on the identification and monitoring of deoxynivalenol	117
10.7 Results on the identification and monitoring of T-2/HT-2 toxin	122
10.8 Results on the identification and monitoring of patulin.....	124
Capther 11. General conclusions	126
Bibliography.....	134
Anexes.....	144

INTRODUCERE

Pentru a fi utile organismului uman sau animal, produsele alimentare trebuie să fie lipsite de nocivitate, în caz contrar acestea putând constitui o sursă de îmbolnăviri grave, cu reale pericole asupra sănătății consumatorilor. O clasificare succintă a pericolelor care pot plana asupra sănătății umane ar fi următoarea: micotoxine secretate de o gamă extinsă de mucegaiuri, substanțe chimice rezultate în urma poluării (contaminanți, metale grele etc.), substanțe toxice naturale, diferite boli parazitare, boli infecțioase transmisibile prin consumul de alimente care produc toxinfecții alimentare etc.

Influența alimentelor asupra sănătății omului este un aspect de actualitate. Întrucât stilul de viață al timpurilor actuale este foarte diferit de cel din trecut, poate să apară riscul contaminării alimentelor prin contaminanți naturali, prin contaminanți introduși accidental în alimente, sau prin procesarea inadecvată a alimentelor. Cerința ca alimentele puse la dispoziția consumatorilor să fie sigure din punct de vedere igienico-sanitar, a devenit imperioasă, întrucât consumul de alimente obținute în sistem industrial a crescut foarte mult, iar acestea nu trebuie să provoace îmbolnăviri oamenilor. Siguranța alimentară constituie o responsabilitate comună a tuturor celor implicați în sectorul alimentar, respectiv: producători agricoli, procesatori industriali, comercianți, consumatori și guvernanți. Pe tot parcursul lanțului alimentar trebuie să existe o vigilență maximă din partea tuturor părților implicate, astfel încât să se minimalizeze riscul de contaminare a produselor alimentare, iar acestea să fie sigure pentru consum.

Micotoxinele sunt metaboliți secundari produși de anumiți fungi sau mucegaiuri care cresc pe substraturi alimentare și pot contamina hrana animalelor și a oamenilor. (Tănase C., 2001) Acestea au capacitatea de a perturba procesele oxidative de la nivel celular, producând efecte negative asupra sistemului imunitar și asupra integrității materialului genetic, acest lucru producând reacții citotoxice și carcinogene, atât la oameni, cât și la animale. Acestea sunt considerate factor de risc major pentru sănătatea umană și animală, fiind detectate în numeroase categorii de produse agroalimentare, cum ar fi: cereale (grâu, porumb, orz, ovăz, orez, secară), leguminoase (soia, fasole, mazăre, arahide), semințe oleaginoase (floarea soarelui, miez de nucă), legume și fructe proaspete și conservate (tomate, ardei, morcovi, mere, pere, gutui, caise, piersici, citrice, compoturi, dulcețuri), sucuri naturale, băuturi alcoolice (vinuri, bere, must, cidru), produse derivate din cereale (făinuri, produse de panificație, paste făinoase), condimente și plante medicinale (piper, paprika, cimbru, mărar, mușetel, sunătoare etc). Întrucât sfera de contaminare micotoxinică este foarte largă, micotoxinele sunt considerate ca făcând parte dintre contaminanții alimentari cei mai semnificativi în ceea ce privește impactul asupra sănătății publice, a securității alimentare și asupra economiei numeroaselor țări ale Uniunii Europene.

Această lucrare a luat naștere din dorința de a aduce un plus de cunoaștere datelor existente referitoare la micotoxinele produse de ciupercile micotice și la modul de acumulare a acestora în produsele alimentare de origine vegetală, precum și de a crea o atenționare a faptului că, în urma consumului cronic și cumulativ de alimente contaminate, se poate

produce o alterare a calității vieții prin apariția de boli grave. În plus, mi-am propus să aflu care au fost sursele și cauzele apariției acestor “factori perturbatori tăcuți și lenți”, la nivelul jud. Iași.

Ideea acestui studiu mi-a fost insuflată de dl. Prof. univ. Dr. Eugen ULEA, care m-a sprijinit necondiționat și m-a îndrumat continuu pentru a obține rezultate optime în ceea ce privește cercetările care vizează tema. Pentru aceasta și nu numai, îi adresez mii de mulțumiri și îi port o profundă recunoștință și considerație.

În mod cu totul deosebit, mulțumesc comisiei de analiză și evaluare a tezei de doctorat.

Cu multă stimă, adresez calde mulțumiri și membrilor comisiei de îndrumare, Prof. univ. Dr. Mihai Tălmăciu, Prof. univ. Dr. Tănase Cătălin, Șef lucr. univ. Dr. Florin-Daniel Lipșa, Asistent univ. Dr. Mihaela Florea, precum și d-nei Prof. univ. Dr. Viorica Iacob, care m-au motivat și m-au sprijinit pe parcursul etapelor de desfășurare a studiilor de doctorat.

De asemenea, aș dori să mulțumesc conducerii Universității de Științele Vieții “Ion Ionescu de la Brad” din Iași, precum și conducerii Școlii Doctorale de Științe Inginerești, pentru asigurarea tuturor condițiilor de desfășurare a activității didactice și pentru toată disponibilitatea arătată.

În mod deosebit, adresez mulțumiri celor dragi mie, adică soțului și fiicei mele, care m-au încurajat și m-au susținut moral, pentru a finaliza cu succes această nouă și importantă experiență profesională.

INTRODUCTION

In order to be useful for the human or animal body, food products must be harmless, otherwise they can be a source of serious illnesses, with real dangers for the health of consumers. A brief classification of the dangers that may loom over human health would be as follows: mycotoxins secreted by a wide range of molds, chemical substances resulting from pollution (pollutants, heavy metals, etc.), natural toxic substances, various parasitic diseases, communicable infectious diseases by eating foods that cause food poisoning etc.

The influence of food on human health is a current issue. Since the lifestyle of today's times is very different from that of the past, the risk of contamination of food through natural contaminants, through contaminants accidentally introduced into food, or through inadequate processing of food can occur. The requirement that the food made available to consumers be safe from a hygienic-sanitary point of view has become imperative, since the consumption of food obtained in an industrial system has increased a lot, and they must not cause people to get sick. Food safety is a shared responsibility of all those involved in the food sector, namely: agricultural producers, industrial processors, traders, consumers and governments. Throughout the food chain there must be maximum vigilance from all parties involved, so as to minimize the risk contamination of food products, and that they be safe for consumption.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by certain fungi or molds that grow on food substrates and can contaminate animal and human food. (Tănase C., 2001) They have the ability to disrupt the oxidative processes at the cellular level, producing negative effects on the immune system and on the integrity of the genetic material, this producing cytotoxic and carcinogenic reactions, both in humans and animals. They are considered a major risk factor for human and animal health, being detected in numerous categories of agri-food products, such as: cereals (wheat, corn, barley, oats, rice, rye), legumes (soy, beans, peas, peanuts), oilseeds (sunflower, walnut kernels), fresh and preserved vegetables and fruits (tomatoes, peppers, carrots, apples, pears, quinces, apricots, peaches, citrus fruits, compotes, jams), natural juices, alcoholic beverages (wines, beer, must, cider), products derived from cereals (flour, bakery products, pasta), spices and herbs (pepper, paprika, thyme, dill, chamomile, St. John's wort, etc.). Since the scope of mycotoxin contamination is very wide, mycotoxins are considered to be part of the most significant food contamination in terms of impact on public health, food safety and the economy of many countries of the European Union.

This work was born from the desire to bring more knowledge to the existing data regarding mycotoxins produced by mycotic fungi and how they accumulate in food products of vegetable origin, as well as to create a warning that, following the chronic and cumulative consumption of contaminated food, an alteration of the quality of life can occur through the appearance of serious diseases. In addition, I set out to find out what were the sources and causes of the appearance of these "silent and slow disruptive factors", at the level of Iași county.

The idea of this study was instilled in me by Mr. Univ. Prof. Dr. Eugen ULEA, who supported me unconditionally and continuously guided me to achieve optimal results in the researches aimed at the theme. For this and not only, I give him a thousand thanks and deep gratitude and consideration.

In a very special way, I thank the doctoral thesis analysis and evaluation committee.

With great respect, I also extend warm thanks to the members of the guidance committee, Prof. univ. Dr. Mihai Tălmăciu, Univ. Prof. Dr. Tănase Cătălin, Head of Work. university Dr. Florin-Daniel Lipșa, University Assistant. Dr. Mihaela Florea, as well as Ms. Prof. univ. Dr. Viorica Iacob, who motivated and supported me during the stages of the doctoral studies.

I would also like to thank the management of the "Ion Ionescu de la Brad" University of Life Sciences in Iași, as well as the management of the Doctoral School of Engineering Sciences, for ensuring all the conditions for carrying out teaching activities and for all the availability shown.

In particular, I thank my loved ones, that is, my husband and daughter, who encouraged me and supported me morally, to successfully complete this new and important professional experience.

REZUMATUL TEZEI

Cuvinte cheie: micotoxine, produse agroalimentare, eşantioane, teste imunoenzimatiche, efecte toxice etc.

Teza de doctorat intitulată “*Studii privind prezența micotoxinelor în produsele de origine vegetală și cauzele apariției acestora în condițiile județului Iași*” este structurată în două părți, fiind desfășurată pe 173 pagini.

Partea I a lucrării cuprinde 6 capitole, fiind dedicată sintezei studiului bibliografic privind stadiul cunoașterii la nivel național și internațional a temei abordate. Aceasta cuprinde informații privind cercetările efectuate cu privire la micotoxinele care influențează calitatea și siguranța produselor agroalimentare.

Capitolul 1 conține o serie de considerații generale privind principalele micotoxine care contaminează frecvent produsele agroalimentare, cu referire la caracteristicile generale ale acestora, la speciile micotice care le generează și la categoriile de produse care pot prezenta risc de contaminare.

Capitolul 2 cuprinde descrierea factorilor care influențează producerea micotoxinelor, cu referire la factorii de mediu, chimici și biologici. S-a făcut o descriere succintă a influenței fiecăruia dintre acești factori asupra dezvoltării miceliilor producători de micotoxine. Detaliile referitoare la aceste aspecte sunt reliefate în cadrul unei figuri și a 3 tabele.

Capitolul 3 face referire la principalele micotoxine cu potențial toxic care contaminează produsele vegetale și limitele legislative impuse privind conținutul acestora în produsele alimentare. Capitolul cuprinde 6 subcapitole ce includ informații generale referitoare la contaminarea alimentelor cu următoarele tipuri de micotoxine: aflatoxine, ochratoxine, zearalenonă, fumonisine, trichotecene (deoxynivalenol, toxina T-2/HT-2) și patulină. Sunt reliefate următoarele aspecte principale: categoriile de produse alimentare cu risc, modalități de reducere a riscului de contaminare cu micotoxine, afecțiunile pe care le pot produce acestea la oameni și animale, precum și limitele maxime admise impuse de normele legislative ale Comunității Europene, pentru fiecare tip de micotoxină, în parte. Detaliile referitoare la aceste aspecte sunt evidențiate în cadrul a 3 figuri și a 7 tabele.

Capitolul 4 cuprinde 2 subcapitole referitoare la sursele principale și cele secundare de contaminare micototoxică. Sursele principale sunt reprezentate de produse agricole primare (cereale, semințe oleaginoase, fructe și legume proaspete, boabe de cafea și cacao etc.), iar sursele secundare de infestare, sunt constituite de produse agroalimentare procesate (ulei, sucuri, băuturi fermentate etc.). Pentru fiecare categorie în parte, s-au analizat atât nivelurile de contaminare cât și sursele de apariție a micotoxinelor care pot avea potențial toxicogen, fiecare analiză fiind bazată pe date aferente literaturii de specialitate, referitoare la incidența micotoxinelor în substraturile vegetale.

Capitolul 5 face referire la metodele de prevenție și control în cazul contaminării cu micotoxine, fiind structurat în 2 subcapitole și 6 paragrafe, respectiv, metodele preventive și metodele curative.

Metodele de prevenție care se pot aplica în vederea evitării contaminării micotoxinice sunt mai simple din punct de vedere tehnic și sunt preferabile metodelor de decontaminare. Acestea sunt bazate pe aplicarea de strategii de prerecoltare a produselor agricole, pe asigurarea unui management corespunzător al recoltelor și pe administrarea corectă a strategiilor de postrecoltare, respectiv de depozitare a produselor agricole.

Metodele curative se împart în 3 categorii: fizice, chimice și biologice, dintre acestea aplicabilitate practică având doar metodele fizice, care prezintă avantajul că nu afectează calitatea produselor agroalimentare sau a furajelor supuse tratamentelor.

Capitolul 6 este structurat în 6 subcapitole referitoare la efectele consumului de produse agroalimentare contaminate cu micotoxine. Fiecare categorie de micotoxine este analizată sub aspectul toxicității cronice sau acute pe care o poate manifesta la oameni sau animale. Efectele toxice și cancerigene asociate micotoxinelor sunt evidențiate în cadrul a 9 figuri și 2 tabele, care fac parte integrantă din lucrare. În cadrul capitolului se accentuează corelația dintre diferitele categorii de produse vegetale contaminate cu micotoxine și carcinogenitatea dată de acestea, în urma consumului uman sau animal.

Partea II a lucrării cuprinde cercetările proprii, fiind alcătuită din 5 capitole în care se pune accentul pe identificarea și monitorizarea micotoxinelor, pe descrierea materialelor și a metodelor de determinare a acestora din produsele vegetale și respectiv pe prezentarea rezultatelor obținute.

Capitolul 7 este dedicat motivației temei de cercetare, a scopului acesteia, a obiectivelor și activităților specifice cercetării. Există mențiuni referitoare la cadrul instituțional și organizatoric unde s-au efectuat cercetările.

Motivația alegerii temei studiate s-a datorat următoarelor aspecte: -precaritatea cercetărilor privind prevalența și nivelul micotoxinelor în produsele agroalimentare la nivelul jud. Iași; -recomandările EFSA (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor) de studiere a potențialei creșteri a contaminării micotoxinice a produselor agroalimentare din Uniunea Europeană, în vederea aplicării de măsuri adecvate;

- necesitatea impusă de toxicitatea ridicată, a evaluării gradului de contaminare a produselor vegetale, în scopul protecției stării de sănătate a consumatorilor.

Scopul acestui studiu îl reprezintă evaluarea prezenței și gradului de contaminare micotoxinică a diferitelor produse alimentare de origine vegetală, precum și stabilirea cauzelor și surselor de apariție a acestora în condițiile jud. Iași, în perioada 2015-2020.

Obiectivele cercetării au fost stabilite pentru a se putea atinge scopul propus, fiind vizate următoarele aspecte:

-identificarea principalelor micotoxine prezente în produsele alimentare de origine vegetală, din județul Iași;

-evaluarea nivelului de contaminare micotoxinică a diferitelor categorii de produse agroalimentare, la nivelul județului Iași;

- urmărirea dinamicii anuale a prevalenței micotoxinelor în produsele agroalimentare;
- stabilirea și analizarea surselor de contaminare cu micotoxine pentru produsele alimentare de origine vegetală luate în studiu;
- efectuarea trasabilității produselor alimentare de origine vegetală studiate și analizarea cauzelor contaminării micotoxice a acestora.

Activitățile specifice desfășurate pe durata efectuării cercetărilor au constat în: prelevarea probelor de produse agroalimentare și pregătirea preliminară a acestora; efectuarea analizelor de laborator; interpretarea rezultatelor obținute; evaluarea gradului de contaminare micotoxinică a produselor analizate; evaluarea surselor principale și secundare de contaminare; stabilirea concluziilor și recomandărilor.

Materialul de studiu a fost constituit din eșantioane de produse agroalimentare (cereale și produse derivate, produse de panificație-patiserie, fructe și legume proaspete, sucuri, vinuri etc), care au fost prelevate în mod aleatoriu, după o strategie de prelevare obiectivă, atât din unități de depozitare, unități procesatoare cât și din unități de comercializare a produselor agroalimentare, situate pe raza jud. Iași. Prelevarea probelor a fost realizată pe baza unei proceduri de lucru prestabilite, în conformitate cu anexa nr. 1 a Regulamentului CE nr. 401/2006 care stabilește modalitățile de prelevare de probe și metodele de analiză pentru controlul oficial al conținutului de micotoxine din alimente.

Metodele de determinare a conținutului de micotoxine, au avut în vedere efectuarea de determinări cantitative utilizând metodele de determinare ELISA și HPLC/LC, acestea fiind validate și acreditate. Cercetările s-au efectuat pe parcursul a 6 ani de studiu, în perioada 2015-2020.

Capitolul 8 cuprinde metodologia de identificare și monitorizare a micotoxinelor, fiind structurat în 4 subcapitole care se referă la: modalitatea de pregătire preliminară și de eșantionare a probelor, la aplicarea metodelor, strategiilor și tehnicilor de prelevare, precum și la stabilirea conformității probelor. Detalii referitoare la aceste aspecte sunt evidențiate și în cadrul celor 5 figuri incluse în capitol.

Capitolul 9 se referă la metodele de determinare efectivă a principalelor micotoxine studiate. Acest capitol conține o figură și este structurat în 8 subcapitole aferente fiecărui tip de micotoxină precizat. Pentru determinare s-au utilizat kit-uri specifice, interpretarea rezultatelor fiind efectuată prin metodele ELISA și HPLC/LC. În cadrul capitolului sunt expuse detalii referitoare la metodologia de lucru, materialele utilizate și la modul de interpretare a rezultatelor obținute.

Capitolul 10 cuprinde rezultatele și discuțiile privind micotoxinele identificate în cadrul cercetărilor și este structurat în 8 subcapitole, specifice fiecărei micotoxine studiate.

În perioada de studiu, respectiv, anii 2015-2020, la nivelul jud. Iași, au fost prelevate și analizate un număr total de 698 de probe de produse agroalimentare de origine vegetală, pentru determinarea principalelor micotoxine. Pentru fiecare micotoxină în parte, a fost analizat un număr total de probe, după cum urmează: 85 de probe pentru aflatoxina B1, 90 de probe pentru aflatoxina totală, 133 de probe pentru deoxinivalenol, 119 probe pentru zearalenonă, 48 de probe pentru fumonisine, 148 de probe pentru ochratoxina A, 40 de probe pentru Toxina T-2/HT-2 și 35 de probe pentru determinarea patulinei. Probele au constat

atât din produse agricole primare, cât și din produse agroalimentare procesate. Pentru a acoperi o arie vastă de analiză, aceste probe au fost prelevate din unități cu specific de activitate diferit, respectiv: depozite de cereale, depozite de produse alimentare, unități de vânzare cu amănuntul (supermarket-uri), unități de procesare din domeniile- panificație, patiserie, conservare legume-fructe, vinificație, obținerea berii etc.

Capitolul mai cuprinde 13 tabele și 8 figuri în care sunt reliefate detalii referitoare la: numărul total și tipul de probe analizate, zona de proveniență a acestora, valorile pentru probele depistate pozitiv, limitele legale admise pentru fiecare categorie de produs și incidența fiecărei micotoxine raportată la probele analizate.

Concluzia generală desprinsă din analiza valorilor procentuale a tuturor micotoxinelor cu valori pozitive în eșantioanele studiate este că incidența majoră în produsele agroalimentare s-a înregistrat în cazul cerealelor și produselor derivate din acestea, precum și în cazul produselor de panificație, analiza micotoxinelor relevând un nivel mai ridicat și periculos de deoxinivalenol (53,4%), zearalenonă (20.17%) și fumonisine (18.8%). Toate valorile înregistrate nu au depășit însă, limitele legislative impuse. Cea mai alarmantă problemă depistată, a fost faptul că, contaminarea micotoxinică este prezentă în produsele de panificație în procent de 38,62% din totalul probelor analizate, prezentând un nivel ridicat și îngrijorător de deoxinivalenol și zearalenonă. Întrucât pâinea și produsele de panificație reprezintă alimente de bază în regimul nutrițional al majorității populației din țara noastră, se impune o monitorizare permanentă și riguroasă a acestor categorii de produse din punct de vedere a contaminării micotoxice.

Capitolul 11 cuprinde concluziile generale interpretate prin prisma bibliografiei consultate care cuprinde un număr total de 181 de surse de referință. Detaliile cu privire la incidența micotoxinelor și la rezultatele globale asupra cercetărilor efectuate sunt evidențiate de o figură și un tabel centralizator.

PhD Thesis Summary

Key words: mycotoxins, agro-food products, samples, immunoenzymatic tests, toxic effects, etc.

The doctoral thesis entitled "*Studies regarding the presence of mycotoxins in products of plant origin and the causes of their occurrence in the conditions of Iași county*" is structured in two parts, being spread over 200 pages.

Part one of the work includes 6 chapters, being dedicated to the synthesis of the bibliographic study regarding the state of knowledge at the national and international level of the topic addressed. This includes information on research conducted on mycotoxins that influence the quality and safety of agri-food products.

Chapter 1 contains a series of general considerations regarding the main mycotoxins that frequently contaminate agro-food products, with reference to their general characteristics, to the mycotic species that generate them and to the categories of products that may present a risk of contamination.

Chapter 2 includes the description of the factors that influence the production of mycotoxins, with reference to environmental, chemical and biological factors. A brief description of the influence of each of these factors on the development of mycotoxin-producing fungi is given. The details of these aspects are highlighted in a figure and 3 tables.

Chapter 3 refers to the main mycotoxins with toxic potential that contaminate plant products and the legislative limits imposed on their presence in food products. The chapter includes 6 sub-chapters that include general information on food contamination with the following types of mycotoxins: aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, fumonisins, trichothecenes (deoxynivalenol, T-2/HT-2 toxin) and patulin. The following main aspects are highlighted: the categories of food products at risk, ways to reduce the risk of contamination with mycotoxins, the conditions they can cause in humans and animals, as well as the maximum permissible limits imposed by the legislative norms of the European Community, for each type of mycotoxin. The details of these aspects are highlighted in 3 figures and 7 tables.

Chapter 4 includes 2 sub-chapters relating to the main and secondary sources of mycotoxin contamination. The main sources are represented by primary agricultural products (cereals, oilseeds, fresh fruits and vegetables, coffee and cocoa beans, etc.), and the secondary sources of infestation are constituted by processed agro-food products (oil, juices, fermented drinks, etc.). For each separate category, both the levels of contamination and the sources of occurrence of mycotoxins that may have toxicogenic potential were analysed, each analysis being based on data related to the specialized literature, regarding the incidence of mycotoxins in plant substrates.

Chapter 5 refers to prevention and control methods in the case of mycotoxin contamination, being structured in 2 subchapters and 6 paragraphs, respectively, preventive methods and curative methods.

Prevention methods that can be applied to avoid mycotoxin contamination are easier from a technical point of view and are preferable to decontamination methods. These are based on the application of pre-harvest strategies for agricultural products, on ensuring proper harvest management and on the correct administration of post-harvest and storage strategies for agricultural products.

The curative methods are divided into 3 categories: physical, chemical and biological, of which only the physical methods have practical applicability, which have the advantage of not affecting the quality of the agro-food products or of the fodder subjected to the treatments.

Chapter 6 is structured in 6 sub-chapters related to the effects of consuming agri-food products contaminated with mycotoxins. Each category of mycotoxins is analysed in terms of the chronic or acute toxicity it can manifest in humans or animals. The toxic and carcinogenic effects associated with mycotoxins are highlighted in 7 figures and 2 tables, which are an integral part of the work. The chapter emphasizes the correlation between the different categories of plant products contaminated with mycotoxins and the carcinogenicity given by them, following human or animal consumption.

Part two of the paper includes the own research, being made up of 5 chapters in which the emphasis is placed on the identification and monitoring of mycotoxins, on the description of the materials and methods of their determination from plant products and respectively on the presentation of the results obtained.

Chapter 7 is dedicated to the motivation of the research theme, its purpose, objectives and specific research activities. There are mentions of the institutional and organizational framework where the research was carried out.

The motivation for choosing the studied topic was due to the following aspects:

- the precariousness of research on the prevalence and level of mycotoxins in agro-food products at the level of Iași county;
- the recommendations of the EFSA (European Food Safety Authority) to study the potential increase in mycotoxin contamination of agri-food products in the European Union, in order to apply appropriate measures;
- the need imposed by the high toxicity, to evaluate the degree of contamination of plant products, in order to protect the health of consumers.

The purpose of this study is to evaluate the presence and degree of mycotoxin contamination of various food products of vegetable origin, as well as to establish the causes and sources of their occurrence in the conditions of Iași county, in 2015-2020.

The objectives of the research were established in order to achieve the proposed goal, with the following aspects being targeted:

- identification of the main mycotoxins present in food products of vegetable origin, from Iasi county;

- the evaluation of the level of mycotoxin contamination of different categories of agro-food products, at the level of Iasi county;
- following the annual dynamics of the prevalence of mycotoxins in agro-food products;
- establishing and analysing the sources of contamination with mycotoxins for the food products of vegetable origin taken into study;
- performing the traceability of the food products of vegetable origin studied and analysing the causes of their mycotoxin contamination.

The specific activities carried out during the research consisted in: sampling of agri-food products and their preliminary preparation; performing laboratory analyses; interpretation of the results obtained; evaluation of the degree of mycotoxin contamination of the analysed products; assessment of main and secondary sources of contamination; establishing conclusions and recommendations.

The study material consisted of samples of agri-food products (cereals and derived products, bakery-pastry products, fresh fruits and vegetables, juices, wines, etc.), which were randomly sampled, following an objective sampling strategy, both from storage units, processing units as well as units for the sale of agri-food products, located within the radius of Iași county. The sampling was carried out based on a predetermined work procedure, in accordance with annex no. 1 of EC Regulation no. 401/2006 establishing the methods of sampling and methods of analysis for the official control of mycotoxin content in food.

The methods for determining the content of mycotoxins considered the performance of quantitative determinations using the ELISA and HPLC/LC determination methods, these being validated and accredited. The research was carried out during 6 years of study, in the period 2015-2020.

Chapter 8 includes the methodology for the identification and monitoring of mycotoxins, being structured in 4 sub-chapters that refer to: the method of preliminary preparation and sampling, the application of sampling methods, strategies and techniques, as well as the establishment of sample compliance. Details regarding these aspects are also highlighted in the 5 figures included in the chapter.

Chapter 9 refers to the effective determination methods of the main mycotoxins studied. This chapter contains one figure and is structured in 8 subchapters, related to each specified type of mycotoxin. Specific kits were used for the determination, the interpretation of the results being carried out by the ELISA and HPLC/LC methods. In the chapter, details are presented regarding the working methodology, the materials used and how to interpret the results obtained.

Chapter 10 includes the results and discussions regarding the mycotoxins identified in the research and is structured in 8 subchapters, specific to each mycotoxin studied.

During the study period, respectively, the years 2015-2020, at the level of Iași county, a total number of 698 samples of agri-food products of vegetable origin were taken and analysed, for the determination of the main mycotoxins. For each individual mycotoxin, a total number of samples were analysed as follows: 85 samples for aflatoxin B1, 90 samples for total aflatoxin, 133 samples for deoxynivalenol, 119 samples for zearalenone, 48 samples for fumonisins, 148 samples for ochratoxin A, 40 samples for Toxin T-2/HT-2 and 35

samples for patulin determination. The samples consisted of both primary agricultural products and processed agro-food products. In order to cover a wide area of analysis, these samples were taken from units with different specific activities, namely: grain warehouses, food product warehouses, retail units (supermarkets), processing units in the fields of baking, pastry, preserving vegetables and fruits, winemaking, obtaining beer, etc.

The chapter also includes 13 tables and 8 figures in which details are highlighted regarding: the total number and type of analysed samples, their area of origin, the values for positively detected samples, the legal limits allowed for each product category and the incidence of each mycotoxin reported to the analysed samples.

The general conclusion derived from the analysis of the percentage values of all mycotoxins with positive values in the studied samples is that the major incidence in agro-food products was recorded in the case of cereals and products derived from them, as well as in the case of bakery products, the analysis of mycotoxins revealing a higher level and dangerous deoxynivalenol (53.4%), zearalenone (20.17%) and fumonisins (18.8%). However, all the recorded values did not exceed the legal limits imposed.

The most alarming problem detected was the fact that mycotoxin contamination is present in bakery products in a percentage of 38.62% of the total samples analysed, presenting a high and worrying level of deoxynivalenol and zearalenone. Since bread and bakery products are basic foods in the nutritional regime of the majority of the population in our country, a permanent and rigorous monitoring of these categories of products is required regarding mycotoxin contamination.

Chapter 11 includes the general conclusions interpreted through the lens of the bibliography consulted, which sums up a total number of 181 reference sources. Details on the incidence of mycotoxins and the overall results of the research carried out are highlighted by a centralizing figure and table.

PARTEA I- STUDIU BIBLIOGRAFIC

PART ONE – BIBLIOGRAPHIC STUDY

CAP. 1. CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND MICOTOXINELE

CHAPTER 1. GENERAL CONSIDERATION REGARDING MYCOTOXINS

Pierderile economice cauzate de micotoxine se produc pe tot parcursul lanțului alimentar. În plus, ca rezultat al consumului de către animale a furajelor contaminate, care conțin de regulă mai multe micotoxine, există riscul major ca micotoxinele să ajungă în produsele alimentare de origine animală - ouă, lapte, carne. În acest context, se impune necesitatea dezvoltării capacității de determinare a conținutului de micotoxine pe întreg lanțul alimentar plantă - animal - produse alimentare. (Savu ș.a., 2004)

Micotoxinele prezintă următoarele caracteristici generale: au structură chimică complexă, au molecule nepolare, prezintă masă moleculară mică, sunt rezistente la acțiunea agenților fizici și chimici, au toxicitate ridicată, au efecte grave asupra sistemelor biologice, pot fi secretate înainte de recoltare sau după recoltare (Coman ș.a., 1985).

Distribuția micotoxinelor în diferite zone ale globului prezintă caracteristici diferite, în funcție de condițiile climatice manifestate, în nordul Europei (Polonia, Danemarca), preponderență având ochratoxina A iar în sudul și centrul Europei (Ungaria, Austria, Suedia) dominante fiind fusariotoxinele (deoxinivalenol, zearalenonă, toxina T-2/HT-2). (www.biblioteca.regielive.ro)

Cele mai frecvente micotoxine care au potențial de contaminare a produselor agroalimentare sunt: aflatoxinele, ochratoxinele, zearalenonele, fumonisinele, trichotecenele (deoxinivalenol; toxina T2/HT2) și patulina.

Aflatoxinele sunt micotoxinele considerate cele mai toxice pentru sănătatea oamenilor și animalelor, fiind produși metabolici ai mucegaiurilor, speciile *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus* fiind apte să producă una dintre următoarele aflatoxine: B1, B2, G1, G2, M1, M2. Alimentele cu risc de contaminare pentru această categorie de micotoxine sunt: cerealele (grâu, sorg, susan, mei, cartofi dulci, porumb, orez, orz), arahidele, alunele de pământ, nucile și leguminoasele (mai ales boabele de soia) depozitate în condiții improprietăți (temp. peste 25°C și URA peste 70%).

Ochratoxinele sunt reprezentate de un grup de metaboliți secundari, cel mai important fiind **ochratoxina A**. Aceasta este produsă de numeroase mucegaiuri de depozit cum ar fi: *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ostianus*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium variable* etc.

Alimentele cu risc sunt: porumbul, fasolea uscată, boabele de cacao, soia, orz, sorg, fructele citrice, arahidele, boabele de cafea, berea, vinul, sucul de mere, condimentele, pâinea,

șuncile sărate, rinichii de porc etc. Contribuția cea mai mare în cazul ingerării de ochratoxină A, o prezintă cerealele și produsele derivate din cereale. Pentru reducerea riscului de contaminare se impune o strictă monitorizare a producției (împiedicarea contaminării cu mucegaiuri de câmp), dar mai ales a depozitării produselor agricole (contaminarea cu mucegaiuri de depozit), ochratoxina A fiind o specie frecvent întâlnită în special pe cerealele păstrate în condiții de umiditate ridicată. (Banu ș.a., 2007)

Zearalenona este produsă de genul *Fusarium* sp., în principal *Fusarium graminearum* (*Fusarium roseum* forma specializată *Giberella zeae*) și *Fusarium tricinctum*. Aceste mucegaiuri de câmp infectează culturile de grâu, ovăz, orez, hamei, susan, dar mai ales porumb. Zearalenona este doar parțial descompusă prin tratament termic. De exemplu, aprox. 60% din cantitatea de zearalenonă din făina de grâu se regăsește în pâine și aprox. 50% în tăiței. În făina degerminată și tărâțele din porumb, cantitatea de zearalenonă este redusă cu cca. 80% față de boabele de porumb, datorită faptului că cea mai mare parte din micotoxină se regăsește în germene. Extrudarea la temperaturi de 120-140°C este un procedeu de reducere semnificativă a cantității de zearalenonă din produsele alimentare. Cantități importante de reziduuri de zearalenonă se transmit prin nutrețuri în lapte și ouă (Hagler, 2001).

Fumonisinele sunt micotoxine produse de diferite specii de *Fusarium*: *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiformi*, *F. nygami*, *F. moniliforme*. Acestea pot infecta cerealele, în special porumbul și produsele derivate din cereale. Cea mai importantă în contaminarea produselor alimentare este fumonisina B1. Alimentele cu risc ridicat de contaminare sunt: porumbul, orezul, sorgul, fasolea și produsele alimentare precum, mămăliga, cerealele pentru mic dejun, berea și snacks-urile. Fumonisinele nu au fost depistate în lapte, carne, ouă. Reducerea riscului de contaminare cu fumonisine se poate face prin recoltarea la timp a porumbului, uscarea în termen de 24 de ore de la recoltare și supravegherea umidității boabelor la depozitare.

Deoxinivalenolul (Vomitoxina) este o micotoxină produsă de specii de *Fusarium*, în special *F. graminearum*. A fost detectată în grâu, hrișcă, floricele de porumb, sorg, tritcale și alte produse alimentare, inclusiv făină, pâine, cereale pentru micul dejun, paste făinoase, alimente pentru sugari. Este foarte rar prezentă în secară și orz. Această micotoxină este foarte frecventă și periculos de abundentă în grâul dur (*Triticum durum*). (Banu ș.a., 2007)

Concentrația cea mai mare de micotoxină se află în straturile exterioare ale boabelor de cereale, de aceea, în făină cantitatea de micotoxină scade. În timpul măcinării grâului s-a constatat că DON-ul este fracționat în așa fel încât concentrația din tărâțele și din făina de grâu rezultate, este mai scăzută decât cea din cerealele din care au rezultat (www.micotoxinas.com). Fiind solubil în apă, o parte considerabilă a conținutului de deoxinivalenol este eliminată prin spălarea cerealelor. Neira ș.a. (1997) au scos în evidență reducerea cu 44% a cantității de deoxinivalenol din aluat, în urma analizării produselor finale coapte. Aproximativ jumătate din acest procent se datorează procesului de fermentare a aluatului.

În România, deoxinivalenolul este prezent, în special la grâu și triticale. Grâul românesc conține în medie între 100-500 mg/kg micotoxine (1,0-5,0 ppm), adică de 10-50 de ori peste limita maximă admisă de normele NOEL (NO EFFECT LEVEL - limita până la care DON poate fi suportat fără efecte negative) - (Berca, 2011).

Toxinele T-2 și HT-2 precum și **trichotecina** sunt produse de specii de *Fusarium* (*F. tricinctum*, *F. solani*) și *Trichothecium* care provoacă aleucia toxică alimentară (**ATA**). Toxina T-2 este principalul trichotecen care se formează pe porumb mucegăit, dar poate fi identificată și pe alte cereale. Porumbul care se maturează târziu sau are un conținut mare de apă este predispus, la primul îngheț, alterării de către fusarii și acumulării de toxină. Alimente cu risc: porumbul, meiul și alte cereale mucegăite. (Banu ș.a., 2007)

Pentru toxinele T-2 și HT-2 nu s-a stabilit încă nivelul maxim admisibil în produsele alimentare, prin norme legislative.

Patulina (Clavacina sau Expansina) - este produsă de specii de *Aspergillus* și *Penicillium* cum ar fi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium expansum*, *Penicillium patulum*, dar și de *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva*. *Penicillium expansum* este îndeosebi, asociat cu o serie de fructe și legume mucegăite, în special mere putrede și smochine (Moss, 2008; Trucksess and Scott, 2008).

Patulina a fost descoperită drept contaminant în multe fructe (pere, caise, piersici și struguri), legume, cereale și alte alimente mucegăite (pâine, salamuri), cu toate acestea, sursa majoră de contaminare constituind-o merele și produsele din mere. Aceasta este stabilă, în special, în produsele procesate din mere: suc de mere, suc concentrat de mere, nectar de mere, nectar de fructe (care are ca ingredient și sucul de mere), piure de mere, compot de mere etc. S-a stabilit că acest metabolit constituie un factor de afectare a sistemului imunitar la animale (Moss, 2008).

CAP. 2. FACTORII CARE INFLUENȚEAZĂ PRODUCEREA MICOTOXINELOR

CHAPTER 2. FACTORS THAT INFLUENCE THE PRODUCTION OF MYCOTOXINS

Factorii care influențează dezvoltarea miceliilor și producerea de micotoxine sunt următorii: capacitatea genetică a mucegaiurilor, substratul nutritiv, umiditatea, pH-ul substratului, coeficientul de activitate al apei, temperatura, aerăția (compoziția atmosferei), luminozitatea, agenții antifungici, microorganismele concurente, perioada de timp de la contaminare, lucrările agrotehnice și fitosanitare etc. (Derache, 1988) Acești factori sunt evidențiați în figura nr. 2.1.

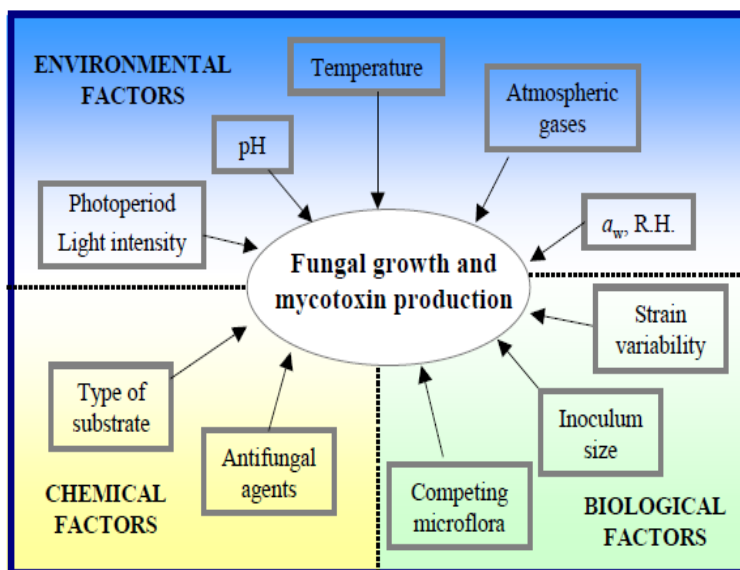


Fig. 2.1 Factorii care influențează producția de micotoxine (Belli et al., 2004)

Fig. 2.1 Factors that influence the production of mycotoxins

2.1 Factorii de mediu

Degradarea produselor agricole după recoltare este provocată de numeroși factori care influențează creșterea și dezvoltarea micromicetelor în spațiul de depozitare. Este bine cunoscut faptul că, datorită gradului ridicat de umiditate a produselor, a temperaturii atmosferice ridicate și a lipsei de aerare în timpul depozitării, pot apărea condiții favorabile pentru creșterea și dezvoltarea microorganismelor saprofite care modifică inițial calitatea

cerealelor depozitate, ducând apoi la degradarea accentuată a acestora. Căile de transfer ale patogenilor în timpul contaminării semințelor sunt:

- transferul de la sămânță la sămânță; - transferul de la sămânță la plantă; - transferul de la sol - sămânță - plantă; - transferul de la planta-mamă la sămânță (Străjeru, 2001; Plăcintă, 2007).

Evaluarea corectă a daunelor produse de ciuperci plantelor de cultură este deosebit de dificilă, datorită raporturilor complexe ce se creează între agenții patogeni, plantele de cultură și condițiile pedoclimatice. (Ulea, 2001) Starea fitosanitară a culturilor de cereale, gradul de coacere și conținutul în umiditate al semințelor, condițiile climatice din perioada de maturare, din timpul și imediat după recoltare, metoda de recoltare, condiționarea semințelor după recoltare, tipul de depozitare, vârsta semințelor în timpul păstrării, rolul dăunătorilor în înmulțirea și răspândirea micromicetelor în timpul depozitării și condițiile de mediu specifice din depozit, sunt principalii factori care condiționează apariția și dezvoltarea micromicetelor în produsele agricole. (Plăcintă, 2007) Înmulțirea, creșterea și activitatea de degradare a micromicetelor parazite și saprofite sunt favorizate de condițiile de depozitare în care trăiesc, cum ar fi: substratul nutritiv unde se dezvoltă masa de semințe; temperatura și lumina; umiditatea relativă a aerului din incinta depozitului și dintre spațiile intergranulare; ventilația aerului și compoziția atmosferei din depozit (Străjeru, 2001).

Temperatura are influență asupra speciei de mucegai, dar și asupra produselor de metabolism, procesele metabolice desfășurându-se în limite stricte și specifice de temperatură. Acest factor poate favoriza sau inhiba dezvoltarea ciupercilor, iar în anumite cazuri poate chiar să determine moartea acestora. Efectul temperaturii asupra dezvoltării microorganismelor este influențat de: starea de agregare a apei, de viteza reacțiilor enzimatică și de plasticitatea membranei celulare și a citoplasmei. Mucegaiurile se dezvoltă la temperaturi diferite, pentru fiecare specie existând un grad de temperatură optimă, la care dezvoltarea se face cu cea mai mare intensitate (tabel 2.1). Majoritatea ciupercilor sunt mezofile, cu un optim de creștere situat între 25° - 35°C. Unele specii sunt termotolerante (20°-50°C). Temperatura maximă limită de dezvoltare este de 60°- 62°C. (Ulea ș.a., 2011)

Când temperatura se ridică deasupra maximului, mucegaiul este distrus. Dacă temperatura scade sub minim (până la -19°C), mucegaiul nu este distrus, ci se găsește într-o stare de viață foarte lentă, favorabilă conservării. De regulă, temperatura optimă pentru creșterea mucegaiurilor este cuprinsă între 25°-30° C iar limita maximă este de 40°-45° C (tabelul 2.2.).

Temperaturi minime de dezvoltare a mucegaiurilor producătoare de micotoxine
Minimum temperatures for the development of mycotoxin-producing molds

Tabel 2.1

Specia de mucegai	Temperatura minimă necesară (°C)	Micotoxina produsă	Temperatura minimă necesară (°C)
<i>Aspergillus flavus</i>	10	Aflatoxine	10
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	Patulina	12
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10-12	Ochratoxina	12
<i>Fusarium roseum</i>	15	Zearalenona	10
<i>Penicillium expansum</i>	0	Patulina	0-24
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	Ochratoxina	0-24
	0	Acid penicilic	4

Plecând de la temperaturile minime necesare pentru creșterea anumitor mucegaiuri, se poate preciza că există condiții optime pentru o creștere și proliferare fungică la o valoare optimă mai mare de 0,75, o temperatură mai mare de 20°C și o umiditate a substratului de 14%. În funcție de temperatura de dezvoltare, mucegaiurile se împart în: mezofile, termofile, termotolerante și psihrofile, majoritatea fiind mezofile.

Exigențele termice pentru dezvoltarea mucegaiurilor
Thermal requirements for mold development

Tabel 2.2.

Mezofile	Temperatura
Maxim	<50°C
Minim	>0°C
Optim	15-30°C
Termofile	
Maxim	50°C
Minim	20°C
Termotolerante	
Maxim	50°C
Minim	>0°C
Optim	15-40°C
Psihrofile	
Maxim	20°C
Minim	<50°C
Optim	0-17°C

(www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

În atmosferă cu temperaturi ridicate (ex. tunelele de uscare a alimentelor tocate) se evidențiază o microfloră fungică extrem de abundentă în care domină speciile termofile sau termorezistente ca: *Aspergillus flavus* și *Aspergillus fumigatus*.

Umiditatea. Activitatea apei- reprezintă cantitatea de apă existentă în mediul ambiant și în substraturi, fiind unul din factorii importanți pentru dezvoltarea mucegaiurilor și pentru producția de micotoxine. De regulă, în atmosferă există o umiditate relativă a aerului de cca. 70-90% și prin păstrarea alimentelor, în timp, în funcție de temperatură și compoziția produsului, are loc o absorbție a vaporilor de apă din aer, instalându-se o stare de echilibru. Este știut faptul că mucegaiurile apar după o creștere accidentală a umidității. Însă, nu doar cantitatea de apă are influență ci și forma de prezentare a acesteia (liberă sau legată), sporii de mucegai având nevoie pentru germinare de apă liberă (apa din interiorul celulelor care poate fi eliminată fără a se interveni în procesele vitale). Mucegaiurile au comportament diferit, în funcție de exigența lor față de (aw) activitatea apei (tabel 2.3), acest lucru făcând ca acestea să se împartă în:

- specii xerofile la care germinarea sporilor este posibilă la o valoare a aw mai mică de 80% (în special din genul *Aspergillus repens*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*);
- specii mezofile cu o exigență la apă cuprinsă între 80-90% (*Penicillium cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium cladosporoides*);
- specii hidrofile, cu o exigență pentru apă mai mare de 90% (*Epicoccum nigrum*, *Fusarium ssp*, *Mucorales sp.*) (www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

Valori ale aw necesare pentru dezvoltarea unor mucegaiuri și pentru producția de micotoxine

Values of aw necessary for the development of some molds and for the production of mycotoxins

Tabel 2.3.

Specia de mucegai	aw	Micotoxina produsă	aw
<i>Aspergillus flavus</i>	0.78	Aflatoxine	0.83
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0.70	Aflatoxine	0.80
<i>Penicillium expansum</i>	0.85	Patulina	0.99
<i>Penicillium patulum</i>	0.83	Patulina	0.95
<i>Aspergillus clavatus</i>	0.85	Patulina	0.99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.77	Ochratoxine	0.88
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.77	Acid penicilic	0.90
<i>Penicillium cyclopium</i>	0.82	Ochratoxine	0.90
<i>Penicillium viridicatum</i>	0.83	Ochratoxine	0.90
<i>Penicillium citrinum</i>	0.80	Citrina	0.88
<i>Penicillium martensii</i>	0.79	Acid penicilic	0.99

(www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

Se observă că majoritatea mucegaiurilor se dezvoltă plecând de la valori ale a_w de 0,7, iar creșterea mucegaiurilor toxicogene se poate realiza într-un interval al a_w cuprins între 0,70-0,85.

Lumina- acțiunea acesteia depinde de specia microorganismelor. În general, se poate spune că lumina este dăunătoare mucegaiurilor, acțiunea ‘vătămătoare’ a luminii crescând odată cu scăderea luminii de undă a razelor luminoase. Din spectrul luminos cele mai dăunătoare sunt radiațiile violete, iar din spectrul invizibil, radiațiile ultraviolete cuprinse între 2300 și 2800 Å, care au o acțiune antimicrobiană netă, ale cărui efect depinde de intensitatea și durata iradierii.(Ulea ș.a., 2011) Acțiunea dăunătoare a radiațiilor ultraviolete depinde de intensitatea și durata lor de acțiune asupra mucegaiurilor, acestea putând fi împiedicate sau oprite din activitatea lor, uneori putând fi complet distrus(www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

Integritatea fizică a boabelor și învelișului produselor vegetale -reprezintă o barieră foarte eficace împotriva penetrării microorganismelor. Această eficacitate scade după recoltare, deoarece învelișul protector este eliminat sau lezat. Tegumentele intacte ale boabelor îngreunează accesul mucegaiurilor. Boabele sfărâmate sunt mai susceptibile invaziei și creșterii fungice decât boabele întregi, deoarece partea internă a bobului este cea mai vulnerabilă la acțiunea mucegaiurilor, datorită compoziției chimice a acesteia. În cazul legumelor și fructelor este foarte importantă integritatea învelișului epidermic al acestora și starea lor de prospețime, întrucât constituie factori favorizanți pentru accesul și dezvoltarea mucegaiurilor și implicit a micotoxinelor acestora. (www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

Natura substratului și nutrienții minerali -au un rol activ în dezvoltarea microorganismelor, prin asigurarea sursei de apă, de energie, de azot, săruri minerale și eventual, de oxigen. Microorganismele care se întâlnesc pe produsele alimentare sunt chimio-organotrofe și folosesc mai degrabă hidrații de carbon ca sursă de energie, decât acizii grași sau substanțele azotoase. Produsele alimentare conțin în general, toți nutrienții necesari dezvoltării microorganismelor, dar diferențele de compoziție observate au un efect selectiv asupra florei microbiene, fierul și zincul, fiind elementele cele mai importante pentru creșterea fungică. Lipsa anumitor elemente are ca rezultat o creștere fungică foarte scăzută. Mucegaiurile nu sunt exigente din punct de vedere nutrițional, ele hrănindu-se cu micro și macroelementele care există în substratul unde se dezvoltă. În general, substratul optim de dezvoltare este cel glucidic (de ex., aflatoxina este secretată în special pe amidon, iar zearalenona se formează pe un substrat celulozic).

Cerealele (porumb, grâu, orz, ovăz, secară etc.) oferă prin conținutul lor ridicat în trofine, mediul nutritiv ideal pentru multiplicarea micromicetilor și elaborarea micotoxinelor. Ele pot fi contaminate cu fungi și micotoxine atât în faza de vegetație a plantelor, cât mai ales în perioada de conservare când condițiile de recoltare și păstrare sunt favorabile germinării formelor de rezistență ale micromicetilor și multiplicării aparatului micelian. Una din cauzele principale care generează aceste neajunsuri poate fi sănătatea și

integritatea precară a semințelor, cât și neglijarea măsurilor de prevenire și combatere a principalilor agenți fitopatogeni care afectează culturile (Plăcintă, 2007).

2.2 Factorii chimici

Influența pH-ului asupra dezvoltării mucegaiurilor -are loc la trei nivele: mediul de cultură, permeabilitatea membranei și activitatea metabolică. Majoritatea ciupercilor se pot dezvolta într-o zonă de pH cu valori între 4,5-8, optimul fiind între 5,5-7,5. (Ulea ș.a., 2011) Trebuie subliniat faptul că mucegaiurile pot modifica pH-ul, folosind ca sursă acizii organici prezenți în alimente. De exemplu, la un pH cu valoare mai mare de 5, *Fusarium proliferatum* se dezvoltă în parametri normali și produce puține toxine, în timp ce la un pH mai mic de 5, creșterea este mai puțin importantă, dar producția de toxine este net superioară.

(www.scripgroup.com/afaceri/agricultura)

Potențialul de oxido-reducere (O₂/CO₂) -oxigenul poate fi procurat de către microorganisme din aer, din apă și din diferite substanțe care îl conțin. Rolul principal în nutriție și în funcționarea celulei microbiene îl are oxigenul din aer și cel din compuși organici. Majoritatea mucegaiurilor sunt aerobe și din acest motiv au nevoie de O₂ pentru reacțiile metabolice și pentru dezvoltarea lor. O lipsă parțială de O₂, condiționează creșterea mucegaiurilor, iar lipsa acestuia duce la moartea lor. O diminuare a concentrației în O₂, cât și o creștere a concentrației de CO₂, provoacă o scădere a toxicogenezei, aceasta fiind mai importantă decât creșterea. De exemplu, în cazul fumonisinei B1, în condiții de concentrații scăzute ale O₂, creșterea mucegaiului va fi redusă, consumul de glucoză va fi mare, iar producția de micotoxină va fi nulă. (www.scripgroup.com/afaceri/agricultura)

2.3 Factorii biologici

Microflora -are acțiune asupra acumulării toxinelor, existând o strânsă competiție pentru substraturi.

Aziz N.H. ș.a. (1997) au studiat efectul microflorei netoxice a porumbului în producția de aflatoxine de către *Aspergillus flavus*. Au arătat că *Tricoderma viridis* inhibă creșterea mucegaiului și reduce sau anulează producția de aflatoxină B1 chiar dacă boabele de porumb au fost sau nu sterilizate. Dacă inocularea de *Tricoderma viridis* este ulterioară inoculării lui *Aspergillus sp.*, nivelul de aflatoxină B1 se diminuează semnificativ, atingând un procent de cca. 31%.

Un efect inhibitor al microflorei spontane a fost de asemenea, demonstrat de O'Neil K. ș.a. (1996). Analizând producția de trichotecene și zearalenonă produse de *Fusarium culmorum* pe porumb, aceștia au arătat că pe boabele sterilizate prin încălzire sau prin iradiere, cantitatea de micotoxină este superioară față de cea prezentă pe boabele

nesterilizate. Această diferență apare deoarece în primul caz substratul este lipsit de microorganisme, flora spontană fiind prezentă doar în cel de al doilea caz.

Insectele -intervin indirect în producerea de micotoxine, fiind vectorii sporilor de ciuperci, prin pătrunderea în zonele interne ale boabelor de cereale prin rănille pe care le produc acestora. (Jouany et al., 2009) Insectele influențează inocularea fungică și contaminarea cu micotoxine în boabele depozitate, relația dintre insectele produselor depozitate și ciuperci fiind reciprocă. (Abbas et al., 2013) Unele specii de insecte de depozitare sunt diseminatoare de ciuperci de depozit, iar unele sunt exterminatoare de ciuperci, în timp ce, pe de altă parte, unele ciuperci de depozitare resping insectele, iar unele dintre ele secretă toxine dăunătoare creșterii și dezvoltării acestora. În timpul depozitării, insectele, datorită procesului lor metabolic, ridică temperatura masei de cereale, ducând la "focare sau puncte fierbinți", uneori ajungând până la 57°C (Mills, 1989). Aceste focare, conduc la creșterea umidității în produs, asigurând astfel condiții optime pentru creșterea fungilor.

Pande & Mehrotra (1988) au analizat probele de boabe de grâu atacate de gărgărița *Sitophilus oryzae* și au decoperit că *Aspergillus flavus* a fost cea mai frecventă specie din sistemul lor digestiv. Aceasta indică posibilitatea ca *Sitophilus oryzae* să transmită spori de ciuperci din boabele infectate la cele sănătoase.

Speciile de gărgărițe din depozite (*Sitophilus zeamais* Motsch., *Sitophilus granarius* L., *Sitophilus oryzae*) promovează creșterea și răspândirea ciupercilor în boabele depozitate, prin inoculare în timpul ovipoziției, prin activități metabolice și hrănire în stadiul de larva. (Dunkel, 1988)

La rândul său, ciupercile afectează comportamentul, creșterea și reproducerea insectelor în ecosistemul depozitului (Dunkel, 1988), care se referă direct la insectele fungivore, cum ar fi gândacul de cereale străin (*Ahasverus advena* L.) și gândacul păducel (*Typhea stercorea* L.). În caz contrar, unele ciuperci precum *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus* produc metaboliți (aflatoxina, ochratoxina, citrinina, patulina) care au rol insecticid sau inhibitor asupra dezvoltării insectelor (ex. *Tribolium confusum*) (Roberts și Yendol, 1971).

CAP. 3. PRINCIPALELE MICOTOXINE CARE CONTAMINEAZĂ ALIMENTELE ȘI LIMITELE LEGISLATIVE PRIVIND CONȚINUTUL ACESTORA ÎN PRODUSELE AGROALIMENTARE

CHAPTER 3. THE MAIN MYCOTOXINS THAT CONTAMINATE FOOD AND THE LEGISLATIVE LIMITS REGARDING THEIR CONTENT IN AGRI-FOOD PRODUCTS

Micotoxinele sunt metaboliți secundari toxici sintetizați de mucegaiuri, care pot afecta grav sănătatea omului și a animalelor. (Rotter et al., 1996) Impactul micotoxinelor în lanțul alimentar uman este o problemă importantă la nivel mondial. În general, consumatorii percep un risc mai mic provocat de micotoxine decât de la alte amenințări legate de alimente, cum ar fi pesticide, aditivi, metale grele și agenți microbieni. Acest lucru se datorează faptului că, cel puțin în țările dezvoltate, micotoxinele provoacă foarte rar focare de intoxicație acută la oameni. Acestea sunt substanțe nedorite, care nu ar trebui să fie prezente în alimente și pentru care ar fi ideală o toleranță zero. Cu toate acestea, chiar și bunele practici agricole, de depozitare și prelucrare nu pot preveni complet contaminarea și este imposibil să se realizeze un lanț alimentar cu adevărat ‘liber de micotoxine’. În consecință, cantități mici de micotoxine despre care se crede că nu sunt periculoase sunt tolerate legal. În ciuda datelor toxicologice și epidemiologice incomplete, necesare pentru a evalua pe deplin expunerea umană și riscurile pentru sănătate și pentru a stabili relațiile de cauzalitate între micotoxinele din alimente și bolile umane, gestionarea responsabilă a riscurilor duce la necesitatea luării de măsuri preventive (Kuiper-Goodman, 1995). Din aceste motive, autoritățile publice din multe țări au stabilit limite legale pentru prezența micotoxinelor în alimente.

Micotoxinele prezente în mod natural în diverse produse agroalimentare (tabel 3.1) constituie o problemă serioasă asupra siguranței alimentelor, mai ales în anumite regiuni în care condițiile climatice pot fi favorabile dezvoltării acestora, sau în care standardele din agricultură sunt precare. (Savu, 1999)

Micotoxine cu potențial toxic pentru organismele vii *Mycotoxins with toxic potential for living organisms*

Tabel 3.1.

Sursa de contaminare	Potențial de infestare	Tip de micotoxină
Cereale boabe	Infestare fungică înainte de recoltare	deoxinivalenol, toxina T-2, zearalenonă, fumonisine

Porumb boabe, sorg boabe	Infestare fungică înainte de recoltare	fumonisine
Semințe oleaginoase	Infestare fungică înainte de recoltare	alternariol, acid tenuazonic
Arahide, porumb boabe	Infestare fungică înainte de recoltare	aflatoxine
Cereale depozitate, nuci, condimente	condiții necorespunzătoare de depozitare	aflatoxine, ochratoxine
Fructe, sucuri de fructe	dezvoltarea mucegaiurilor pe fructe	patulina
Băuturi fermentate (vin, bere, cidru etc)	condiții necorespunzătoare de depozitare	patulina
Boabe de cacao/cafea	infestare fungică înainte de recoltarea boabelor	aflatoxine ochratoxina A

3.1 Contaminarea alimentelor cu aflatoxine

Aflatoxinele sunt considerate unele dintre cele mai puternice toxine naturale fiind singurele micotoxine clasificate de Agenția Internațională pentru Cancer (IARC-International Agency for Research in Cancer) în grupul 1 al substanțelor carcinogene pentru om. Toxicitatea lor depinde de factori cum ar fi vârsta, sexul, specia, starea fiziologică, calea de administrare, compoziția hranei (Castegnaro și Pfohl-Leskowicz, 1999; Robens și Richard, 1992).

Aflatoxinele sunt produși metabolici ai mucegaiurilor *Aspegillus flavus* și *Aspegillus parasiticus* fiind apte să producă următoarele aflatoxine: B1, B2, G1, G2, M1, M2. Sunt predominante în boabele de cereale depozitate care prezintă conținut mare de umiditate (fig. 3.1). Dezvoltarea mucegaiurilor producătoare de aflatoxine este favorizată de temperaturile ridicate, prin urmare fenomenul de încălzire globală poate provoca o potențială problemă legată de apariția acestora în produsele agroalimentare, în special în zonele cu climat temperat, cum e și cazul României. (Raicu și Baci, 1978).

Aflatoxina B1 este cea mai toxică, acumulându-se în țesuturile animale, în special în ficat și rinichi la vită, porc, oaie, curcani, unde poate provoca hepatita X. (Banu ș.a., 2007). În laptele de vacă se întâlnește aflatoxina M1, unul dintre metaboliții aflatoxinei B1. Vacile care consumă substraturi nutritive contaminate cu aflatoxină B1 și B2, elimină după 24 de ore, aflatoxine M1 și M2 prin lapte. Cantitatea de aflatoxină M1 nu reprezintă decât 0,6-1% din cantitatea de aflatoxină B1 ingerată de animal. (Laslo, 1995). Datorită toxicității, aceasta reprezintă un potențial pericol pentru copiii sugari, motiv pentru care, în unele țări concentrația aflatoxinei M1 în lapte și derivate nu trebuie să depășească 20 ppb. Țesutul muscular și viscerele rețin aflatoxinele sau metaboliții lor o perioadă scurtă de timp și în cantități mici, ceea ce face dificilă detectarea lor în aceste zone. (Stănescu, 1987)

Aflatoxinele sunt cunoscute ca fiind cancerigene, efectele toxice putând fi mortale în intoxicația acută. Organele afectate sunt: ficatul (produc congestii și hemoragii în intoxicația acută și steatoză hepatică în intoxicația cronică); rinichii, stomacul, colonul (produc tumori). Pot produce de asemenea, malformații congenitale și modificări genetice. Alimentele cu risc sunt: cerealele (grâu, sorg, susan, mei, cartofi dulci, porumb, orez, orz), arahidele, alunele de pământ, nucile și leguminoasele (mai ales boabele de soia) depozitate în condiții improprii (temp. peste 25C și URA peste 70%). (Brădățan, 2007)



Fig. 3.1. Boabe de grâu infestate cu *Fusarium* sp. (www.safetycer.erasmus)

Fig. 3.1 Wheat grains infested with Fusarium sp.

Având în vedere gradul mare de pericolozitate pentru organismul uman și cel animal, legislația comunitară stabilește limite maxime de aflatoxine pentru materii prime și produse alimentare, prin Regulamentul CE nr. 1881/2006 (tabel 3.2).

Nivelul de aflatoxine admis în produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006
The level of aflatoxins allowed in food products according to Reg. CE no 1881/2006

Tabel 3.2.

Nr. crt.	Produsul alimentar	Nivelul maxim admis, µg/kg		
		B1	B1+B2+G1+G2	M1
1.	Alune de pământ destinate sortării sau altor tratamente fizice, înainte de a fi consumate sau folosite ca ingrediente în produsele alimentare	8,0 (1)	15,0 (1)	-
2.	Nuci care nu fac obiectul sortării sau altui tratament fizic înainte de a fi consumate sau folosite ca ingredient în produsele alimentare	5,0 (1)	10,0 (1)	-
3.	Alune de pământ, nucii și produse procesate din alune destinate	2,0	4,0	-

	consumului uman direct sau pentru folosire ca ingredient în produsele alimentare			
4.	Fructe uscate care sunt supuse sortării sau altui tratament fizic, destinate consumului uman direct sau pentru folosire ca ingredient în produsele alimentare	5,0	10,0	-
5.	Fructe uscate și produse procesate din fructe destinate consumului uman direct sau pentru folosire ca ingredient în produse alimentare	2,0	4,0	-
6.	Toate cerealele și toate produsele derivate din cereale, inclusiv produse din cereale procesate, cu excepția produselor de la punctele 7, 10, 12	2,0	4,0	-
7.	Porumb supus sortării sau altui tratament fizic înainte de a fi consumat sau de a fi folosit ca ingredient în produsele alimentare	5,0	10,0	-
8.	Lapte crud (2) , lapte tratat termic și lapte destinat fabricării produselor pe bază de lapte	-	-	0,05
9.	Următoarele condimente: - specii de Capsicum (fruct uscat, întreg sau măcinat, inclusiv chili, cayenne și paprika) - specii de piper (fructe ca atare, inclusiv piper alb și negru) - nucșoară (Myristica fragans) - ghimbir (Zingiber officinale) - turmeric (Curcuma longa)	5,0	10,0	-
10.	Produse alimentare pe bază de cereale pentru sugari și copii mici (3,4)	0,10	-	-
11.	Formule pentru sugari și copii postîntărcare, inclusiv lapte pentru sugari și copii postîntărcare (5,6)	-	-	0,025
12.	Produse dietetice pentru scopuri medicale destinate sugarilor (7,8)	0,10	-	0,025

Notă:

- (1) nivelul maxim se raportează la partea comestibilă a alunelor și nucilor
- (2) alimentele din această categorie sunt cele definite de Reglementarea (EC) nr. 853/2004 a Parlamentului European și a Consiliului
- (3) produsele din această categorie sunt cele definite de Directiva Comisiei 96/5/EC și modificată de Directiva 2003/13/EC
- (4) nivelul maxim se raportează la substanța uscată determinată în conformitate cu Reglementarea (EC) nr. 401/2006
- (5) nivelul maxim se referă la produsele gata de utilizat ca atare sau după reconstituire conform instrucțiunilor fabricantului
- (6) produsele din această categorie sunt cele definite de Directiva Comisiei 91/321/EC privind formulele pentru sugari înainte și după înțărare, modificată de Directiva 2003/14/EC
- (7) produsele din această categorie sunt cele definite de Directiva Comisiei 1992/21/EC privind produsele dietetice pentru scopuri medicale
- (8) nivelul maxim în cazul laptelui și produselor lactate se raportează la substanța uscată determinată conform Reglementării (EC) nr. 401/2006

3.2 Contaminarea alimentelor cu ochratoxine

Ochratoxinele sunt reprezentate de un grup de metaboliți secundari, cel mai important fiind **ochratoxina A (OTA)**. Aceasta este produsă de numeroase mucegaiuri de depozit cum ar fi: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus ostianus*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium variable* etc. Producerea ochratoxinei A este favorizată dacă culturile sunt recoltate în condiții de umiditate ridicată și sunt depozitate în spații cu umezeală. Temperatura optimă pentru producerea de OTA este de 25-30 °C.

Ochratoxina A este o substanță teratogenă și carcinogenă, detectată atât în alimente de origine animală cât și vegetală. La om produce nefropatia endemică, o boală cu evoluție cronică și mortalitate ridicată, frecventă în zonele rurale și în special la femeile cu vârstă cuprinsă între 30 și 50 de ani. Această boală produce atrofierea rinichilor, leziuni ale rinichilor și ficatului, mai ales steatoză, fibroza interstițială și hialinizare glomerulară în proximitatea cortexului (Măruțoiu și Tofană, 2001). S-a constatat că în zonele în care este frecventă această boală, cerealele sunt contaminate cu ochratoxine în proporție de 8,3-13,5%, pâinea în proporție de 18,8%, iar cca. 7% din populație prezintă micotoxina în sânge, comparativ cu un lot martor. (www.mycotoxins.org)

Alimentele cu risc sunt: cereale (porumb, orez, orz, ovaz, grâu, sorg), leguminoase (soia, fasole uscată), fructele citrice, arahidele, boabele de cacao, boabele de cafea, berea, vinul, sucul de mere, sucul de struguri, condimentele (ardei roșu uscat, ardei iute pulbere, piper negru, coriandru, ghimbir, piper cayenne, curcuma, nucșoară), legume, ceai verde, stafide, fistic, smochine, castane, alimente procesate (pâinea, șuncile sărate) etc. Contribuția cea mai mare la ingerarea de ochratoxină A o prezintă cerealele și derivatele din cereale. Potrivit portalului Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), în perioada cuprinsă

între ianuarie 2016 și iunie 2019, 25 din totalul de 87 dintre notificările privind OTA au fost pentru produsele pe bază de cereale. OTA apare frecvent în cerealele pentru consum uman, îndeosebi în cele pentru micul dejun. Orezul, orzul, ovăzul și grâul sunt ingredientele cele mai contaminate (Piacentini ș.a., 2019).

Cafeaua prăjită este frecvent contaminată cu OTA, contaminarea fiind direct legată de calitatea procesării pe întregul lanț de producție a cafelei, de la cultivare la procesele de prăjire (Khaneghah ș.a., 2019).

OTA apare frecvent și în pulberea de *Capsicum*. Numai în UE, în 2017 și 2018, RASFF a raportat 41 de cazuri de contaminare a ardeilor. Dintre acestea, pentru 8 notificări au fost evidențiate depășiri ale nivelului maxim (ML) pentru aceasta micotoxină. OTA a fost anterior depistată în probe de ardei roșu (Santos ș.a., 2010), fructe de ardei uscat (Jalili și Jinap, 2012), pudră de ardei iute (Ozbey și Kabak, 2012), fulgi de ardei roșu, sos de chili (Tosun și Ozden, 2015), ardei iute și paprika (Ahn ș.a., 2010). Una dintre problemele principale care afectează condimentele este posibila apariție cumulativă cu alte micotoxine, cum ar fi aflatoxine, zearalenonă și deoxinivalenol, din cauza infecției fungice multiple (Santos și colab., 2010).

Mai multe studii au reliefat apariția OTA în infuzii și plante pentru ceai. S-a demonstrat că ciupercile toxigenice, în principal *Aspergillus niger* și *Penicillium* sp., cresc pe frunze de ceai și ierburi, inducând astfel acumularea de OTA. Rata de transfer în timpul procesului de infuzie a ceaiului a fost calculată de Malir ș.a. (2014), care a găsit o valoare medie de $34,8\% \pm 1,3\%$ pentru ceaiul verde. Carraturo și colab. (2018), au stabilit ratele de transfer pentru ceaiurile verzi și negre, cu valori cuprinse între 33% și 55%.

O serie de studii tratează apariția OTA în suplimente dietetice și în remediile tradiționale din plante de pe piața europeană (Ariño ș.a., 2007 ; Diana Di Mavungu et al., 2009 ; Santos și colab., 2010 ; Veprikova și colab., 2015). OTA poate fi găsită în suplimente alimentare obținute din cafea verde, precum și în condimente, deoarece în procedurile de extracție utilizate în mod obișnuit, izolarea materialelor vegetale contaminate nu poate fi evitată. (www.efsa.europa.eu/publications)

Pentru reducerea riscului de contaminare cu OTA, se impune o strictă monitorizare a producției (împiedicarea contaminării cu mucegaiuri de câmp), dar mai ales a depozitării produselor (contaminarea cu mucegaiuri de depozit), fiind o micotoxină frecvent întâlnită în special pe cerealele păstrate în condiții de umiditate ridicată. (Brădățan, 2007; Banu ș.a., 2007).

Conform Regulamentului CE 1831/2003, nivelul maxim de ochratoxină A în materii prime și produse alimentare este menționat în tabelul 3.3.

Nivelul maxim de ochratoxină A din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006

The maximum level of ochratoxin A in food products according to Reg. no 1881/2006

Tabel 3.3

Nr. crt.	Produsul alimentar	Nivelul maxim admis, µg/kg
1	2	3
1.	Cereale neprocesate	5,0
2.	Toate produsele derivate din cereale neprocesate, inclusiv produse din cereale procesate destinate consumului uman direct, cu excepția produselor de la punctele 9,10	3,0
3.	Fructe uscate (curmale, stafide, sultanine)	10,0
4.	Boabe de cafea prăjite și cafea prăjită mărunțită (măcinată), cu excepția cafelei solubile	5,0
5.	Cafea solubilă (instant)	10,0
6.	Vin, inclusiv vin spumant, cu excepția lichiorului de vin și vinului cu tărie alcoolică nu mai mică de 15% în volume și vin de fructe	2,0
7.	Vin aromatizat, băuturi aromatizate și produse cocktailuri pe bază de vin aromatizat	2,0
8.	Must de struguri, must de struguri concentrat ca reconstituit, nectar de struguri, must de struguri și must de struguri concentrat ca reconstituit, destinate consumului uman direct	2,0
9.	Alimente pe bază de cereale procesate și alimente pentru sugari și copii mici	0,50
10.	Alimente dietetice pentru scopuri medicale destinate sugarilor	0,50
11.	Cafea verde, fructe uscate altele decât fructele de la pct. 3, bere, cacao și produse din cacao, vinuri licoroase, produse din carne, condimente și lichioruri	-

3.3 Contaminarea alimentelor cu zearalenonă

Zearalenona este produsă de ciuperci din genul *Fusarium sp.*, în principal *Fusarium graminearum* (*Fusarium roseum*=*Giberella zeae*) și *Fusarium tricinctum*. Aceste

mucegaiuri de câmp infectează culturile de grâu, ovăz, orez, hamei, susan, dar mai ales porumb.



Fig. 3.2. Porumb infestat cu *Fusarium* sp. (www.vetonline.ro)

Fig. 3.2 Corn infested with *Fusarium* sp.

Condițiile umede și calde sunt favorabile producției de zearalenonă, cele mai mari cantități fiind produse la temperaturi sub 25°C, la variații mari ale temperaturilor zilnice și la 16% umiditate (0.97 aw). Temperatura optimă pentru creșterea *Fusarium graminearum* este de 25°C.

Zearalenona este doar parțial descompusă prin tratament termic. În acest context, aprox. 60% din cantitatea de zearalenonă din făina de grâu se regăsește în pâine și aprox. 50% în tăiței. În făina degerminată și tărâțele din porumb, cantitatea de zearalenonă este redusă cu cca. 80% față de boabele de porumb, datorită faptului că cea mai mare parte din micotoxină se regăsește în germene. Extrudarea la temperaturi de 120-140°C este un procedeu de reducere semnificativă a cantității de zearalenonă din produsele alimentare. Cantități importante de reziduuri de zearalenonă se transmit prin nutrețuri în lapte și ouă (Hagler, 2001).

Efectele toxice ale acestei micotoxine constau în tulburări de reproducție, avorturi (porci, bovine), mai ales la animalele care au consumat furaje contaminate. (Brădățan, 2007, Banu ș.a., 2007). Zearalenona nu se transmite prin lapte sau produse lactate. (Cotuna, Popescu, 2009)

Conform Regulamentului CE 1831/2003, nivelul maxim de zearalenonă din unele produse alimentare este menționat în tabelul 3.4.

**Nivelul maxim de zearalenonă din produsele alimentare conform Reg. CE nr.
1881/2006**

The maxim level of zearalenone in food products according to Reg. CE no 1881/2006

Tabel 3.4

Nr. crt.	Produsul alimentar (1)	Nivelul maxim admis, µg/kg
1.	Cereale neprocesate, altele decât porumbul (2,3)	100
2.	Porumb neprocesat (2)	200
3.	Cereale destinate consumului uman, făinuri de cereale, tărate şi alte produse finite comercializate pe piaţă pentru consum direct, cu excepţia produselor de la punctele 4,7,8	75
4.	Porumb destinat consumului uman, făină de porumb, grişuri de porumb, germeni de porumb, ulei rafinat din germeni de porumb (4)	200
5.	Pâine (inclusiv produse mici de panificaţie), paste, biscuiţi, snacks-uri şi cereale pentru mic dejun, exceptând snacks-urile de porumb şi cereale pentru mic dejun pe bază de porumb	50
6.	Snacks-uri de porumb şi cereale pentru mic dejun pe bază de porumb	50
7.	Alimente pe bază de cereale procesate (exceptând alimentele pe bază de porumb procesat) şi alimente pentru sugari şi copii mici (5,6)	20
8.	Alimente pe bază de porumb procesat pentru sugari şi copii mici (5,6)	20

Notă:

- (1) orezul şi produsele din orez nu sunt considerate cereale şi respectiv produse din cereale
- (2) nivelul maxim se aplică la cereale neprocesate puse pe piaţă pentru prima etapă de procesare. Prima etapă de procesare înseamnă orice tratament fizic sau termic, altele decât uscarea, aplicat cerealelor. Curăţirea, sortarea şi uscarea nu sunt considerate ca operaţii ce intră în prima etapă de procesare, deoarece boabele rămân intacte după curăţire şi sortare
- (3) nivelul maxim se aplică la cerealele recoltate după 2005/2006 în concordanţă cu Reglementarea Comisiei (EC) nr. 824/2000, modificată de Reglementarea (EC) nr. 1068/2005
- (4) această categorie include şi produse similare, cum ar fi semolina
- (5) produsele alimentare din această categorie sunt definite de Directiva Comisiei 95/5/EC privind alimentele pe bază de cereale destinate sugariilor şi copiilor mici
- (6) nivelul maxim se raportează la substanţa uscată, determinată în concordanţă cu Reglementarea (EC) nr. 401/2006

3.4 Contaminarea alimentelor cu fumonisine

Fumonisinele sunt micotoxine produse cu precădere de *Fusarium verticillioides* și *Fusarium proliferatum*, cea mai importantă fiind fumonisina B1 (FB1). Acestea pot infecta cerealele, în special porumbul și produsele derivate din acesta. Cantitatea relativă de FB1 care poate să apară în produsele vegetale este strâns legată de factori climatici cum ar fi: activitatea apei și temperatura. (Marin ș.a., 2010 ; Mylona ș.a., 2012) Alți factori importanți includ clasa de maturitate a hibridilor, fertilizarea cu azot, momentul semănatului, umiditatea boabelor la recoltare. (Battilani și colab., 2008 ; Pietri și Bertuzzi, 2012)

În prezent, numai FB1 și FB2 sunt luate în considerare în reglementările UE privind produsele alimentare și furaje. În general, FB1 este considerată a nu fi acut toxică la om.

Fumonisina B2 este produsă și de *Aspergillus niger* , care poate infecta strugurii, grâul și porumbul. (Frisvad ș.a., 2004) Deși datele privind apariția FB2 în stafide, must și vin sunt încă puține, s-a demonstrat că aceasta se poate corela cu apariția de ochratoxina A la produsele pe bază de struguri. (Abrunhosa ș.a., 2010).

Efectele toxice ale acestor micotoxine sunt legate de leziuni profunde ale ficatului, tractusului gastrointestinal, sistemului nervos central și pulmonilor. Această micotoxină poate produce aleucie toxică alimentară (**ATA**) care se manifestă prin următoarele simptome: senzație de arsură a gurii, traheei, esofagului, stomacului, urmată de vărsături, diaree și dureri abdominale datorate inflamării mucoasei gastrice și intestinale. În stadiul mai avansat al bolii, pot apare hemoragii pe piele, mucoasa bucală și limbă, stomac și intestin.

Fumonisinele afectează în special animalele- porcii, păsările și ecvidele, în timp ce rumegătoarele sunt mai rezistente. (Brădățan, 2007; Banu, 2007). Caii sunt specia cea mai sensibilă la această micotoxină. Studii recente arată că, în cazul cailor care sunt hrăniți cu furaje care conțin chiar și 8 ppm (considerat conținut scăzut) de fumosină B1, pot fi supuși riscului de a dezvolta boala ELEM (encefalomalacia ecvină). Semnele bolii sunt: amețeală, deplasare fără nici un țel în cerc, lovituri ale capului, pareză, ataxie, orbire, depresie și hiperexcitabilitate. (Cotuna și Popescu, 2009)

Alimentele cu risc sunt: porumbul, orezul, sorgul, fasolea și produsele alimentare precum, mămăliga, cerealele pentru mic dejun, berea și snacks-urile. Nu s-au detectat fumonisine în lapte, carne, ouă.

Reducerea riscului de contaminare cu fumonisine se poate face prin recoltarea la timp a porumbului, uscarea în 24 de ore de la recoltare și supravegherea umidității boabelor la depozitare. Fumonisinele sunt stabile termic, dar când porumbul contaminat este supus unei prelucrări termice, se observă o reducere a conținutului acestora în masa de produs. Măcinarea uscată a porumbului a evidențiat o distribuție heterogenă a fumonisinelor în diferitele părți ale bobului, cu niveluri mai ridicate în straturile exterioare și niveluri mai scăzute în părțile interioare. (Aprodu și Banu, 2015) Nivelurile sunt de obicei de două până la patru ori mai mari în germe și tărațe decât în boabele de porumb întregi. În timpul măcinării, redistribuirea duce la o concentrare puternică în granulele de porumb. (Broggi ș.a., 2002). Bryla ș.a. (2014) au studiat efectul tratamentului termic (coacerea) asupra

conținutului de fumonisine din produsele fără gluten. Rezultatele indică o reducere semnificativă de aprox. 30% a concentrației de fumonisine.

Conform Regulamentului CE 1881/2006, nivelul maxim de fumonisină în unele produse alimentare este menționat în tabelul 3.5.

**Nivelul maxim de fumonisine din produsele alimentare
conform Reg. CE nr. 1881/2006**

The maxim level of fumonisins in food products according to Reg. CE no 1881/2006

Tabel 3.5

Nr. crt.	Produsul alimentar	Nivelul maxim admis, µg/kg
1.	Porumb neprocesat (1)	2000
2.	Făină de porumb, grişuri de porumb, germeni de porumb şi ulei rafinat din germeni de porumb (2)	1000
3.	Produse alimentare pe bază de porumb destinate consumului uman direct, cu excepția celor de la punctele 2 şi 4	400
4.	Produse alimentare pe bază de porumb procesat, alimente pentru sugari şi copii mici (3,4)	200

Notă:

(1) nivelul maxim se aplică la cereale neprocesate aflate pe piață pentru prima etapă de procesare; prima etapă de procesare înseamnă orice tratament fizic sau termic, altul decât uscare, aplicat cerealelor; curățirea, sortarea și uscarea nu sunt considerate ca operații ale primei etape de procesare deoarece nu au nici o acțiune fizică asupra boabelor de cereale, acestea rămânând intacte chiar după curățare și sortare.

(2) această categorie include, de asemenea, și produse similare cum ar fi semolina.

(3) alimentele listate în această categorie sunt cele definite de Directiva Comisiei 96/5/EC cu privire la alimentele pe bază de cereale procesate, alimente pentru sugari și copii mici, modificată prin Directiva 2003/13/EC.

(4) nivelul maxim se raportează la substanța uscată determinată în concordanță cu Reglementarea (EC) nr. 401/2006.

3.5 Contaminarea alimentelor cu trichotecene (deoxinivalenol; toxina T2/HT2)

Deoxinivalenolul (Vomitoxina) aparține grupului de micotoxine numite trichotecene, fiind produsă de specii de *Fusarium sp.*, în special *Fusarium graminearum*, care apare frecvent în boabele de cereale (grâu, orz, ovăz, secară și porumb). Aceste ciuperci cresc pe cerealele din câmp, de preferință în zonele cu climat temperat, fiind frecvent întâlnite în Europa. Infecția cu *Fusarium sp.* în cultură, este dependentă de condițiile climatice, fiind favorizată de umiditatea ridicată în momentul înfloririi

(OMS, 2001). Cerealele destinate hranei și furajelor pot fi de asemenea, contaminate și în timpul depozitării.

Micotoxina a fost detectată în grâu, hrișcă, sorg, triticale, floricele de porumb și alte produse alimentare, inclusiv făină, pâine, cereale pentru micul dejun, fidea, alimente pentru sugari. Este foarte rar prezentă pe secară și orz. Foarte frecventă și periculos de abundentă este în grâul dur (*Triticum durum*). (Banu ș.a., 2007)

Concentrația cea mai mare de micotoxină de află în straturile exterioare ale boabelor de cereale, de aceea în făină cantitatea de micotoxină scade. Fiind solubilă în apă, o parte considerabilă este eliminată prin spălarea cerealelor. Neira ș.a. (1997) au scos în evidență reducerea cu 44% a cantității de deoxinivalenol din aluat în produsele finale coapte. Aproximativ jumătate din acest procent se datorează procesului de fermentare a aluatului.

În timpul măcinării grâului s-a constatat că DON -ul este fracționat în așa fel încât, concentrația din tăratele rezultate și din făina de grâu, este mai scăzută decât cea din cerealele din care au rezultat (www.micotoxins.com). DON este stabil din punct de vedere chimic și într-o oarecare măsură rezistent la prelucrarea termică, prin urmare, se găsește în alimentele pe bază de cereale) și în furaje. (Schothorst ș.a., 2005) Ingestia de către animale, de furaje puternic contaminate, poate duce la simptome acute gastro-intestinale cum ar fi: vărsăturile (emeza), refuzul hranei și diareea sângeroasă, efectele pe termen lung fiind reprimarea creșterii în greutate și anorexia. Datorită capacității sale de a induce vărsături acute la porci, deoxinivalenolului i s-a atribuit și numele de „vomitoxină”.

La oameni, toxicitatea acută a deoxinivalenolului se manifestă prin vomisme, refuzul hranei, diaree și pierderi în greutate. Poate produce necroze ale diferitelor țesuturi, ale tractului gastrointestinal sau țesutului limfatic. Studiile realizate au arătat că pot exista efecte negative asupra sistemului imunitar. (www.mycotoxins.org).

În România, deoxinivalenolul este prezent în special la grâu și triticale. Grâul românesc conține în medie între 100-500 mg/kg micotoxine (1,0-5,0 ppm), adică de 10-50 de ori peste limita maximă admisă de normele NOEL (NO EFFECT LEVEL - limita până la care DON poate fi suportat fără efecte negative) - (Berca, 2011). Conform Regulamentului CE 1881/2006, nivelul maxim de deoxinivalenol în unele produse alimentare este menționat în tabelul 3.6.

Nivelul maxim de deoxinivalenol din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006

The maximum level of deoxynivalenol in food products according to Reg. CE no 1881/2006

Tabel 3.6

Nr. crt.	Produsul alimentar	Nivelul maxim admis, µg/kg
1.	Cereale neprocesate, altele decât graul dur, ovăzul și porumbul (1)	1250
2.	Grâu dur neprocesat și ovăz (1)	1750
3.	Porumb neprocesat (1)	1750
4.	Cereale consum uman direct, făină de cereale (inclusiv făină de porumb, grișuri de porumb), tărate din produse finite comercializate pentru consum uman direct, germeni, cu excepția produselor de la punctul 7	750
5.	Pate făinoase (uscate) (2)	750
6.	Pâine (inclusiv produse de panificație mărunte), biscuiți, snacks-uri din cereale, cereale pentru mic dejun	500
7.	Alimente pe bază de cereale procesate pentru sugari și copii mici (3,4)	200

Notă:

(1) nivelul maxim se aplică la cereale neprocesate;

(2) paste uscate reprezintă pastele cu conținut de umiditate de aprox. 12%

(3) alimentele listate în această categorie sunt cele definite prin Directiva Comisiei 95/5/EC cu privire la alimentele pe bază de cereale procesate, alimente pentru sugari și copii mici, modificată de Directiva 2003/13/EC

(4) nivelul maxim se raportează la substanța uscată determinată în conformitate cu Reglementarea (EC) nr. 401/2006

Toxinele T-2 și HT-2 precum și **trichotecina** sunt produse de specii de *Fusarium* sp. (*F. tricinatum*, *F. solani*) și *Trichothecium* sp. care provoacă aleucia toxică alimentară (ATA).

Toxina T-2 este principalul trichotecen care se formează pe porumb mucegăit, dar poate fi identificată și pe alte cereale. Porumbul care se maturizează târziu sau are un conținut mare de apă este predispus alterării de către fusarii, la primul îngheț și acumulării de toxină. Producerea toxinei T-2 este favorizată de climatul moderat cald și umed. Temperatura optimă pentru producerea acesteia este de 15-35°C, iar umiditatea optimă este de 40%. Intervalul optim de temperatură pentru creșterea *Fusarium* sp. este de 25-30°C. Se dezvoltă bine în intervalul de pH 4-10.

Toxina T-2 provoacă dizenterie mortală la mamifere și are un efect de reducere a coagulabilității sângelui. Toxicitatea acesteia se manifestă prin vomisme, gastroenterită cu dizenterie, scădere în greutate și moarte. (www.contaminați naturali.ro)

Aceste micotoxine au o rezistență crescută la factorii de mediu și nu sunt distruse în timpul procesului tehnologic, fiind stabile la 120°C, moderat stabile la 180°C și se descompun la 210°C, doar dacă sunt menținute timp de 30-40 minute. De exemplu, în timpul fierberii pastelor, trichotecenele pot ieși din compoziția produsului în apa de fierbere într-o proporție considerabilă (Scott, 1991).

Toxicitatea la om constă în: febră, sângerări nazale, sângerări ale traheii, erupții hemoragice, anghină necrotică, leucopenie extremă, agranulocitoză, sepsie și modificări ale măduvei osoase.

În cazul animalelor, cele mai sensibile la această micotoxină par a fi păsările de curte la care apar leziuni ale ciocului. Astfel, păsările nu se mai hrănesc, scad în greutate, au penajul anormal, producția de ouă scade mult iar coaja ouălor este subțire. În final păsările mor. (Scott, 1991)

Alimente cu risc: porumbul, meiul și alte cereale mucegăite. (Brădățan, 2007; Banu ș.a., 2007) Pentru toxinele T-2 și HT-2 nu s-a stabilit încă nivelul maxim admisibil în produsele alimentare, prin norme legislative.

3.6 Contaminarea alimentelor cu patulină

Patulina (Clavacina sau Expansina) - este produsă de specii de *Aspergillus sp.* și *Penicillium sp.* cum ar fi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium claviforme*, *Penicillium expansum*, *Penicillium patulum*, dar și de *Byssoschlamys nivea*, *Byssoschlamys fulva*. *Penicillium expansum* este mai ales asociat cu o serie de fructe și legume mucegăite, în special mere putrede și smochine (Moss, 2008; Trucksess and Scott, 2008).



Fig. 3.3 Fructe infestate de *Penicillium sp.*(original)

Fig. 3.3 Fructs infested with *Penicillium sp.*(original)

Patulina a fost descoperită drept contaminant în multe fructe (pere, caise, piersici, căpșuni și struguri) (fig. 3.3), legume, cereale și alte alimente mucegăite (pâine, salamuri), cu toate acestea, sursa majoră de contaminare constituind-o merele și produsele din mere. Aceasta este stabilă, în special, în produsele procesate din mere: suc de mere, suc concentrat de mere, nectar de mere, nectar de fructe (care are ca ingredient și sucul de mere), piure de mere, compot de mere etc.

Fermentația alcoolică distruge patulina și, prin urmare, produsele fermentate, cum sunt cidrul de mere și cidrul de pere, nu conțin patulină. Se cunoaște faptul că acidul ascorbic determină dispariția patulinei din sucul de mere, deși condițiile optime pentru inactivare nu au fost stabilite pe deplin.

Patulina este relativ termostabilă, în mod special la pH acid. S-a dovedit că tratamentele pe termen scurt la temperaturi înalte (150°C) duc la o reducere cu 20% a concentrației de patulină. Dar, cu toate acestea, procesarea termică este insuficientă pentru a se putea asigura un produs liber de patulină.

Patulina apare preponderent în fructele mucegăite, deși prezența mucegaiului nu implică în mod obligatoriu prezența patulinei în fruct, dar indică faptul că aceasta ar putea fi prezentă. Dezvoltarea mucegaiurilor în interiorul fructelor, are drept cauză principală, atacul insectelor asupra țesuturilor sănătoase, acest fapt determinând apariția patulinei în fructul care la exterior este aparent sănătos. Patulina poate apărea în fructele lovite și după depozitarea acestora, atât în condiții ambientale cât și în condiții de atmosferă controlată, cu sau fără alterarea pulpei. Spălarea fructelor sau înlăturarea țesuturilor mucegăite, nu va duce la eliminarea patulinei prezente în fructe, întrucât această micotoxină difuzează și în țesuturile aparent sănătoase. (Ord. 163/2006 al ANSVSA)

Patulina a devenit importantă pentru procesatorii de mere, ca o metodă de monitorizare a calității sucurilor și concentratelor obținute din mere. Studiile arată că patulina poate fi găsită în special în sucul de mere (Leggott, 2000). Prin pasteurizare, este distrus *Penicillium sp.* dar nu și patulina produsă de acesta. Prezența unor cantități de patulină în sucul de mere, indică faptul că în producția de suc au fost utilizate mere mucegăite.

Această micotoxină este moderat toxică și nu se acumulează în țesuturi și organele animalelor deoarece nu este prezentă în furaje (Brădățan, 2007; Banu și colab, 2007). Acest metabolit nu a fost dovedit încă a fi cancerigen, dar a fost raportat ca fiind factor de afectare a sistemului imunitar la animale (Moss, 2008).

Conform Regulamentului CE 1831/2003, nivelul maxim de patulină în unele produse alimentare este menționat în tabelul 3.7.

Nivelul maxim de patulină din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006
The maximum level of patulin in food products according to Reg. CE no 1881/2006

Tabel 3.7

Nr. crt.	Produsul alimentar	Nivelul maxim admis, µg/kg
1.	Sucuri de fructe, sucuri de fructe concentrate după reconstituire și nectaruri de fructe (1)	50
2.	Băuturi spirtoase, cidru și alte băuturi fermentate derivate din mere sau care conțin suc de mere (2)	50
3.	Produse solide din mere, inclusiv compot de mere, piure de mere destinate consumului uman direct, cu excepția produselor alimentare menționate la punctele 4 și 5	25
4.	Suc de mere și produse solide din mere, inclusiv compot de mere și piure de mere destinate sugarilor și copiilor de vârstă mică, etichetate și vândute ca atare (3,4)	10
5.	Preparate pentru copii, altele decât cele pe bază de cereale prelucrate destinate sugarilor și copiilor de vârstă mică (4,5)	10

Notă:

(1) alimentele din această categorie sunt definite de Directiva 2001/112/EC în legătură cu sucurile de fructe și produse similare destinate consumului

(2) alimentele din această categorie sunt definite în Reglementarea Consiliului (EEC) nr. 1576/89

(3) sugari și copii conform definiției Directivei 91/321/EEC și Directivei 96/5/EC

(4) nivelul maxim se referă la produse gata de a fi folosite (comercializate ca atare sau reconstituite conform indicațiilor fabricantului)

(5) alimentele din această categorie sunt definite de Directiva Comisiei 95/5/EC privind produsele procesate pe bază de cereale pentru sugari și copii mici, modificată de Directiva 2003/13/EC

CAP. 4. SURSELE DE CONTAMINARE CU MICOTOXINE

CHAPTER 4. SOURCES OF MYCOTOXIN CONTAMINATION

Micotoxinele pot avea atât surse directe de proveniență, reprezentate de produse agricole primare: cereale, semințe oleaginoase, fructe, legume, boabe de cafea, boabe de cacao etc, cât și surse indirecte reprezentate de produse agroalimentare procesate: ulei, sucuri, băuturi fermentate, lapte, carne, ouă etc.

4.1. Sursele principale (directe)

Micotoxine în cereale -cerealele și produsele secundare conexe au o importanță unică, deoarece sunt consumate de milioane de oameni și sunt considerate, din punct de vedere nutrițional ca fiind principala sursă de carbohidrați pentru oameni și animale. Astfel, siguranța microbiologică, chimică și micotoxicologică a cerealelor este considerată deosebit de importantă atât pentru producerea de alimente, cât și pentru hrana destinată animalelor.

Cerealele sunt colonizate foarte ușor de mucegaiuri fitopatogene, deoarece oferă condiții propice de creștere pentru mucești pe câmp (tabelul 4.1), după recoltare cât și în timpul depozitării (tabelul 4.2). Ciupercile primare asociate cu boabele de cereale aparțin genurilor *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Alternaria sp.* și *Aspergillus sp.*, care sunt implicate în acumularea de micotoxine.

Micotoxine care se dezvoltă în cultura agricolă *Mycotoxins that develop in agricultural crops*

Tabel 4.1.

Denumire micotoxină	Denumire specie de mucegai	Sursă
Trichotecene	<i>Fusarium sp.</i>	Porumb, orz, grâu, ovăz
Zearalenonă	<i>Fusarium graminearum</i>	Porumb, grâu, sorg
Fumonisine	<i>Fusarium moniliforme</i>	Porumb
Aflatoxine	<i>Aspergillus flavus</i> și <i>Aspergillus parasiticus</i>	Porumb, grâu
Alcaloizi ai cornului secarei	<i>Claviceps purpurea</i>	Secară și grâu

Apariția la nivel mondial a aflatoxinelor în cereale este bine documentată, contaminarea majoră apărând în țările care au un climat cu umiditate ridicată și/sau

temperaturi mai ridicate. (Smith, 1997) Dintre cereale, porumbul este cel mai frecvent contaminat de aflatoxine, întrucât sorgul, orezul, orzul și grâul sunt mai puțin sensibile. La depozitarea cerealelor, a produselor de măcină și a celor de panificație apare, în anumite condiții, o microfloră în componența căreia se găsesc numeroși fungi Astfel, în timpul depozitării acestora, mucegaiurile se înmulțesc atunci când umiditatea relativă a aerului este de 80-85%, iar temperatura este ridicată (peste 25 °C). Produsul atacat devine, la rândul său, o sursă de infecție, iar toxina formată se acumulează. (Park et al, 2002)

Micotoxine care se dezvoltă la depozitare *Mycotoxins that develop during storage*

Tabel 4.2.

Denumire micotoxină	Denumire specie de mucegai	Sursă
Ochratoxine	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Porumb, orz, grâu
Citrinină	<i>Penicillium citrinum</i>	Orz, secară, ovăz, porumb
Sterigmatocistină	<i>Aspergillus versicolor</i>	Grâu
Aflatoxine	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Porumb, sorg, semințe oleaginoase

Prezența aflatoxinelor a fost evidențiată în pâine și produse de panificație, în crupele de porumb și diferite tipuri de pâine dietetică. Cercetările efectuate, au stabilit că 5-7% din probele de grâu, secară și orz, după 2 luni de la depozitare, conțineau deja micotoxine, predominantă fiind ochratoxina A, care a fost determinată în concentrații mai ridicate.

Toxinele produse de ciupercile *Fusarium sp.* care cresc pe cereale reprezintă o îngrijorare serioasă. Climatele temperate sunt asociate cu dezvoltarea *Fusarium sp.* în cereale, iar pentru dezvoltarea acestor ciuperci sunt necesare temperaturi mai scăzute, în comparație cu *Aspergillus sp.* (Placintă ș.a., 1999). Cea mai importantă și cea mai mare familie de fusariotoxine o reprezintă trichothecenele, care sunt formate din mai mulți compuși împărțiți în patru subgrupe, tipurile A și B fiind cele mai semnificative (D'Mello ș.a., 1997). Trichothecenele de tip A includ toxina T-2, toxina HT2, neosolaniolul (NEO) și diacetoxiscirpenolul (DAS), în timp ce grupa B include deoxinivalenolul (DON sau vomitoxina) și derivații săi 3-acetil și 15-acetil (3-ADON și 15-ADON, respectiv), nivalenol (NIV) și fusarenon X. Trichothecenele de tip A predomină în culturile de *Fusarium sporotrichioides* și, de asemenea, în *Fusarium poae*, în timp ce trichothecenele de tip B apar mai ales în cultura *Fusarium culmorum* și *Fusarium graminearum*.

Siguranța cerealelor este strâns legată de apariția trichotecenelor, așa cum sunt rezumate de Scott (1989) și Yoshizawa (1991). În Asia au fost raportate numeroase focare de boală umană care implică greață, vărsături, tulburări gastro-intestinale, amețeli, diaree și dureri de cap, care au fost atribuite consumului de cereale contaminate cu specii de *Fusarium* sp. și, mai recent, de prezența deoxinivalenolului la concentrații de 3300 $\mu\text{g/kg}$ în boabele pentru consum uman. (OMS, 2002). Apariția trichotecenelor în cereale, în special în porumb, constituie o problemă la nivel mondial, atât pentru țările puternic industrializate, cum ar fi Canada, Japonia, SUA, Germania, Norvegia etc. cât și pentru țările în curs de dezvoltare, cum ar fi Africa de Sud, India, Vietnam etc.

Zearalenona este o toxină estrogenică importantă, care deseori co-contaminează cerealele împreună cu trichotecenele și moniliformina. Moniliformina este, de asemenea, sintetizată de *Fusarium oxysporum*, care este în plus o sursă recunoscută de micotoxine. Apariția fumonisinei este monitorizată continuu și numeroase lucrări raportează apariția naturală în principal la porumb (Marasas, 1995).

Comitetul comun de experți FAO / OMS a stabilit pentru deoxinivalenol o doză maximă tolerabilă provizorie (PMTDI) de 1 $\mu\text{g/kg}$ corp și un PMTDI de grup de 0,06 $\mu\text{g/kg}$ corp pentru toxina T-2 și toxina HT-2, aceste date fiind disponibile numai pentru regiunea europeană (JECFA, 2001).

Într-un studiu realizat în Olanda, Pieters ș.a. (2002) au subliniat că în perioada septembrie 1998-ianuarie 2000, din cauza concentrației mari de deoxinivalenol în grâu, aportul dietetic de deoxinivalenol a depășit TDI-ul provizoriu, în special la copii, astfel existând posibilitatea de apariție a efectelor nocive asupra sănătății.

În Franța, Leblanc ș.a. (2002) au arătat faptul că, consumatorii de cantități mari de cereale produse organic, pot depăși PTDI (aport zilnic tolerabil provizoriu) pentru deoxinivalenol, pe durata vieții lor.

Foarte recent, Schothorst și van Egmond (2004) au prezentat rezultatele subcomisiei SCOOP (Comisia de cooperare științifică pentru problematici referitoare la alimente) în urma analizei trichotecenelor. În ciuda lipsei semnificative de date privind consumul din unele țări și a informațiilor reduse cu privire la alimentele pentru copii, autorii au subliniat că:

- deși porumbul a prezentat cel mai ridicat nivel de contaminare cu trichotecene, grâul și produsele care conțin grâu (cum ar fi pâinea și paste de făinoase) reprezintă sursa majoră de aport alimentar;
- aporturile medii generale pentru deoxinivalenol sunt sub TDI (aportul zilnic tolerabil), deși pentru copiii mici, aportul mediu este uneori foarte apropiat de TDI;
- aporturile de nivalenol sunt cu mult sub TDI;
- aporturile de toxine T-2 și HT-2 sunt, în majoritatea cazurilor, peste TDI.

Porumbul poate conține trei micotoxine importante:

- aflatoxinele, produse de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus*;
- deoxinivalenolul, produs de *Fusarium graminearum* sp.;
- fumonisinele, produse de *Fusarium verticillioides* și *Fusarium proliferatum*.

Conform datelor furnizate de sistemul rapid de alertă pentru alimente și furaje din Uniunea Europeană (RASFF), prezența aflatoxinelor și fumonisinei a fost identificată în mai multe loturi de boabe de porumb convențional față de cel obținut din cultură organică. În schimb, în boabele porumbului Bt (care este aprobat să fie cultivat în UE), posesor al transgenei care îi conferă rezistență la atacul sfredelitorului european al tulpinilor (*Ostrinia nubilalis*), nu s-a semnalat prezența acestor micotoxine.

Rezultatele analizelor efectuate în România, în anii 2008 și 2009, au pus în evidență prezența micotoxinelor în probele de porumb analizate, indiferent de sistemul de cultură utilizat, însă valorile obținute au fost mai mici decât limita maximă admisă de legislație. (www.dekalb.ro)

Micotoxine în semințele oleaginoase -semințele oleaginoase și în special *arahidele* sunt ușor atacate de mucegaiuri, inclusiv de *Aspergillus flavus*, cu formare de aflatoxine. Mucegaiul se poate dezvolta ocazional la suprafața cojii, putându-se infiltra pe diferite căi în interior și înmulțindu-se în spațiul dintre cele două cotiledoane. Micotoxinele produse de mucegaiuri se dezvoltă în tot bobul. Momentele critice ale invadării semințelor de către mucegai sunt recoltarea și depozitarea. În cazul recoltării, o influență determinantă o reprezintă condițiile de climă, la care se adaugă modul de condiționare imediat după recoltare, înainte de depozitare. (Tofană M., 2011)

În S.U.A s-au efectuat studii aprofundate privind posibilitățile de prevenire a acumulării aflatoxinelor pe arahide. Păstrarea arahidelor în condiții de ventilație forțată nu numai că nu reduce conținutul de aflatoxine, dar favorizează sinteza lor. În mod obișnuit, cantitatea de aflatoxine din ulei reprezintă 10% din cea existentă în boabe, respectiv, 50-250 ppb, ceea ce nu constituie un pericol toxicologic prea mare. Înainte de presare-extracție, arahidele sunt supuse operației de prăjire. Cercetările au pus în evidență că în acest caz are loc o reducere a toxinei în funcție de conținutul său inițial, de tipul de toxină și modul cum se realizează prăjirea. La arahidele prăjite, cu un conținut inițial de 1500 ppb, reducerea a fost de 70% pentru aflatoxina B1 și 47% pentru aflatoxina B2. (www.pdfcoffee.com/proiect-micotoxine)

Pe arahide se poate dezvolta și *Fusarium tricinctum* care secretă trichotecene.

Semințele de floarea-soarelui reprezintă și ele un mediu propice pentru dezvoltarea aflatoxinelor. Rafinarea uleiului reduce substanțial din conținutul de aflatoxine, deoarece la tratarea cu alcali se formează săruri solubile, care sunt apoi ușor eliminate prin tratarea cu pământ decolorant. S-a remarcat apariția aflatoxinelor în semințele oleaginoase, deoarece aceste culturi sunt considerate un substrat excelent pentru sinteza și acumularea de micotoxine produse de mucegaiurile produse de *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus*. (Hesseltine ș.a., 1966) Mai multe semințe oleaginoase sunt utilizate ca înlocuitori ai untului de cacao, acest fapt reprezentând un risc grav, deoarece multe produse procesate pe bază de cacao sunt vizate pentru consum de către copii și sugari.

În 1981, în vestul Africii au fost analizate 21 de probe comerciale de arahide provenite din diferite țări. Rezultatele au fost considerate satisfăcătoare, deoarece valorile înregistrate de micotoxine au fost foarte scăzute (≤ 5 ppb în 86% din probe). Cele mai

contaminate produse au fost arahidele din Brazilia iar *Aspergillus parasiticus* izolat din acestea a fost în măsură să producă > 1100 pg / kg de aflatoxină B1 (Kershaw, 1982).

Recent, Begum și Samajpati (2000) au investigat apariția micotoxinelor în secară, muștar, soia și alune. Toate probele au fost colectate de pe piețele locale din Calcutta (India). Un total de 195 de fungi potențial toxigenici au fost izolați din opt probe diferite de semințe oleaginoase, iar 14 dintre acestea s-au dovedit a fi în măsură să sintetizeze aflatoxina B1 sau sterigmatocistina. (Begum și Samajpati, 2000)

Micotoxine în fructe, legume și sucuri -fructele și legumele sunt o parte importantă a unei diete echilibrate, dar pot fi colonizate ușor de mucegaiuri care pot sintetiza diferite micotoxine (Drusch și Ragab, 2003). Astfel, în *morcovi* s-au pus în evidență aflatoxine ca urmare a dezvoltării ciupercii *Aspergillus parasiticus*. Speciile *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus* se dezvoltă pe suprafața *citricelor*, formând aflatoxine B1 și G1, care trec apoi în sucul obținut de la aceste fructe. În merele care prezentau zone de putrezire s-a decelat până la 25000 μg/kg patulină, iar în 9 din 23 de sucuri de mere analizate s-au determinat 80000 μg/kg. În cantități mult mai mici s-a găsit patulina, în sucurile de pere, gutui și struguri. (Andersen ș.a, 2004)

Pe fructele uscate se pot forma aflatoxine, ordinea frecvenței fiind caise>smochine>ananas. Patulina a fost determinată și în *gemuri*, deoarece zahărul exercită un efect de protecție asupra micotoxinelor.

Comitetul comun de experți FAO/OMS pentru aditivii alimentari a instituit pentru patulină un PMTDI (doză maximă tolerabilă provizorie) de 0,4 pg/kg corp/zi (JECFA, 2001). În raportul recent privind evaluarea aportului dietetic de patuline de la grupul de lucru expert european (www.efsa.europa.eu/publications), s-a ajuns la concluzia că expunerea pare a fi mult sub valoarea indicată de JECFA.

În sucul de fructe, o importantă micotoxină este *acidul asoclamicic*, produs de *Byssoschlamys fulva* în conservele din fructe pasteurizate (Delage ș.a., 2003). Acidul asoclamicic este acumulat și în sucurile de prune, struguri și ananas, dar este mai puțin important în sucurile de mere, portocale și roșii (Samson ș.a., 1996).

O altă micotoxină importantă este *citrinina* produsă de *Penicillium expansum* în sucul de mere și într-o măsură mai mică în sucurile de struguri. Ochratoxina A, biosintetizată de *Aspergillus carbonarius* poate constitui un risc important pentru sucul de mere și struguri. (Vinas ș.a., 1993)

Patulina este considerată cea mai importantă micotoxină din sucurile de fructe și este produsă de mai multe specii de ciuperci, inclusiv *Byssoschlamys fulva*, *Byssoschlamys nivea* și *Penicillium expansum*, acesta din urmă fiind principalul microorganism care produce patuline (Frisvad și Thrane, 1996). Patulina a fost studiată pe scară largă în sucurile de fructe (Mortimer ș.a., 1985; Larsen ș.a., 1998), în special în sucul de mere (Scott ș.a., 1972; Mortimer ș.a., 1985). Apariția patulinei în sucurile de fructe este legată de mai mulți factori, cum ar fi temperatura și activitatea apei sau tratamentele tehnologice în timpul transformării fructelor, așa cum este descris de Jackson ș.a. (2003). În plus, practicile agronomice în cultivarea fructelor și producția de sucuri au un impact mare asupra apariției patulinei în

sucurile de fructe (Martins ș.a., 2002). Multe grupuri de cercetare au recomandat că produsele din mere destinate consumului uman să nu conțină patulină care depășește 50 mg/l. Patulina este distrusă parțial prin procesul de fermentare în timpul producției de cidru (Ough și Corison, 1980).

Bananele pot fi contaminate cu micotoxine produse de *Fusarium sp.*, acestea fiind invadate, după recoltare, de diferite specii fungice care produc „putregaiul coroanei” (Ogundero, 1987). S-a descoperit că izolatele moniliforme produc două potențiale micotoxine: toxina T-2 și zearalenona (Chakrabarti și Ghosal, 1986).

Shenasi și colaboratorii au examinat 25 de varietăți de curmale (*Phoenix dactylifera*) în diferite stadii de maturare, pentru determinarea aflatoxinelor (*Aspergillus spp.*). Eșantioanele au fost examinate atât în stare proaspătă, cât și în condiții de depozitare simulate cu umiditate ridicată. Aflatoxinele au fost detectate în 12% din probe, iar *Aspergillus sp.* a fost detectat la 40% dintre soiurile examinate (Shenasi ș.a., 2002).

Micotoxine în cafea și cacao -în boabele de cafea verde mucegăită s-a identificat *Aspergillus ochraceus* și implicit, ochratoxina A. Cu o frecvență mai mică s-a izolat *Aspergillus flavus*, producător de aflatoxine și *Aspergillus versicolor*, producător de sterigmatocistine. Prin prăjirea boabelor de cafea, o mare parte dintre micotoxine (70-80%) sunt distruse.

În boabele de cacao s-a identificat *Aspergillus parasiticus*, producător de aflatoxine. În probele de cacao din Trinidad și Malaysia s-a determinat un conținut în aflatoxine de 28-65 μg/kg. (www.scripgroup.com/afaceri/agricultura)

Cafeaua poate conține ochratoxina A produsă de *Aspergillus ochraceus* sau *Aspergillus carbonarius*. Studiile efectuate în Brazilia au arătat că creșterea mucegaiului și producția de ochratoxina A apar numai în timpul uscării boabelor de cafea verde, iar dacă uscarea este rapidă și eficientă, această micotoxină nu va mai fi produsă.

În mod frecvent, ochratoxina A a fost găsită în cafeaua verde, dar există încă o anumită incertitudine în ce măsură aceasta este degradată în timpul procesului de prăjire și este transmisă mai departe, de la cafeaua prăjită la cafeaua preparată. Reducerile cauzate de prăjire au variat, dar principala sursă de variație a fost nivelul scăzut de ochratoxină A (în general <10 μg / kg) în cafeaua verde. Rapoartele au prezentat, de obicei, rate mari de reducere a ochratoxinei A, cuprinse între 30 și 90%. Decafeinizarea pare a fi un proces eficient, ceea ce duce la diminuarea cu 92% a acestei micotoxine în boabele de cafea. În timpul fabricării cafelei solubile, aproape 80% din ochratoxina A prezintă inițial în cafeaua prăjită și măcinată s-a dovedit a fi transferată ulterior în cafeaua preparată. (Van der Stegen ș.a., 2001)

Multe studii facute pe cafeaua prăjită au demonstrat că incidența ochratoxinei A este în general scăzută și că nivelurile care depășesc 5 μg/kg sunt foarte rare (Levi ș.a., 1974).

Datele recent obținute în Germania, Marea Britanie și Elveția indică faptul că, cafeaua pe piața europeană, are un conținut mediu de ochratoxina A de aproximativ 0,8 μg/kg. Pe baza datelor disponibile privind nivelurile de contaminare cu ochratoxina A și despre consumul mediu al categoriilor de alimente, s-a calculat că, cafeaua a contribuit cu

2-3 ng/kg, în timp ce cerealele și vinul au contribuit cu aproximativ 25 și 10 ng/kg greutate corporală pe săptămână, respectiv, până la consumul mediu (OMS, 2001).

Cacao este un produs foarte important în economia mai multor țări precum Cote d'Ivoire, Ghana, Camerun, Grenada și Republica Dominicană. (Harrison, 2003) Boabele de cacao sunt sursa de pudră de cacao, un ingredient comun în mai multe tipuri de alimente, prăjituri, biscuiți, mâncare pentru bebeluși, înghețată și dulciuri. În toate aceste regiuni tropicale, condițiile meteorologice și agronomice sunt favorabile creșterii mucegaiului, în principal *Penicillium spp.* și, prin urmare, biosinteza ochratoxinei A este inerentă. Creșterea mucegaiului se poate produce atât pe păstaia de cacao, în timpul fermentației și uscării, cât și în timpul transportului și depozitării, atunci când conținutul de umiditate al boabelor este mare. Deoarece regiunile în care se cultivă cacao nu sunt situate în imediata apropiere a instalațiilor de prelucrare, termenele de livrare sunt lungi și prin urmare, este favorizată colonizarea și creșterea mucegaiului pe boabele de cacao. Un studiu inițial al ochratoxinei A în cacao a descoperit că aceasta este prezentă la niveluri detectabile, în 67% din probele analizate. Ochratoxina A s-a găsit la niveluri mai scăzute în untul de cacao decât în fracția de nonfat (pulbere) (Beckett, 1994).

În 1998, a fost efectuat un sondaj pentru evaluarea expunerii consumatorilor din Marea Britanie la ochratoxina A prin consumul pudrei de cacao și ciocolată. Contaminarea cu ochratoxina A în batoanele de ciocolată și pudra de cacao a fost în general scăzută, deși această micotoxină a fost detectată în toate cele 20 de probe de pulbere de cacao analizate și în trei din cele patru tipuri de batoane de ciocolată luate în studiu. Având în vedere probele de ciocolată, 75% din probe au fost pozitive pentru ochratoxina A, dar la niveluri scăzute. Se concluzionează că există prea puține motive de îngrijorare cu privire la nivelul de ochratoxina A în cacao și ciocolată. (MAFF, 1999)

Micotoxine în băuturi fermentate -aflatoxinele au fost determinate în diferite băuturi alcoolice, fiind detectate mai frecvent **în cidru**, într-o proporție semnificativă (91,6%).

Aproximativ 5-10% din aflatoxinele B1, B2, G1 și G2 existente în malț, se vor regăsi ulterior în bere, în cazul utilizării orzului mucegaiat la fabricarea berii.

Vinul, sucul de struguri și produsele din struguri sunt alimente contaminate frecvent de ochratoxina A. Un sondaj asupra a 133 de probe de vinuri provenite din Elveția a arătat o concentrație mai mare de ochratoxina A la vinurile roșii decât la vinurile albe sau roze. (Zimmerli și Dick, 1996)

După prima detectare a ochratoxinei A în vin, au fost efectuate mai multe sondaje, în principal în Europa. Sondajul realizat de Pietri și colab. (2001) a confirmat că regiunea geografică de origine a avut o influență puternică asupra contaminării cu ochratoxina A, atât pentru vinurile roșii, cât și pentru cele de desert. Concentrații mari de OTA au fost găsite în vinurile produse în sudul Italiei, în timp ce probele provenite din centrul și nordul Italiei, au avut un grad de contaminare redus. Este clar că diferența de latitudine (paralela de la 46° la 36°) și diferențele climatice, au influențat contaminarea strugurilor cu mucegaiuri și apariția OTA în vinuri.

În mod similar, Stefanaki ș.a. (2003) au observat o tendință de creștere a contaminării cu ochratoxina A pentru vinurile roșii, din nordul până în sudul Greciei, indicând că vinurile roșii de masă au concentrații semnificativ mai mari de ochratoxina A decât vinurile îmbuteliate de calitate superioară.

Ochratoxina A poate contamina nu numai vinul, ci și alte produse din struguri. Zimmerli și Dick (1996) au analizat conținutul de ochratoxina A a **sucurilor de struguri** comerciale, roșii și albe. Probele de suc de struguri albi au prezentat conținut mai mic de OTA față de cele roșii. În perioada 1995-1998, multe probe de suc de struguri au fost analizate în Germania, constatându-se o prezență semnificativă a ochratoxinei A în sucurile de struguri roșii față de cele obținute din struguri albi. (Wolff ș.a., 1997)

Oțetul este un produs care poate avea conținut de ochratoxina A. Majerus ș.a.. (2000) a găsit micotoxina în 50% din totalul probelor de oțet din vin analizate, probele de oțet balsamic prezentând un nivel mai ridicat de contaminare. Markaki și colab. (2001) a analizat probe de oțet balsamic și au constatat că 25% dintre acestea au prezentat un nivel ridicat de contaminare.

Berea poate fi contaminată de asemenea, de o serie de micotoxine, deoarece orzul și alte cereale folosite la producerea berii, constituie substraturi bune pentru creșterea multor ciuperci toxigenice. Scott (1996) a revizuit datele privind contaminarea berii până în anul 1996, evidențiind următoarele:

- incidența ridicată și concentrațiile de aflatoxine și zearalenonă în berile locale obținute în Africa ;
- lipsa detectării aflatoxinelor și a zearalenonei în berile europene;
- detectarea sporadică de ochratoxina A; incidența ridicată a deoxinivalenolului în berile canadiene și europene, în special în berile germane;
- apariția limitată a fumonisinei B1 și B2 în conținutul berii.

Din 1996 s-au efectuat numeroase sondaje privind contaminarea cu micotoxine a berilor produse în întreaga lume, din diferite cereale și în diferite condiții de fabricare. Tangni ș.a. (2002) au analizat conținutul de ochratoxina A în 62 de beri belgiene și 20 de beri importate din Danemarca, Franța, Germania, Irlanda, Mexic, Olanda și Scoția. Nici una dintre aceste beri nu a depășit limita propusă de UE de 20 μg/l. Cu toate acestea, ochratoxina A a fost detectată la 60 de beri belgiene și la toate berile provenite din import, nivelurile medii de contaminare fiind scăzute.

Schothorst și Jekel (2003) au analizat conținutul de micotoxine din berea de pe piața olandeză, constatând prezența deoxinivalenolului peste limita de cuantificare (25 ng /l), în așa-numitele beri de fermentare de top.

În Italia, Visconti ș.a. (2000), au analizat conținutul de ochratoxina A în eșantioane de beri autohtone și din import și au găsit o incidență de contaminare de 50%, însă cu nivel sub LMA, fără o diferență substanțială între tipurile de bere.

Torres ș.a. (1998) au descoperit că fumonisina B1 s-a depistat la un procent de 43,8% din totalul de 32 sortimente de bere spaniolă analizate, inclusiv în unele beri nealcoolice, intervalul de contaminare fiind destul de ridicat.

Molto ș.a. (2000) au observat că singura micotoxină detectată în berea argentiniană a fost deoxinivalenolul, acesta fiind prezent în 44% din probe, 18% dintre acestea prezentând un nivel de contaminare mai mare de 20 µg/l.

Din aceste date se pot trage următoarele concluzii: cu câteva excepții, s-au înregistrat în general, niveluri scăzute de contaminare, existând o variabilitate mare în ceea ce privește gradul de contaminare cu diferite tipuri de micotoxine. Condițiile climatice și sursele de cereale utilizate la fabricarea berii sunt factorii decisivi care favorizează în mod selectiv creșterea unui anumit tip de mucegai, ceea ce explică incidența geografică clară. (www.academia.edu)

4.2. Sursele secundare (indirecte) de contaminare

În general, accesul micotoxinelor în organism se face prin intermediul alimentelor contaminate, dar mai poate avea loc și pe calea aerului sau prin contact direct cu pielea. Majoritatea micotoxinelor sunt rezistente la temperaturi ridicate (coacere, fierbere, prăjire), multe toxine rezistă și la procesarea industrială a alimentelor, de aceea pentru a avea alimente libere de micotoxine trebuie analizată în mod riguros, materia primă care este utilizată la obținerea acestora (ex: cereale, legume, fructe, lapte, carne etc).

Uniunea Europeană consideră că datorită reziduurilor de input-uri, îndeosebi de nitrați și pesticide, siguranța alimentară a cetățenilor este periclitată, incidența cancerului, a bolilor cardiace și alimentare fiind prea mare, iar tratamentele mult prea scumpe. În consecință, s-a dispus reducerea nivelului recoltelor sub nivelul de forțare a limitelor biologice ale soiurilor de plante cultivate. Acest lucru se face prin introducerea bunelor practici în agricultură și reducerea input-urilor convenționale periculoase. (www.eufic.org)

În România, specialiștii consideră că în apariția incidenței cancerului, micotoxinele ocupă locul doi după consumul de tutun. Foarte periculoasă este însă, lipsa de cunoaștere a fenomenului și ignorarea lui în plan politic și social. În zona rurală, procesul de degradare a cerealelor depozitate în mod necorespunzător, poate avea loc în depozite improvizate, improprii stocării, cerealele devenind o masă brună, toxică, impregnată cu hife ale ciupercilor micotoxice. Consumarea acestora de către animale duce la înlesnirea trecerii rapide a toxinelor în *lapte, ouă și carne*, cu accesul facil în cadrul lanțului alimentar și implicit, cu producerea de intoxicații indirecte la oameni. Ficatul este primul organ care recepționează toxinele și încearcă să le degradeze. La acumularea de cantități mari de micotoxine, mitoza încetează, celulele nu se mai înmulțesc, apar celule canceroase care proliferază și individul devine în mod sigur susceptibil la boli, uneori putând surveni decese fără a se afla cu exactitate cauza acestora. (www.ibna.ro/pdf/brosuri/micotoxine-norme-alimentare)

Rezolvarea problemelor poate fi făcută prin practicarea bunelor practici în agricultură, care să asigure salubritatea produselor agricole la nivelul la care nu mai are loc producerea de micotoxine, nu se mai transmit animalelor și, în mod implicit, nici oamenilor.

Măsurile care se impun se referă atât la condițiile de cultivare, dar și la aplicarea de modalități corecte de depozitare a produselor agricole. Formarea micotoxinelor în câmp este influențată puternic de: sistemul de lucrări ale solului, sistemul de fertilizare, asolamentul utilizat, alegerea soiurilor (ex:soiurile cu paiul scurt produc mai multe micotoxine), tratamentele fitosanitare aplicate. La depozitare, un rol important îl are raportul temperatură/umiditate și durata depozitării produselor agricole. (www.toxicologiealimentară.ro)

Experții consideră că cea mai eficientă metodă de evitare a urmărilor micotoxicozelor este prevenirea infestării cu fungi a culturilor agricole și supravegherea, în mod deosebit a produselor alimentare cu risc ridicat de contaminare micotoxică (cereale, nuci etc). Pentru aceasta, se impune aplicarea a numeroase procedee de analiză biochimică a alimentelor cu scopul depistării încărcăturii micotoxice din produsele alimentare.

CAP. 5. PREVENȚIA ȘI CONTROLUL CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE

CHAPTER 5. PREVENTION AND CONTROL OF MYCOTOXIN CONTAMINATION

Metodele de prevenție care se pot aplica în vederea evitării contaminării micotoxice sunt mai simple din punct de vedere tehnic și sunt preferabile metodelor de decontaminare. Măsurile de recoltare a produselor agricole, aplicate în conformitate cu principiile bunelor practici agricole (ex: cultivarea soiurilor rezistente, a varietăților noi, rotația culturilor, gestionarea bolilor plantelor, controlul dăunătorilor etc), precum și măsurile de post-recoltare (ex: transportul și depozitarea adecvate) dețin un rol important în diminuarea contaminării cu micotoxine. Cu toate acestea, aceste măsuri nu pot garanta absența completă a micotoxinelor în produsele vegetale, tehnicile de procesare a alimentelor constituind măsuri suplimentare de reducere a nivelului micotoxinelor în produsele alimentare. Tehnologiile de procesare a alimentelor sunt necesare atât pentru a diminua contaminarea cu micotoxine, cât și pentru a menține compoziția nutrițională și calitatea alimentelor. (www.rompan.ro)

Aceste tehnici ar include aplicarea metodelor fizice, chimice, enzimatică și microbiene. În prezent, ca metode majoritare de diminuare a micotoxinelor, sunt utilizate tratamentele fizice, în producția de alimente la nivelul Comunității Europene.

5.1. Metode preventive

5.1.1. Strategii de prerecoltare

Rotația culturilor - constituie în general un mod eficace de a reduce riscul contaminării cu micotoxine, în funcție de sursa fungică și specia cultivată. Metoda este foarte eficientă pentru a reduce contaminarea cerealelor de iarnă. Culturile precum cartofii, trifoiul, lucerna sau alte leguminoase, care nu sunt contaminate de specii de *Fusarium sp.* (care afectează în general cerealele), trebuie să fie cultivate prin rotație pentru a reduce contaminarea substratului de cultură. Cerealele cu bobul mic, cum ar fi grâul, trebuie să fie semănate numai după o evaluare a riscurilor de infecție cu mucegaiuri. Trebuie avută în vedere și planta premergătoare precum și eliminarea cât mai rapidă a terenurilor de resturile vegetale.

Alegerea speciilor sau a hibrizilor -se vor alege hibrizi sau specii mai bine adaptate la natura solului, sau la condițiile climatice și la practicile agricole uzuale. Acest lucru va reduce stresul plantelor iar cultura respectivă va fi mai protejată împotriva unei eventuale

infecții fungice. Se vor utiliza specii de semințe selecționate pentru rezistența la mucegaiuri sau insecte parazite, după analiza sursei de infestare.(www.rompan.ro/safetycer-project)

Planificarea culturilor – se realizează pentru a se evita condițiile climatice care prelungesc coacerea în câmp, înainte de recoltare. Uscarea cerealelor trebuie considerată ca fiind un factor de risc în cazul contaminării cu mucegaiuri. Trebuie evitată densitatea mare a plantelor în cultură, din acest motiv recomandându-se respectarea distanțelor optime dintre rânduri și între plante pe rând.

Gestionarea solului și a culturilor - la cultivare, trebuie să se țină cont de riscurile eroziunii și de buna gestionare a solului. Toate practicile agricole distrug sau ascund reziduurile culturilor infectate, aratul permițând reducerea contaminării culturii următoare cu mucegaiuri. Solul trebuie lucrat astfel încât să se obțină o arie de semănat grosieră, pentru a favoriza infiltrarea apei și reducerea la minimum a riscului de eroziune a solului și pierderea nutrienților săi. Este recomandată pregătirea solului prin efectuarea arăturii și înlăturarea resturilor vegetale de la cultura precedentă, prin sfărâmarea foarte fină a acestora și încorporarea în sol astfel încât să fie facilitată descompunerea lor rapidă și completă.

Trebuie evitat stresul plantelor cauzat de: secetă, frig, carențele în nutrienți. De exemplu în cazul irigațiilor, trebuie să se reducă la minim riscul ulterior de infestare fungică, prin evitarea irigării prin stropire în timpul dezvoltării organelor florale ale plantelor de cultură. Pentru a se putea evita „slăbiciunea” plantelor susceptibilă favorizării unei infestări cu mucegaiuri, se va avea în vedere asigurarea unui aport optim de nutrienți specifici culturii respective. (www.informatii.agrorurale.ro)

În lupta împotriva mucegaiurilor se utilizează, în funcție de necesități, exclusiv insecticide și fungicide agreate și omologate. Combaterea buruienilor din culturi trebuie să se facă prin mijloace mecanice sau cu erbicide omologate.

Pentru evitarea fenomenului de „culcare la pământ” a plantelor, se recomandă folosirea judicioasă a îngrășămintelor și aplicarea regulatorilor de creștere în vederea fortificării culturilor. (www.scripgroup.com/afaceri/agricultura)

5.1.2. Managementul recoltelor

Acesta se realizează ținându-se cont de următoarele aspecte:

- evaluarea calității cerealelor înaintea recoltării, prin efectuarea unei analize rapide pe teren;
- separarea cerealelor pe categorii de calitate în funcție de exigențele pieței și de calitatea culturii (umedă, curată sau uscată);
- recoltarea se va face la o umiditate optimă a boabelor, pentru evitarea creșterii conținutului de micotoxine. În caz contrar, trebuie să se țină cont de posibilitatea uscării acestora;
- evitarea sfărâmării mecanice a cerealelor și contactul cu solul în timpul recoltării;
- înlăturarea cerealelor cu boabe zbârcite și mici care pot prezenta conținut mai mare de micotoxine decât cele cu dimensiune și aspect normale, prin reglarea corectă a combinei sau printr-o triere post-recoltare;
- uscarea cerealelor imediat după recoltare pentru a se asigura umiditatea recomandată pentru depozitare;

- tratamentele preventive care limitează dezvoltarea mucegaiurilor în depozitele de cereale sunt: reducerea umidității cerealelor prin uscarea la temperaturi scăzute sau moderate și răcirea acestora prin aerare forțată.

Principalele tipuri de sisteme de uscare în celulele de cereale, sunt:

- prin condiționarea completă a celulelor, incluzând operațiile de uscare, răcire, aerare și depozitare. Celulele de stocare vor fi prevăzute cu dispozitive de agitare pentru amestecare verticală, cu uscare la temperatură intermediară;
- prin uscarea succesivă strat cu strat, cu încărcarea secvențială a celulelor, cu cereale;
- prin recircularea cerealelor uscate de la baza stratului către suprafață, în timpul procesului de uscare continuă. (Brooker et al., 1992)

Procesul de aerare uscată se realizează în următorul mod: cerealele sunt uscate în primul rând la temperaturi ridicate apoi sunt transferate fierbinți într-un spațiu temperat, unde restul de umiditate este îndepărtat prin aerare forțată. Dacă cerealele umede trebuie să fie depozitate, fără a fi mai întâi uscate, mucegaiurile se vor dezvolta în câteva zile și vor provoca “încingerea” masei de produs. Cerealele trebuie să fie uscate prin aerare, înaintea depozitării, astfel încât să se reducă la minimum pagubele cauzate de dezvoltarea mucegaiurilor. În cazul unor loturi care prezintă riscuri diferite de contaminare, se va evita pe cât posibil, amestecarea acestora, asigurându-se o separare netă în spațiu pentru aceste loturi. (www.agro.basf.ro)

5.1.3. Managementul postrecoltării

Acesta se realizează ținându-se cont de următoarele aspecte:

- efectuarea aerării cerealelor, prin trecerea circulară a aerului în zonele de depozitare, pentru a menține o temperatură corespunzătoare și uniformă în toate aceste zone. Scăderea temperaturii cerealelor și aerarea acestora, sunt metode eficiente pentru a împiedica dezvoltarea mucegaiurilor.
- efectuarea controlului regulat al umidității și a temperaturii cerealelor în timpul depozitării. Un miros neplăcut poate arăta că boabele sunt încinse, în cazul în care spațiul de depozitare este lipsit de ventilație.
- măsurarea temperaturii cerealelor depozitate, la intervale de timp bine stabilite, pe întreaga perioadă a depozitării acestora. O creștere a temperaturii poate indica o dezvoltare microbiană și/sau o infestare cu insecte;
- pentru mărfurile ambalate trebuie să se asigure integritatea ambalajelor; sacii vor fi curați și uscați, vor fi depozitați pe paleți sau grătare din lemn, având intercalat între ei un strat impermeabil.
- reducerea la minim a prezenței insectelor prin aplicarea adecvată a metodelor de întreținere a spațiilor de depozitare. Separarea cerealelor aparent infestate și prelevarea de eșantioane pentru analiză;

- folosirea insecticidelor și fungicidelor omologate pentru asigurarea inocuității masei de cereale depozitate. Produsele chimice se vor aplica în dozele recomandate, iar acestea nu trebuie să influențeze calitatea și siguranța pentru consum a cerealelor.
- folosirea agenților de conservare agreeți (de exemplu acizi organici - acidul propionic) poate avea efecte benefice pentru cerealele destinate alimentației animale. Acidul propionic și sărurile sale au acțiune fungistatică, fiind uneori folosite pentru conservarea cerealelor recoltate cu o umiditate mai ridicată.
- mijloacele auto destinate transportului cerealelor trebuie să fie curățate și dezinfectate înainte și după folosire, uscate și lipsite de mucegaiuri vizibile, insecte și alte materiale contaminante.
- pe durata transportului cerealele vor fi protejate de umezeală, se vor evita fluctuațiile de temperatură și intervențiile care ar putea provoca formarea condensului la suprafeței masei cerealiere, pentru evitarea apariției micotoxinelor. (Tofan C., 2004; www.zdocs.ro/doc/filiera-cereale)

5.2. Metode curative

În conformitate cu reglementările FAO/OMS, procesele de decontaminare în vederea reducerii impactului toxicologic și economic al prezenței micotoxinelor în alimente, urmăresc următoarele:

- să distrugă, să inactiveze sau să îndepărteze micotoxinele;
- să nu producă sau să nu conducă la apariția unor reziduuri toxice, mutagene sau carcinogene în produsele supuse tratamentului decontaminant;
- să nu modifice proprietățile organoleptice ale alimentului;
- să asigure distrugerea sporilor fungici și a miceliilor care ar putea sintetiza micotoxine;
- să fie accesibile din punct de vedere tehnic și economic (Benigni A. 2016).

Aportul de micotoxine pentru organismul uman și animal se produce prin ingerare de alimente/furaje contaminate, reducerea acestuia putându-se realiza prin: limitarea conținutului de micotoxine în produsele alimentare/furaje și inactivarea (reducerea toxicității) acestora în organismul uman sau animal. (Sara și Borbil, 2007)

5.2.1. Metode fizice

Aceste metode prezintă avantajul că nu afectează calitatea produselor alimentare sau a furajelor supuse tratamentelor și se referă la eliminarea fracțiilor prin separarea fizică a boabelor deteriorate (sparte) și alterate (sortarea, măcinarea, polișarea și extragerea fracției usoare). Sortarea și separarea produselor contaminate este benefică prin reducerea nivelului micotoxinelor la concentrații sigure, fără a produce metaboliți de degradare a toxinelor sau afectarea negativă a valorii nutritive a alimentelor. (Pearson, T. C., 2004)

Procedeele tehnologice fizice care se aplică cerealelor se referă la: măcinarea, decorticarea cerealelor, umectarea acestora și apoi separarea fracțiilor. În general,

micotoxinele tind să se concentreze diferit în fracțiile rezultate la măcină, (în germene și în înveliș), astfel încât printr-o gestionare corespunzătoare a procesului se poate evita contaminarea cu micotoxine a produselor destinate consumului uman. Prelucrarea fizică a cerealelor, măcinarea și sortarea prin cernere a produselor de măcină, conduc la scăderea încărcăturii fungice, studiile experimentale indicând faptul că făina albă provenită din grâu contaminat prezintă conținut mai redus de micotoxine, comparativ cu făina neagră provenită din același grâu, ceea ce înseamnă că prelucrarea grâului scade semnificativ încărcătura fungică, proporțional cu gradul de prelucrare. (Park, 2002).

Măcinarea umedă prezintă avantaje față de măcinarea uscată, deoarece prin intermediul apei folosită la umectarea cerealelor, se elimină o mare parte din fracțiile de micotoxine solubile în apă (aflatoxine, fumonisine și deoxinivalenol). În general, cea mai mare concentrație de micotoxine se regăsește în apa de spălare, urmată de prezența acestora în fibre, gluten sau germene, amidonul fiind relativ liber de micotoxine (Park, 2002).

Decojirea (polișarea) cerealelor presupune îndepărtarea straturilor exterioare ale învelișului cerealelor și este una din cele mai eficiente metode de reducere a conținutului de micotoxine din cereale. În cazul porumbului, prin această tehnică se reduce conținutul de aflatoxine până la 93 % ceea ce duce la scăderea riscului de expunere a consumatorilor la alimente contaminate. (Siwela et al. 2005)

Flotarea și spălarea cerealelor poate duce la o scădere semnificativă a conținutului de micotoxine. Eficacitatea spălării și umectării cerealelor este maximizată atunci când se realizează în combinație cu îndepărtarea spărturilor, a boabelor deteriorate și a părților din boabe care sunt vizibil contaminate. Ca lichide de spălare pot fi utilizate apa distilată sau soluțiile de carbonat de sodiu. Eficiența decontaminării este mai mare dacă boabele sunt agitate timp de 4 ore în soluție de sare, atingând chiar pragul de decontaminare de 100%. Eficacitatea sa este legată de natura invaziei fungice (contaminarea la suprafață sau adâncime) și de caracteristicile toxinelor (aflatoxinele se concentrează în fracțiunile bogate în grăsimi, iar fumonisinele solubile în apă se concentrează în apa de înmuiere).

Tratamente termice- majoritatea micotoxinelor sunt stabile din punct de vedere termic. Temperaturile ridicate utilizate pentru prăjire, coacere și extrudare pot reduce contaminarea cu micotoxine, în timp ce preparatele alimentare convenționale procesate la temperaturi de până la 100°C, au un efect nesemnificativ asupra majorității micotoxinelor. Inactivarea termică a micotoxinelor este influențată de conținutul de umiditate al produsului alimentar, de concentrația de toxine, de tipul matricei alimentare și de aditivii prezenți în produs. (Bullerman and Bianchini 2007)

Iradieră- poate fi eficientă fie prin transformarea structurii chimice a micotoxinelor, fie prin inhibarea creșterii și producției de micotoxine. Microorganismele patogene pot fi reduse sau eliminate prin aplicarea radiațiilor neionizante (solare, UV, cu microunde) și ionizante (radiații X, gamma). Studii efectuate în 2008, au arătat că fotodegradarea aflatoxinelor din cereale reduce nivelurile de toxine cu aproximativ 40% după 3 ore și cu până la 75% după 30 de ore de lumină directă a soarelui. (www.rompan.ro) Inactivarea micotoxinelor prin gama-iradiere este influențată de doza de radiații, tipul de aliment și natura micotoxinei. (www.nutripharm.ro)

5.2.2. Metode chimice

Tratamentele chimice utilizate pentru detoxifierea sau decontaminarea micotoxinelor nu sunt autorizate în Uniunea Europeană pentru aplicarea asupra produselor destinate consumului uman; tratamentele specifice de decontaminare ar necesita o aprobare specială de reglementare legislativă. Multe cercetări au investigat metodele de procesare chimică a alimentelor, pentru capacitatea lor de a îndepărta sau inactiva micotoxinele (tabel nr. 5.1.). Tratamentele chimice pot transforma toxinele în alți metaboliți, a căror toxicitate trebuie minuțios analizată.

Tratamentul cu acizi și baze (ex:acidul propionic, dioxidul de sulf, amoniacul etc) poate fi utilizat pentru a reduce contaminarea cu micotoxine, dar în urma aplicării acestuia pot apărea produse de reacție. Aceste cercetări au evidențiat faptul că, reducerea nivelului de micotoxine poate fi obținută prin controlul fungilor producători de micotoxine (Vidal., et al., 2014). Studiile au arătat că micotoxinele sunt rezistente la acizii slabi, dar tratamentul cu acizi puternici a distrus activitatea biologică a aflatoxinei B1 și aflatoxinei G1 prin transformarea lor în alte forme: aflatoxina B2 respectiv, aflatoxina G2 (Karlovsky Petr., 2016). Pe lângă inhibarea aflatoxinelor, acizii carboxilici (acid acetic, acid citric, acid lactic) inhibă creșterea mucegaiurilor și prin urmare, pot fi utilizați ca și conservanți.

Prelucrarea cu apă oxigenată este una din metodele cele mai eficiente, utilizată în special la fabricarea derivatelor proteice. De exemplu, tratarea făinii de arahide la pH de 9,5 timp de 30 minute, la 80°C, cu adaos de apă oxigenată, asigură o detoxifiere completă a produsului(www.scrigroup.com/afaceri/agricultura)

Amonificarea este o procedură care implică tratarea produselor contaminate sau a furajelor, cu o soluție apoasă de amoniac, amoniac gazos sau hidroxid de amoniu apos. Soluțiile pe bază de amoniu pot fi pulverizate direct pe boabele de cereale sau pe furaje. Eficiența procesului depinde de temperatură, presiune, umiditate, durată și substrat. (Weng et al., 1994)

Park et al. (1993) au studiat detoxifierea aflatoxinelor prin amonificare iar rezultatele au demonstrat eficacitatea și siguranța amoniacului ca o soluție practică pentru detoxificarea aflatoxinelor din furaje. Însă, contrar cercetărilor, amoniacul nu a fost aprobat până în prezent în nici o țară pentru utilizarea în detoxifierea alimentelor.

Utilizarea de gaz de dioxid de sulf –se realizează pentru controlul contaminării cu micotoxine, post-recoltare. Este cunoscut ca un dezinfectant obținut prin arderea sulfului elementar și utilizarea fumului rezultat. Dioxidul de sulf (SO₂) a fost utilizat pentru conservarea alimentelor și a băuturilor (Magan, 2007). În mod obisnuit, SO₂ este utilizat ca tratament inhibitor fungic pentru a preveni creșterea mucegaiurilor, drojdiilor și a bacteriilor. Fumigarea cu SO₂ a fost testată pentru depozitarea pe termen mediu a cerealelor, dar s-au constatat probleme cu coroziunea conductelor utilizate pentru aplicarea SO₂ în depozitele de cereale. Pentru depozitarea pe termen mediu (cca. 5 luni) este necesară o doză de cel puțin 4,4% SO₂ pentru o păstrare eficientă, dar alte studii au subliniat că pot fi necesare concentrații mult mai mari, din cauza adsorbției și legarea SO₂ la cereale, acest lucru conducând la scăderea activității antifungice. Rezultatele cercetărilor au arătat că, în funcție

de conținutul de umiditate al grâului (20-30%), SO₂ gazos a devenit legat de cereale, în timpul aplicării tratamentului. (Magan ș.a., 2007).

Compararea eficacității metodelor de decontaminare chimică
Comparison of the effectiveness of chemical decontamination methods

Tabel 5.1

Metoda	Micotoxina	Eficiența
Acizi si baze		
Amonificarea	aflatoxine	Decontaminarea și reducerea semnificativă a toxicității
	fumonisine	Decontaminarea fără modificarea toxicității
Oxidanti și agenți reducători		
Apa oxigenată	aflatoxine	Efect pozitiv
Bisulfii	aflatoxine	Efect pozitiv
Glucoza, fructoza	fumonisine	Efect pozitiv

(Magan, 2007)

Administrarea unor substanțe adsorbante- în furaje, blochează în tubul digestiv toxina și o elimină prin materiile fecale. De exemplu, MYCOAD este un aluminosilicat de sodiu/calciu activat, cu spectru larg, hidratat, special conceput pentru adsorbția și reținerea tuturor micotoxinelor majore care afectează sănătatea și productivitatea păsărilor, a porcilor și bovinelor. Acesta este compatibil cu toate ingredientele alimentare și nu afectează adsorbția nici unuia dintre componentele furajelor (aminoacizi, vitamine, minerale, antibiotice, coccidiostatice). Spre exemplu, la aplicarea unei doze de 50-60 g/vacă/zi este capabil să reducă semnificativ prezența aflatoxinei M1 în lapte, sub limita maximă admisă de legislație (50ppt). (www.specialnutrients.com)

5.2.3 Metode biologice

Prin "decontaminare biologică" se înțelege transformarea enzimatică a micotoxinei într-un compus mai puțin toxic. S-a încercat degradarea naturală a micotoxinelor cu microorganisme sau enzime. Metodologiile bazate pe sisteme biologice pentru inactivarea micotoxinelor se referă la o serie de activități care încep cu screeningul microorganismelor, până la stadiul final al eliminării/inactivării acestora. Metodele de inactivare a micotoxinelor implică cinci etape:

- selecția culturilor microbiene din probele naturale;
- izolarea și identificarea coloniilor microbiene individuale implicate în biotransformare;
- investigarea caracteristicilor morfofiziologice ale tulpinilor izolate;
- identificarea și evaluarea toxicității produselor eliberate după biotransformare;
- purificarea enzimelor funcționale și aplicarea decontaminării extinse. (Chulze., 2010)

Tehnologiile noi în combinație cu noi agenți de detoxifiere, necesită cercetări și dezvoltări ulterioare, înainte ca acestea să poată fi aprobate de autoritățile europene de reglementare. (www.eufic.org) În lupta împotriva micotoxinelor se dezvoltă cercetări în următoarele direcții:

- selecția genetică a plantelor rezistente la contaminarea cu fungi toxigeni;
- producerea de plante transgenice capabile să inhibe producția fungică a micotoxinelor;
- producerea unor semințe ce conțin bacterii endofite, care ar putea exclude dezvoltarea fungilor toxigeni;
- preinfectarea plantelor de cultură cu specii de fungi netoxigeni, care ar putea constitui factori de competiție pentru speciile toxigene.

Un exemplu de succes în acest domeniu este reprezentat de identificarea unei gene din planta *Arabidopsis thaliana*, care codifică o enzimă (UDP-glucoziltransferaza), implicată în detoxifierea deoxinivalenolului și a zearalenonei sintetizate de *Fusarium sp.* (Adam, G. et al., 2003)

CAP. 6. EFECTELE CONSUMULUI DE PRODUSE AGROALIMENTARE CONTAMINATE CU MICOTOXINE

CHAPTER 6. THE EFFECTS OF THE CONSUMPTION OF AGRICULTURAL PRODUCTS CONTAMINATED WITH MYCOTOXINS

În anumite condiții climatice, mucegaiurile sunt capabile să producă mai mult de o micotoxină, iar unele micotoxine sunt produse de mai multe specii fungice (Zain, 2011). În consecință, acest lucru are ca rezultat coexpoziția la micotoxine multiple și riscul de efecte adverse asociate, inclusiv carcinogenitatea. Tipul de micotoxină, nivelul și frecvența expunerii (acute sau cronice) afectează manifestarea bolilor, precum și vârsta, indicele de masă corporală, sexul, problemele de sănătate concomitente și posibilele efecte sinergice ale altor substanțe chimice la care se află expus individul. (Peraica ș.a., 1999).

Toxicitatea acută are, în general, un debut rapid și un răspuns toxic evident, în timp ce *toxicitatea cronică* se caracterizează prin expunerea la doze mici pe o perioadă lungă de timp, ceea ce poate duce în cele din urmă la tumori maligne și alte efecte dăunătoare permanente (Peraica ș.a., 1999). Multe micotoxine prezintă toxicități suprapuse la animale, plante și alte organisme. Tipul și mecanismul de acțiune al micotoxinelor din sistemul biologic, determină rolul acestora în cauzarea cancerului și contribuie la efecte adverse asupra sănătății. Natura chimică a majorității micotoxinelor le face compuși foarte liposolubili care pot fi absorbiți de la locul expunerii, cum ar fi tractul gastro-intestinal și respirator, până la fluxul sanguin, unde pot fi disimilați în tot corpul, ajungând la diferite organe cum ar fi: ficatul și rinichii.

Micotoxinele au o puternică tendință și capacitate de a penetra celulele umane și animale și de a provoca modificări genetice majore și permanente ale genomului celular. Aceste mutații duc la dereglarea creșterii celulare și ulterior, la dezvoltarea cancerului. (Adam ș.a., 2003).

În contextul asigurării siguranței alimentelor și pentru a proteja consumatorul de efectele dăunătoare ale micotoxinelor, Uniunea Europeană a stabilit reglementări legislative, stabilindu-se niveluri maxime permise (ML) în produsele alimentare și valorile aportului zilnic tolerabil (TDI) sau valorile provizorii ale consumului zilnic maxim tolerabil (PMTDI). Pericolul prezentat de micotoxine și prezența lor inevitabilă în alimente a determinat autoritățile publice să adopte politici riguroase de control. (www.food-info.net)

Agenția Internațională pentru Cercetarea Cancerului (IARC) al Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) pune un accent puternic pe studiile epidemiologice umane pentru clasificarea carcinogenității (IARC, 1993a, 2012), iar în acest sens a emis o clasificare a micotoxinelor în funcție de efectul lor cancerigen. În tabelul 6.1. sunt prezentate micotoxinele clasificate de programul de evaluare a IARC, 2012.

Micotoxinele clasificate de către IARC, care identifică și evaluează cauzele de mediu ale cancerului la om

Mycotoxins as classified by the IARC, which identifies and evaluates environmental causes of human cancer

Tabel 6.1.

Clasificarea IARC		Micotoxina (IARC,2012)
Grupa I	agentul este cancerigen pentru oameni	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1
Grupa II	agentul este presupus ca fiind cancerigen pentru oameni	OTA FB1, FB2 STC Fusarin C
Grupa III	agentul nu este clasificabil în ceea ce privește carcinogenitatea sa la om	DON ZEN Fusarenone X CIT PAT
Grupa IV	agentul probabil nu este cancerigen pentru oameni	-

Abrevieri: AFB1- aflatoxina B1; AFB2- aflatoxina B2; AFG1- aflatoxina G1; AFG2- aflatoxina G2; AFM1- aflatoxina M1; CIT- citrinina; DON-deoxynivalenol; FB1- fumonisina B1; FB2- fumonisina B2; OTA- ochratoxina A; PAT- patulina; STC- sterigmatocistina; ZEN- zearalenone.

Pentru a investiga riscul de cancer produs de micotoxine la oameni, au fost efectuate studii epidemiologice, îndeosebi în contextul cancerului hepatic, fiind examinate diferite matrici de expunere, cum ar fi: sângele, plasma, urina, fecalele, țesutul hepatic, precum și produsele alimentare. (www.academia.edu) În tabelul 6.2 sunt prezentate micotoxinele observate în studiile selectate și diferitele tipuri de cancer pentru care a fost investigată o relație.

Micotoxinele și posibilele efecte cancerigene *Mycotoxins and possible carcinogenic effects*

Tabel 6.2.

Micotoxina	Efecte cancerigene	Subtipuri de cancer
Aflatoxine	Cancer hepatic primar	Carcinom hepatocelular Colangiocarcinom (tumoare malignă în căile biliare)
Fumonisina B1	Cancer hepatic primar	Carcinom hepatocelular
Zearalenona	Cancer de sân Cancer de col uterin	-

(IARC, 2012)

Efectele toxice asociate micotoxinelor sunt prezentate succint în figura 6.1. Majoritatea datelor referitoare la producerea bolilor de către micotoxine la om, rezultă din extrapolarea datelor referitoare la animale și din datele epidemiologice care, din păcate, sunt limitate ca număr. Principalele organe afectate de micotoxine sunt: ficatul, rinichii, epiderma, inima, creierul. (www.micotoxins.org)

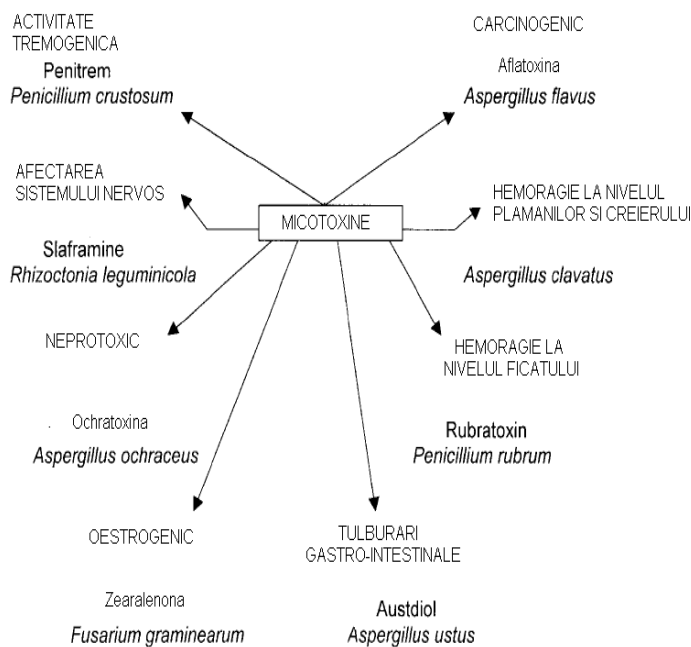


Fig. 6.1 Efectele toxice asociate micotoxinelor
Fig. 6.1 Toxic effects associated with mycotoxins
(www.scripgroup.com/afaceri/agricultura)

6.1 Efecte consumului de produse contaminate cu aflatoxine

Aflatoxinele sunt metaboliți secundari eliberați de ciupercile *Aspergillus flavus* și *Aspergillus parasiticus*, care s-au dovedit a fi extrem de toxici și cariogeni. Diferitele investigații de laborator au confirmat carcinogenitatea ridicată a acestor compuși chimici și modul în care sunt asociați cu multe tipuri de cancer de ficat și rinichi. Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului (IARC) a clasificat aflatoxinele (B1, B2, G1, G2 și M1) drept grupul de carcinogeni de grad I cu risc crescut de carcinom hepatocelular. (IARC, 2012)

Dintre aflatoxine, s-a constatat că B1 și G1 sunt cele mai toxice, cu cel mai mare efect cancerigen asupra celulelor. Acestea pot avea efecte acute și cronice: vărsături, dureri abdominale, edem pulmonar și cerebral, comă, convulsii și chiar moarte. Toxicozele acute apar mai rar în țările dezvoltate, însă formele cronice constituie o problemă la nivel mondial, datorită efectelor cancerigene, teratogene, hepatotoxice, mutagene și imunosupresive, pe care le produc. (IARC, 2012)

Produsele alimentare care pot fi contaminate cu aflatoxine includ: cerealele (grâu, porumb, sorg, mei, orez), semințele oleaginoase (arahide, soia, floarea-soarelui, bumbac), condimente (ardei iute, piper negru, coriandru, turmeric, ghimbir), nuciferele (migdale, fistic, nuci, nucă de cocos) și laptele. În mod frecvent, aflatoxinele se găsesc și în frunzele de tutun contaminate (Binder EM., 2007). Acestea pot fi prezente și în solul uscat, putând migra în pânza de apă freatică și astfel, existând posibilitatea ingerării de către oameni și animale, prin apa potabilă. (Paterson R. ș.a, 2010)

Aflatoxina B1 este un metabolit toxic care produce probleme serioase pentru sănătatea publică, având un rol activ în provocarea carcinogenezei hepatice și extrahepatice atât la oameni, cât și la animale (fig. 6.2). S-a stabilit că cca. 50% din carcinoamele hepatocelulare au fost descoperite în zonele în care s-au depistat niveluri ridicate de contaminare cu aflatoxină B1 în alimente. Se consideră că inhalarea aflatoxinei B1 provoacă cancer pulmonar primar datorită activării acesteia la forma sa biologic activă (8, 9-epoxid). (www.mycotoxins.info)

Aspergillus flavus se găsește în mod obișnuit în cereale, citrice și arahide fiind una din speciile de mucegai cunoscute ce produc aflatoxina, care poate cauza hepatite acute, imunosupresie și carcinom hepatocelular. La om, în cazuri rare, *Aspergillus flavus* își poate continua ciclul de viață în interiorul corpului, cu localizare cefalică, producând aspergiloza intracraniană, care este o boală foarte gravă, de cele mai multe ori letală. Ciuperca invadează arterele din zona creierului și cauzează infarctul cerebral. În general, aspergiloza apare la pacienții imunocompromiși sau mai poate să apară la agricultori, sporii de *Aspergillus flavus* localizându-se în sinusul paranasal. Această ciupercă produce în principal aflatoxinele B1 și B2, neavând rol în producerea celor de tip G1 și G2, în timp ce *Aspergillus parasiticus* le produce pe toate patru. (www.mycotoxins.info)

Eliminarea aflatoxinelor din organismul uman se realizează prin următoarele căi: pe cale biliară (cca, 60% din conținutul total), pe cale urinară (eliminarea metaboliților ce servesc ca markeri în intoxicații), prin lactație (doar aflatoxina M1).

Organul țintă care suferă leziuni grave în cazul intoxicațiilor cu aflatoxine este *ficatul* (fig. 6.2) *Aflatoxicoza acută* se poate manifesta prin hemoragii, insuficiență hepatică acută și chiar deces. Doza mortală diferă de la un individ la altul și depinde de mai mulți factori cum ar fi: cantitatea de aflatoxină ingerată, vârsta, starea de sănătate și starea de nutriție. Consumul unei cantități mai mici de aflatoxină, dar timp mai îndelungat, duce la apariția intoxicației cronice. Efectele și simptomele sunt în general greu de pus în evidență atât din cauza intensității reduse, dar mai ales din cauza caracterului lor nespecific. *Aflatoxicoza cronică* trebuie suspectată când în lipsa altor cauze evidente, apar tulburări digestive persistente însoțite de reducerea sporului în greutate. (www.toxicologiealimentară.ro)

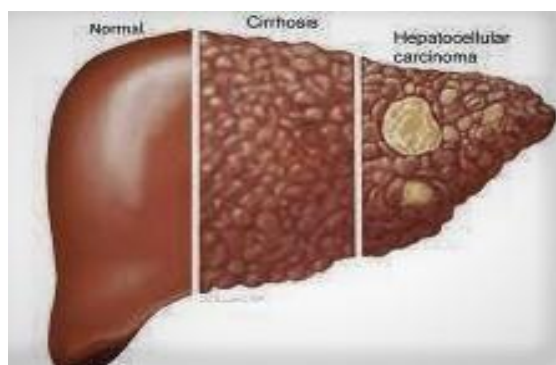


Fig. 6.2 Cancer de ficat (newsmed.ro)

Fig. 6.2 Liver cancer

Contaminarea unui produs alimentar sau furajer cu micotoxine nu presupune prezența obligatorie a fungului elaborator sau modificarea caracteristicilor organoleptice ale produsului (aspect, culoare, miros, gust), ceea ce face imposibilă decelarea micotoxinei, dacă alimentele și furajele nu sunt supuse unui control micotoxicologic riguros, efectuat periodic. (www.toxicologiealimentară.ro)

6.2 Efectele consumului de produse contaminate cu ochratoxine

Ochratoxinele sunt micotoxine produse de unele specii de *Aspergillus sp.* și *Penicillium sp.*, cum ar fi: *A. ochraceus* și *A. niger*, *P. verrucosum* și *P. carbonarius* (Trenk H.L., 1971), ochratoxina A fiind cea mai frecventă și având cel mai mare grad de toxicitate. (Cavin C. et al.,2007)

Ochratoxinele se găsesc în cereale, cafea, fructe uscate și vin roșu, dar se pot acumula și în carnea animalelor astfel încât, carnea și preparatele din carne pot fi contaminate cu aceste micotoxine. (Duarte S.C. et al.,2010)

Ocratoxina A poate produce efecte diferite asupra oamenilor și animalelor, dar nefrocarcinogenitatea pe care o manifestă, s-a dovedit a avea cel mai important efect (Fig. 6.3), genele responsabile pentru leziunile renale și regenerarea celulară fiind influențate semnificativ de această micotoxină. (Marin-Kuan M. et al.,2006)

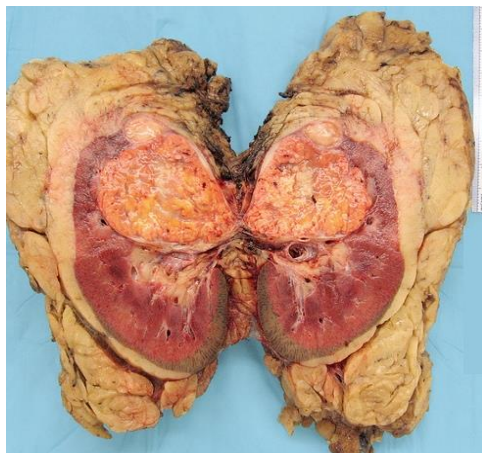


Fig. 6.3 Cancer renal (esănătos.com)

Fig. 6.3 Kidney cancer

În plus, s-a stabilit că ocratoxina A are o influență redusă asupra genelor implicate în sinteza și repararea ADN-ului, și o influență minimă asupra genelor responsabile de apoptoză (moarte celulară). (Dörrenhaus A. et al.,2000) De asemenea, s-a descoperit că ocratoxina A are efecte asupra genelor nefrotice în rinichi, care sunt responsabile pentru detoxifierea chimică și apărarea antioxidantă în interiorul celulei. Acest lucru, la rândul său, afectează mecanismul de apărare al celulei, provocând în același timp o creștere a stresului oxidativ la rinichi, care contribuie la natura cancerigenă a ocratoxinei A.

Ocratoxina A are o activitate genotoxică asupra ADN-ului celular, urmată de metabolismul oxidativ, care joacă un rol major în carcinogeneza renală indusă de ochratoxină. (Lioi M.B. et al.,2004; Pfohl-Leszkowicz A. et al., 2012).

Este clasificată ca fiind o micotoxină nefrotoxică omniprezentă, implicată în tumorile tractului urinar, este asociată cu incidența tumorilor epiteliale ale tractului urinar superior, fiind responsabilă pentru nefropatia endemică umană din Balcani. Din acest motiv, a fost clasificată de Agenția pentru Cercetarea Cancerului, ca fiind un posibil cancerigen aparținând grupei 2B (IARC, 2005; Castegnaro ș.a. 1999).

Un studiu asupra rozătoarelor a susținut implicarea ochratoxinei A în dezvoltarea cancerului de sân prin afectarea genetică. Studiul a dus la ipoteza că ocratoxina A poate provoca cancer de sân și la om. (Fig. 6.4)



Fig. 6.4 Cancer de sân (www.doctorulzilei.ro)

Fig. 6.4 Breast cancer

S-a emis ipoteza că ocratoxina A este implicată și în apariția cancerului testicular, care este unul dintre cele mai frecvente cancere ce afectează bărbații tineri, îndeosebi în zonele unde consumul de alimente contaminate cu ocratoxină A de către femeile însărcinate și de către copii, este semnificativ. Acest fapt ar provoca apariția de leziuni în ADN-ul testicular, în timpul pubertății, care se vor transforma ulterior în cancer testicular. (Dunnick J.K. et al., 1995)

6.3 Efectele consumului de produse contaminate cu zearalenonă

Zearalenona prezintă activitate hormonală la multe specii de animale, ceea ce o face genotoxică, cancerigenă sau ambele în același timp (Moss M.O., 2002) și poate induce modificări în organele de reproducere și sistemele multor animale de laborator, precum șoareci, șobolani și diferite animale domestice, cum ar fi caii. Datorită acestei abilități, se presupune că zearalenona poate fi implicată în producerea cancerului organelor de reproducere atât la oameni, cât și la animale. Aceasta micotoxină s-a dovedit a fi cancerigenă și capabilă să producă tumori hipofizare (fig. 6.5) și adenoame hepatocelulare. (Schothorst R.C., van Egmond H.P., 2004)

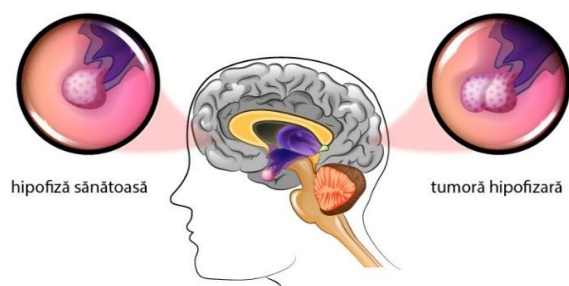


Fig.6.5. Tumoră hipofizară (www.reginamaria.ro)

Fig. 6.5 Pituitary tumor

O incidență ridicată a cancerului esofagian (fig. 6.6.) a fost descoperită în zonele cu contaminare micotoxinică care include și zearalenona, iar această micotoxină are capacitatea de a induce papiloame hipercheratotice în epiteliul scuamos esofagian (Marasas W.F. et al., 1979), acest fapt sugerând implicarea zearalenonei și în apariția și dezvoltarea tumorilor în tractul digestiv. (Richard J.L., 2007)



Fig. 6.6. Cancer esofagian (www.clinicaoncologieseverin.ro)

Fig. 6.6 Esophageal cancer

Un studiu efectuat pe șoarecii cărora li s-a administrat o doză de zearalenonă prin alimente, a arătat capacitatea acesteia de a induce adenoame hepatocelulare și cauzează leziuni ale ADN-ului, prezentând aducți de ADN în rinichi și ficat. S-a demonstrat că rezultatele acestui studiu au confirmat genotoxicitatea și capacitatea zearalenonei de a induce adenoame hepatocelulare la șoareci (Pfohl-Leskowicz A. et al., 2012). Aceste rezultate pot fi folosite pentru a ipoteza implicarea zearalenonei în apariția cancerului de ficat, rinichi și a altor tipuri de cancer, la oameni.

Potențialul cancerigen al zearalenonei la subiecții umani a fost supus unui lung șir de teste în ultimele decenii, fiind evaluat de către Agenția Internațională pentru Cercetare în Domeniul Cancerului (IARC), cu încadrarea acesteia în grupa 3 de toxicitate (www.iarc.fr).

Studii efectuate demonstrează faptul că zearalenona aflată în concentrații ce depășesc limitele maxime admise (50 $\mu\text{g/kg}$) în alimentația copiilor mici, poate constitui cauza inducerii pubertății precoce la aceștia. (<http://ec.europa.eu/food/fs>) Această micotoxină afectează endocrinitatea fiind asociată cu manifestări clinice de hiperestrogenism la om, inclusiv modificări pubertare precoce la copiii mici, precum și ginecomastie cu atrofie testiculară la bărbați. Efectele majore ale zearalenonei se manifestă și asupra capacității de reproducere la femei, aceasta afectând organele de reproducere și funcțiile lor, care duc în cele din urmă la o afecțiune numită hiperestrogenism. (Kuiper-Goodman T., 1987)

Conform datelor existente la nivel global, Comitetul de cooperare științifică pe probleme referitoare la produsele alimentare (SCOOP) subliniază faptul că la momentul actual, aportul alimentar de zearalenonă din alimentele consumate de populația statelor membre ale UE, (pâinea reprezentând componenta principală), nu depășește doza zilnică maximă admisă (ec.europa.eu/food).

6.4 Efectele consumului de produse contaminate cu fumonisine

Fumonisinele reprezintă un alt grup de micotoxine care este produs de speciile *Fusarium sp.* S-au depistat trei tipuri de fumonisine B1 (FB1), B2 (FB2) și B3 (FB3), toate acestea fiind izolate din porumb. (FAO, 2017)

Fumonisina este un agent potențial cauzator de cancer la om (Fink-Gremmels J. et al., 1999). Un experiment efectuat pe șobolani a confirmat că fumonisina B1 este hepatocarcinogenă și hepatotoxică (Howard ș.a., 2001). S-a dovedit că fumonisina B1 este implicată în dezvoltarea carcinoamelor renale la șobolanii masculi și a cancerului hepatic la șoarecii femele, afecțiuni care ar putea apărea și la om. (Dragan Y.P., 2001)

Fumonisinele au fost corelate cu apariția bolii neurodegenerative și incidența cancerului esofagian atât în Africa de Sud, cât și în Africa de Nord și China. (Huang ș.a., 2007) Aceste micotoxine pot provoca boli neurodegenerative (fig. 6.7.) de aceea, se impune studierea modului de acțiune a acestora, prin studierea efectului lor asupra diferitelor gene din creier, pentru a se detecta dacă sunt implicate în provocarea cancerului și tumorilor cerebrale. (Huang ș.a., 2007)

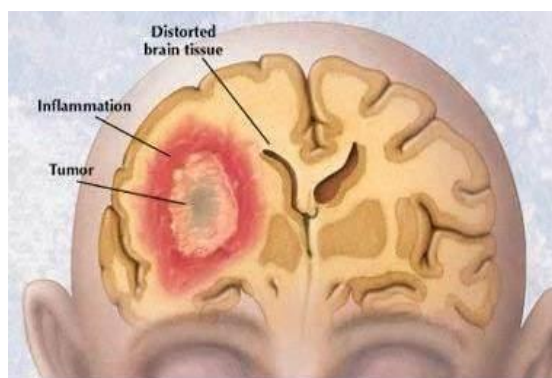


Fig. 6.7. Tumoră cerebrală (www.esănătos.com)

Fig. 6.7 Brain tumor

6.5 Efectele consumului de produse contaminate cu trichotecene

Deoxinivalenolul (DON; vomitoxină) și *nivalenolul* sunt micotoxine trichotecene produse de *Fusarium graminearum*. Simptomele intoxicației la om includ anorexie, greață, vărsături, cefalee, dureri abdominale, diaree, frisoane, vertij și convulsii. O serie de apariții ale bolilor acute transmise prin alimente, care implică simptome gastro-intestinale, au fost atribuite consumului de cereale contaminate cu deoxinivalenol. (Luo 1988)

Alături de alte trichotecene, deoxinivalenolul și nivalenolul cauzează o varietate de efecte imunologice la animalele de laborator, ducând la susceptibilitate crescută pentru diverse boli microbiene. Aceste toxine nu par a avea efecte cancerigene, însă pot acționa sinergic cu aflatoxinele. (www.academia.edu)

Toxina T-2 este o micotoxină trichotecenă, considerată ca având acțiune imunosupresoare, citotoxică, limfocitică și carcinogenă în celulele mamiferelor. (Chu ș.a., 1971) Aceasta este capabilă să inducă pauze în ADN-ul limfocitelor atunci când este administrată *in vivo* și *in vitro* și odată ce celulele fibroblaste sunt tratate cu această micotoxină, va avea loc sinteza neprogramată a ADN. (Schoental R., 1985) Sensibilitatea animalelor nou-născute și a celor tinere, la toxina T-2 este mai mare decât la animalele adulte și provoacă un grad ridicat de edem și toxicități cutanate prin acțiune directă asupra vaselor capilare. (Ueno Y., 1984)

În prezența aflatoxinei B1, trichotecenele vor spori hepatocarcinogeneza indusă de aflatoxina B1 (Ueno Y., 1992). Deși s-a descoperit că în condiții experimentale atât *in vivo* cât și *in vitro*, nu au avut loc daune la nivelul ADN-ului hepatic, toxina T-2 are capacitatea de a reduce răspunsurile la mitogeni din limfocitele umane *in vitro*. (Schothorst RC. et al., 2004)

Expunerea la micotoxine trichotecene poate activa apoptoza atât *in vitro*, cât și *in vivo*, în multe organe cum ar fi: organele limfoide, țesuturile hematopoietice, ficatul, intestinul, măduva osoasă (fig.6.8.) și nu în cele din urmă, timusul (Rocha ș.a.,2005); poate

inhiba sinteza proteinelor (Pestka J.J.,2007) și s-a constatat că induce necroza celulară și cariorexie în țesuturile divizoare ale mucoasei intestinale, măduvei osoase, splinei, testiculelor și ovarelor. (Yazar S. et al., 2008)



Fig. 6.8. Cancer osos (www.bethlen-foundation.ro)

Fig. 6.8 Bone cancer

6.6 Efectele consumului de produse contaminate cu patulină

Patulina este o micotoxină capabilă să provoace mutații genetice în diferite celule, la mamifere (Schumacher ș.a., 2005). Administrarea de patulină la animale, a arătat că induce dezvoltarea celulelor tumorale maligne, ceea ce a dovedit efectul cancerigen al acestei micotoxine, care poate fi ipotezat și la oameni. (Stewart SG., 1968)

Patulina este mutagenă, cancerigenă și teratogenă, având tendința de a induce leziuni intestinale (Mahfoud ș.a., 2002) și are capacitatea de a ataca ADN-ul celular la oameni, fapt care poate duce la dezvoltarea tumorilor și apariția cancerului. S-a demonstrat că toxicitatea patulinei pentru celulele intestinale implică o inactivare a proteinei tirozin-fosfatază (PTP), care este un regulator cheie al funcției de barieră epitelială intestinală. Pe de altă parte, scăderea rezistenței transepiteliale a acestei proteine poate duce la deteriorarea celulelor intestinale și producerea cancerului de stomac (Mahfoud ș.a, 2002). Aceste dovezi indică implicarea patulinei în dezvoltarea cancerului intestinal și a cancerului de stomac la om. (Fig. 6.9.)

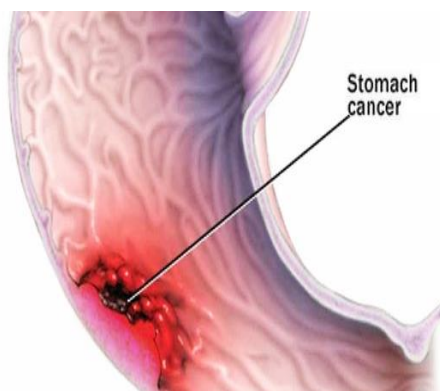


Fig. 6.9. Cancer de stomac (www.scumc.ro)

Fig. 6.9 Stomach cancer

Până în prezent, studiile care investighează efectele potențiale ale expunerii la micotoxine asupra riscului de cancer, s-au concentrat pe expunerea la *micotoxine unice* și efectele lor *acute* asupra sănătății. Cu toate acestea, studiile in vivo folosind animale de fermă au ilustrat un set complex de posibile efecte sinergice, aditive, subaditive sau antagoniste asupra sănătății animalelor atunci când s-au administrat amestecuri de micotoxine (Bensassi ș.a., 2014; Speijers ș.a., 2004). Atunci când sunt expuse *cronic* la *micotoxine multiple*, interacțiunile complexe pot duce la orice număr de efecte menționate anterior (Bensassi ș.a., 2014). De exemplu, citrinina acționează sinergic cu ochratoxina A asupra rinichilor (Speijers ș.a., 2004).

Puține studii la oameni au abordat în mod specific asocierile dintre expunerea la micotoxine și riscul de cancer, chiar dacă există multe dovezi care leagă aceste micotoxine de efectele negative asupra sănătății, inclusiv genotoxicitatea.

La nivelul Comunității Europene au fost emise mai multe reglementări și recomandări pentru a minimiza concentrațiile de micotoxine permise în alimente și furaje (Zain ș.a., 2011).

Partea II - CERCETĂRI PROPRII

PART TWO – OWN RESEARCH

CAP. 7. CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND CERCETAREA MICOTOXINELOR

CHAPTER 7. OWN CONTRIBUTIONS TO MYCOTOXIN RESEARCH

7.1 Motivația, scopul și obiectivele cercetărilor

Motivația studierii incidenței micotoxinelor în produsele agroalimentare s-a datorat următoarelor aspecte:

- precaritatea cercetărilor privind prevalența și nivelul micotoxinelor în produsele agroalimentare la nivelul județului Iași;
- recomandările EFSA (Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor) de studiere a potențialei creșteri a contaminării micotoxice a produselor agroalimentare din Uniunea Europeană, cu scopul creării, pe baza analizei datelor obținute, a modelelor predictive, a scenariilor definite și a hărților care să localizeze zonele în care este posibilă o potențială contaminare a produselor alimentare;
- necesitatea impusă de toxicitatea ridicată, a evaluării gradului de contaminare a produselor vegetale, în scopul protecției stării de sănătate a consumatorilor.

Scopul cercetărilor a vizat evaluarea prezenței și gradului de contaminare micotoxinică a diferitelor produse alimentare de origine vegetală, precum și stabilirea cauzelor și surselor de apariție a acestora în condițiile județului Iași, în perioada 2015-2020.

Obiectivele stabilite în vederea atingerii scopului urmărit au fost următoarele:

- identificarea principalelor micotoxine prezente în produsele alimentare de origine vegetală, din județul Iași;
- evaluarea nivelului de contaminare micotoxinică a diferitelor categorii de produse agroalimentare, la nivelul județului Iași;
- urmărirea dinamicii anuale a prevalenței micotoxinelor în produsele agroalimentare;
- stabilirea și analizarea surselor de contaminare cu micotoxine pentru produsele alimentare de origine vegetală luate în studiu;
- efectuarea trasabilității produselor alimentare de origine vegetală studiate și analizarea cauzelor contaminării micotoxice a acestora.

Activitățile specifice care au fost desfășurate pe durata efectuării cercetărilor au constat în:

- prelevarea probelor de produse agroalimentare și pregătirea preliminară a acestora;
- efectuarea analizelor de laborator;
- interpretarea rezultatelor obținute;
- evaluarea gradului de contaminare micotoxică a produselor analizate;
- evaluarea surselor principale de contaminare;
- evaluarea surselor secundare de contaminare;
- stabilirea concluziilor și recomandărilor.

7.2 Materiale și metode de cercetare

Determinările privind micotoxinele au fost efectuate în perioada 2015-2020, din probe de produse agroalimentare (cereale, făină de grâu, gluten din grâu, griș, mălai, tărațe de grâu etc), care au fost prelevate în mod aleatoriu, după o strategie de prelevare obiectivă, atât din uniități de depozitare, de procesare cât și din unități de comercializare a produselor agroalimentare, de pe raza județului Iași.

Prelevarea probelor a fost realizată pe baza unei proceduri de lucru prestabilite, în conformitate cu anexa nr. 1 a Regulamentului CE nr. 401/2006 care stabilește modalitățile de prelevare de probe și metodele de analiză pentru controlul oficial al conținutului de micotoxine din alimente.

Determinările privind conținutul de micotoxine din probele de produse vegetale prelevate, au fost efectuate în cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor Iași, prin metodele ELISA și HPLC/LC, aceste metode fiind validate și acreditate.

CAP. 8. IDENTIFICAREA ȘI MONITORIZAREA MICOTOXINELOR

CHAPTER 8. IDENTIFICATION AND MONITORING OF MYCOTOXINS

Programul de supraveghere micotică și micotoxinică a alimentelor și a hranei pentru animale, trebuie să fie aplicat în egală măsură, atât fermelor producătoare de substraturi vegetale, depozitelor de recepție a cerealelor, fabricilor de procesare a nutrețurilor combinate, fermelor de creștere a animalelor, precum și unităților de fabricare a produselor alimentare, pe principiul „de la furcă la furculiță”.

Este interzisă punerea pe piață a alimentelor conținând un contaminant într-o cantitate considerată inacceptabilă din punct de vedere al sănătății umane. În plus, nivelul de contaminare micotoxinică trebuie menținut cât mai scăzut posibil prin utilizarea bunelor practici la toate nivelurile de producție, prelucrare, procesare, preparare, tratament, ambalare, depozitare și transport a produselor alimentare.

8.1 Pregătirea preliminară și eșantionarea probelor

Pe baza conținutului de micotoxine determinat în probele de laborator se verifică conformitatea produselor alimentare cu limitele maxime admise stabilite de Regulamentul (CE) nr. 1881/2006 care legiferează nivelurile maxime pentru anumiți contaminanți. Pentru produsele alimentare, Regulamentul (CE) nr. 401/2006 stabilește modalitățile de prelevare de probe și metodele de analiză pentru controlul oficial al conținutului de micotoxine din alimente.

Prelevarea probelor de produse supuse analizelor de laborator se face după proceduri de lucru prestabilite. Probele se prelevează numai pentru produsele de origine vegetală care au prevăzute limite maxime ale micotoxinelor în legislația comunitară. Începând cu anul 2009 s-a impus prelevarea de probe și pentru monitorizarea conținutului de micotoxine la anumite produse ce nu au limite maxime admise prevăzute de legislația în vigoare, dar care sunt recomandate a fi monitorizate de către Comisia Europeană (ex.: toxina T2/HT2), precum și în vederea elaborării evaluării de risc pentru anumite situații particulare.

Micotoxinele sunt distribuite neuniform într-un lot, de aceea se iau toate măsurile necesare pentru a se asigura că proba prelevată este reprezentativă pentru lotul în cauză. Prin urmare, este necesar să se preleveze un număr mare de probe elementare din diferite locuri ale lotului respectiv, conform normelor legislative adoptate. În cazul micotoxinelor este esențial ca acțiunea de prelevare să se desfășoare corect deoarece este imposibilă stabilirea unei măsuri ulterioare, pe baza analizei unei probe nereprezentative.

Eșantionarea este o tehnică prestabilită prin care proba recoltată dintr-un produs este divizată în părți egale, iar una dintre acestea, aleasă în mod aleatoriu, va reprezenta eșantionul, care va fi analizat. Rezultatele obținute vor fi extrapolate la lotul inițial de produs. Eșantionarea trebuie să respecte cu fidelitate însușirile ce caracterizează produsul supus analizei, fiind o etapă foarte importantă în cadrul tehnicii de apreciere a calității unui produs, deoarece atât procedura de eșantionare cât și modul cum aceasta este realizată, contribuie semnificativ la incertitudinea rezultatului analizelor efectuate.

8.2 Metode de prelevare a probelor

Prelevarea aleatorie este o metodă de prelevare în care fiecare element al populației țintă are aceeași probabilitate de fi selectat. De exemplu: o prelevare aleatorie dintr-un lot conține mai multe probe elementare prin unirea cărora se formează proba globală.

Prelevarea cluster presupune prelevarea aleatorie a unor grupuri, nu a unor individualități. Toți membrii grupurilor selectate au caracteristici similare. Acest tip de prelevare se aplică, în general, atunci când există grupuri formate în mod natural într-o populație țintă. Se aplică adesea în cercetările de piață.

Exemplu: unitățile de depozitare a cerealelor din regiunea X, știind că în regiunea X sunt un număr foarte mare (formează un cluster) de astfel de unități.

Prelevarea sistematică este o metodă de prelevare dintr-o populație în care punctul de pornire este aleatoriu și este fixat un interval de periodicitate a prelevării. În mod normal, se prelevează a fiecare n -a probă dintr-o populație totală (populație țintă).

Exemplu: prelevarea probelor de produse alimentare în cazul importului în condiții speciale (punctul de pornire este aleatoriu, iar frecvența este impusă de legislație).

Prelevarea stratificată - în cazul acesteia, populația țintă se împarte în două sau mai multe subpopulații sau straturi, după diferite criterii. Apoi câte o probă este prelevată din fiecare subpopulație, numărul probelor se însumează și reprezintă proba reprezentativă pentru populația țintă.

Exemplu: pentru produsele alimentare presupuse heterogene, prelevarea se realizează din fiecare porțiune omogenă a lotului.

8.3 Strategii de prelevare a probelor

În conformitate cu “Standard Sample Description for Food and Feed”, ghid elaborat de către Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor (EFSA) în vederea armonizării colectării de date furnizate de statele membre ale UE, privind prezența unor substanțe chimice periculoase sau benefice, în alimente și furaje, se definesc următoarele tipuri de strategii de prelevare:

-Strategia de prelevare obiectivă – care constă în prelevarea unei probe în mod aleatoriu dintr-o populație țintă pentru care se aplică/sunt raportate/sunt valabile rezultatele prelevării. Metoda de prelevare în cadrul acestei strategii poate fi oricare dintre metodele care conduc la rezultate reprezentative pentru populația țintă, respectiv: prelevarea aleatorie, sistematică, stratificată, prelevarea în cluster, prelevarea în etape, etc. În particular, metoda de prelevare include și cazurile în care populația țintă este stratificată în subpopulații și prelevarea se desfășoară pe criteriul proporționalității.

Proba prelevată aleatoriu este o probă prelevată dintr-o populație ale cărei unități au aceeași probabilitate de a fi prelevate. Un termen mai general pentru prelevarea aleatorie este „prelevarea probabilistică” în care fiecare unitate a populației țintă are o probabilitate pozitivă și cunoscută de a fi prelevată. Proba prelevată aleatoriu permite elaborarea unor concluzii bazate pe o evidență statistică, privind populația țintă.

-Strategia de prelevare selectivă – constă în prelevarea unei probe în mod aleatoriu dintr-o subpopulație (sau cel mai adesea din subpopulații) a unei populații țintă pentru care sunt raportate datele. Prelevarea din fiecare subpopulație nu este proporțională: mărimea probei este mai mare, de exemplu, pentru subpopulațiile considerate cu risc crescut. Criteriile utilizate pentru selectarea subpopulației ce se prelevează, se bazează pe informații științifice (rezultatele unor studii științifice, cunoștințe din practicile curente de producție, etc) sau pe informații anterioare (ex: istoricul privind neconformitățile, informațiile transmise prin Sistemul Rapid de Alertă pentru Alimente și Furaje etc).

Datele rezultate prin aplicarea acestei strategii nu permit elaborarea unor concluzii bazate pe evidențe statistice, prin urmare rezultatele nu se referă la întreaga populație țintă. Această strategie furnizează doar date privind subpopulațiile respective.

-Strategia de prelevare la suspiciune –constă în selectarea unui produs individual sau a unei anumite unități din domeniul alimentar în special pentru a confirma sau respinge o suspiciune de neconformitate. Nu constituie o prelevare aleatorie. Datele raportate se referă ele însele la unitățile suspicionate ale populației respective. Rezultatele nu se generalizează și se referă numai la produsul alimentar prelevat sau la unitatea aleasă.

-Strategia de prelevare convenabilă – presupune prelevarea unei probe pentru care unitățile (de populație țintă) sunt selectate numai pe baza fezabilității sau ușurinței de colectare a datelor. Nu este o prelevare aleatorie. Datele raportate se referă la unitățile selectate în conformitate cu această strategie.

(ex: colectarea de date pentru studii științifice la solicitarea EFSA, etc.)

-Strategia census (recensământ) – se aplică atunci când totalitatea populației pentru care sunt raportate datele, este controlată. Dacă este inclus un recensământ al subpopulației în raportarea referitoare la populație, prelevarea referitoare la populație constituie o strategie selectivă.

(ex: datele privind controlul strugurilor importați incluzând un recensământ al strugurilor din Turcia și prelevarea strugurilor din alte țări se raportează astfel: prelevare selectivă pentru struguri și prelevare recensământ pentru struguri din Turcia).

8.4 Tehnica de prelevare a probelor

Prelevarea în vederea determinării conținutului de micotoxine se realizează în conformitate cu Anexa nr. 1 a Regulamentului (CE) Nr. 401/2006 de stabilire a metodelor de prelevare de probe și a metodelor de analiză pentru controlul oficial al conținutului de micotoxine din produsele alimentare (figura 8.1). În plus, Comisia Europeană a furnizat informații suplimentare privind prelevarea pentru controlul oficial al micotoxinelor în “Ghidul pentru autoritățile competente privind controlul conformității cu legislația comunitară cu privire la aflatoxine” precum și în „Ghidul pentru prelevarea cerealelor în vederea determinării micotoxinelor”, care se găsesc la: http://ec.europa.eu/food/chemicalsafety/contaminants/aflatoxins_en.htm .

Echipamentele utilizate în procesul de prelevare a probelor sunt:

- echipamentul individual de protecție folosit de persoana care efectuează prelevarea probelor-trebuie să elimine riscul contaminării accidentale a probelor prelevate. Acesta include: halat, mănuși de unică folosință, mască facială, capelină (bonetă), încălțăminte de protecție;
- instrumente curate folosite pentru prelevarea și transportul probelor la laborator: sonde și sace de diferite dimensiuni, sonde speciale pentru prelevarea lichidelor în vrac. Toate acestea vor fi decontaminate prin introducerea într-o soluție de hipoclorit de sodiu 10% timp de 10-12 ore și apoi clătirea din abundență cu apă distilată.
- recipient sau ambalaje curate (de preferință din hârtie sau pânză), de culoare închisă, pentru prelevarea și transportul probelor. Acestea trebuie să fie curate, uscate, să permită etichetarea și sigilarea în mod corespunzător, pentru a se putea evita contaminarea încrucișată a respectivei probe, de la alte loturi vecine potențial contaminate.
- sigilii și etichete folosite pentru individualizarea probelor prelevate. Când acestea nu sunt disponibile probele se închid cu bandă adezivă însoțită de semnătura persoanei care a realizat prelevarea probelor.

Probele elementare se prelevează din locuri diferite ale lotului astfel încât proba globală să fie reprezentativă pentru lotul care urmează să fie analizat.

Probele globale vor fi reprezentative pentru lotul respectiv și de aceea este necesar ca probele elementare să fie prelevate din puncte diferite ale întregului lot. Aria destinată prelevării de probe sau depozitării produselor respective, nu trebuie să expună produsul nici unui risc de contaminare sau degradare.

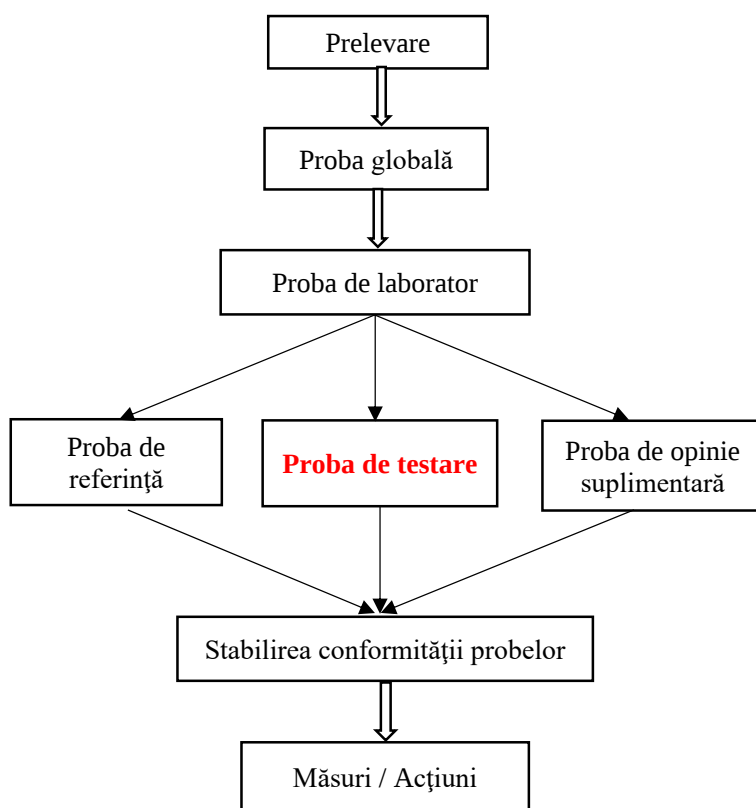


Fig. 8.1 Tehnica de prelevare a probelor
Fig. 8.1 Sampling technique

Proba globală (figurile 8.2, 8.3 și 8.4) este amestecată complet, fiind apoi divizată în probe de laborator. La locul prelevării, proba globală este etichetată clar și sigilată. Proba globală prelevată se depozitează într-un loc răcoros și uscat și se transportă la laborator în timpul cel mai scurt. Aceasta trebuie să ajungă în laborator sigilată și depozitată într-un sac/container opac (deoarece micoxinele pot fi distruse sub influența razelor ultraviolete sau a luminii naturale). În cazul probelor prelevate în ambalaje gata pentru vânzare, produsul nu se scoate din ambalaj înainte de a fi analizat în laborator. Proba/probele de testare sunt analizate de către laborator iar rezultatul acestora este înscris în buletine de analiză, în conformitate cu legislația în vigoare, în termen de max. 10 zile lucrătoare de la recepționarea lor în laborator.



Fig. 8.2 Probe globale (original)
 Fig. 8.2 Global samples (original)



Fig. 8.3. Probe globale (original)
 Fig. 8.3 Global samples (original)



Fig. 8.4 Probă globală (original)
 Fig 8.4 Global sample (original)

Proba pentru opinie suplimentară poate fi păstrată în cadrul laboratorului sau de către operator, în conformitate cu legislația în vigoare. În cazul în care proba pentru opinie suplimentară se păstrează în laborator, timpul de păstrare este:

- până la eliberarea buletinelor de analiză în cazul produselor conforme;
- 1 an în cazul probelor neconforme.

Proba de referință se păstrează în laborator timp de:

- 1 an atunci când probele sunt neconforme;
- până la eliberarea buletinelor de analiză în cazul produselor conforme.

Proba pentru opinie suplimentară și proba de referință sunt separate din probele de laborator omogenizate – conform prevederilor Regulamentului Comisiei (EC) nr. 401/2006 – Anexa I, A.3.6. În cazul produselor destinate consumului uman direct, din fiecare probă de laborator se vor separa: o probă de testare, o probă pentru opinie suplimentară și o probă de referință, în cantitățile prevăzute de bunele practici de laborator (GLP). Pentru fiecare probă globală prelevată dintr-un aliment destinat consumului uman direct, sunt separate nouă probe din probele de laborator omogenizate, din care trei probe sunt utilizate pentru testare, trei probe sunt păstrate pentru opinie suplimentară și trei probe sunt de referință. Deoarece proba pentru opinie suplimentară și cea de referință se obțin din probele de laborator omogenizate, ele pot fi separate numai în cadrul laboratorului.

Stabilirea conformității probelor se face pe baza buletinului de analiză emis de laboratorul care efectuează testarea probei prelevate și care este desemnat pentru controlul oficial al produselor alimentare. Rezultatelor menționate în buletinul de analiză li se aplică corecția pentru recuperare și gradul de incertitudine al măsurării, în conformitate cu Reg. CE 401/2006.

Acceptarea loturilor - proba este *conformă* dacă valoarea înscrisă în buletinul de analiză este mai mică sau egală cu cea prevăzută în Reg. CE 1881/2006 privind nivelurile maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare. În caz că valoarea înscrisă în buletinul de analiză este egală cu limita maximă admisă (LMA), se recomandă monitorizarea următoarelor loturi provenind de la același producător până când rezultatele vor fi conforme cu legislația în vigoare. Proba este *neconformă* dacă valoarea înscrisă în buletinul de analiză este mai mare decât cea prevăzută în Reg. CE 1881/2006. În caz de neconformitate se aplică prevederile stipulate de legislație (art. 12 din Reg. CE 178/2002 privind stabilirea principiilor generale ale siguranței alimentare), recurgându-se la retragerea produselor de pe piață, cu schimbarea destinației acestora, respectiv utilizarea lor în alte scopuri, aplicarea de tratamente speciale sau după caz, chiar la distrugerea produselor neconforme (figura 8.5). Lotul este declarat *acceptat* dacă proba analizată este conformă.

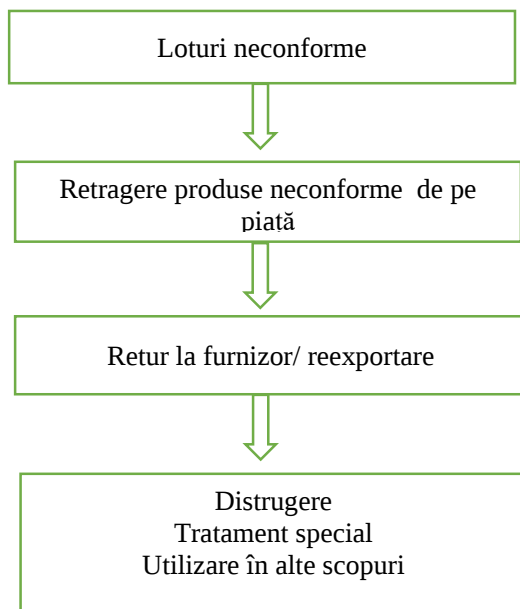


Fig. 8.5 - Măsuri în caz de neconformitate a probelor (www.ansvsa.ro)

Fig. 8.5 Measures in case of evidence non-conformity

CAP. 9. METODE DE DETERMINARE A MICOTOXINELOR

CHAPTER 9. METHODS FOR THE DETERMINATION OF MYCOTOXINS

Laboratorul în care s-au efectuat analizele pentru determinarea micotoxinelor (LSVSA) dispune de proceduri proprii legate de înregistrarea datelor, acestea incluzând etapele de: eșantionare, identificarea persoanei care a executat operațiunea, nivelul de pregătire și specialitatea acesteia, condițiile legate de microclimat la prelevarea probelor, precum și metodele prin care s-au stabilit punctele de prelevare.

Probele de produse prelevate pentru determinarea conținutului de micotoxine au fost analizate în cadrul laboratorului, pe baza kit-urilor de determinare specifice fiecărei micotoxine, pentru interpretarea rezultatelor fiind folosit fotometrul ELISA (Fig. 9.1) și HPLC/LC. Detaliile privind metodologia de lucru și materialele folosite sunt descrise mai jos.



Fig. 9.1 Cititor de microplăci multiscan ELISA (multilab.ro)

Fig. 9.1 Microplate reader multiskan ELISA (multilab.ro)

9.1 Determinarea aflatoxinei B1 utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN AFLATOXINA B1 30/15)

Testul ELISA este utilizat pentru determinarea cantitativă a aflatoxinei B1 din cereale și furaje. Kitul conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei: -cereale/furaje – măcinare, extracție, filtrare și diluare;

-nuci, arahide, condimente – extracție cu coloane de imunoafinitate

Timpul necesar pentru prepararea probei (10 probe) cereale/furaje – aprox. 30 min.; pentru efectuarea testului – aprox. 1h.

Limita de detecție: 1ppb

Reproductibilitate: 80-100%

Reacții încrucișate: Aflatoxina B1 – 100%

Aflatoxina G1 – aprox. 29%

Aflatoxina B2 – aprox. 13%

Aflatoxina G2 – aprox. 3.2%

Aflatoxina M1 – aprox. 1.5%

Utilizare:

RIDASCREEN AFLATOXINA B1 are la bază metoda ELISA competitivă pentru determinarea cantitativă a aflatoxinei B1 din cereale și furaje. Aflatoxina B1 care se întâlnește împreună cu aflatoxina B2, G1 și G2 are cea mai mare toxicitate; se întâlnește în cereale, alune, nuci, semințe oleaginoase, fistic etc.

Principiul testului:

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpii anti-aflatoxina B1. Se adaugă standardele (probele), conjugatul aflatoxină-enzimă. Aflatoxina B1 liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat; conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de undă opțională >600 nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația aflatoxinei din probă.

Compoziția kitului:

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile, căptușite cu anticorpi;
- 6 standarde de aflatoxină B1 (1,3ml fiecare): 0ppt, 1ppb, 5ppb, 10ppb, 20ppb, 50ppb aflatoxina B1 în metanol, gata de utilizare;
- un conjugat (6 ml) peroxidază;
- un anticorp anti-aflatoxină (6ml);
- un substrat /cromogen(10ml);
- o soluție de stopare (14ml);
- o soluție de spălare (sare).

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm), moară, centrifugă, evaporator, shaker, agitator magnetic, pipete Pasteur, pipete gradate, micropipete : 50μl, 100μl

Reactivi: metanol, n-heptan, diclormetan, soluție tampon pentru diluat: PBS, pH 7.2; soluție tampon pentru spălat: PBS tween, pH 7.2. Decontaminarea sticlăriei are loc sub acțiunea hipocloritului de sodiu(10% v/v), peste noapte.

Pregătirea probelor:

Probele trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

- se cântăresc într-un vas 5g probă măcinată și se adaugă 25ml metanol 70%;
- se amestecă 3 minute;
- se filtrează extractul cu ajutorul hârtiei de filtru Whatman nr. 1;
- se diluează 1ml filtrat cu 1ml apă distilată;
- se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

- se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare (40-45 min);
- după utilizare reactivii se reintroduc la frigider.
- nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.
- se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.
- godeurile căptușite cu anticorpi- se extrage numai numărul de godeuri necesare pentru standardele și probele utilizate. Restul godeurilor se sigilează și se păstrează la frigider.
- soluțiile standard sunt gata de utilizat. Se ia în considerare factorul de diluție 10 pentru probe.
- soluția de spălare este conținută în kit. Conținutul este dizolvat într-un litru de apă distilată. Soluția preparată expiră după 4 săptămâni la 4°C. Soluția se poate reconstitui și în 100 ml apă distilată și are o valabilitate de 3 luni. Înainte de lucru se reconstituie numai cantitatea necesară.

Protocol de lucru:

- se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe în suport;
- se adaugă 50μl din fiecare standard și probă;
- se adaugă 50μl conjugat enzimatic în fiecare godeu;
- se adaugă 50μl anticorp anti-aflatoxină în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se lasă la incubat 30 min la temperatura camerei.
- se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos pe o hârtie absorbantă pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl soluție de spălare și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori;
- se adaugă 100μl substrat/cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 15 min. la temperatura camerei (20-25°C);
- se adauga 100μl soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450 nm față de blank-ul de aer. Nu trebuie să se depășească 60 min. după adăugarea soluției de stopare.

Rezultate:

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbanței primului standard și se înmulțește cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

Absorbanța standard (sau proba) X 100 = % absorbanță

Absorbanța zero standard

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de aflatoxină B1 în ng/kg. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în limita 5-20 μg/kg (ppb). Concentrația de aflatoxină în ng/kg corespunzând absorbției fiecărei probe poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare. Pentru a obține concentrația de aflatoxină B1 în μg/kg din probă, concentrația se citește din curba de calibrare.

Sensibilitatea: Limita de detecție este 1 μg/kg (ppb).

Specificitatea: a fost stabilită analizând interferența. Aflatoxina B1 – 100%; Aflatoxina G1 – aprox. 29%; Aflatoxina B2 – aprox. 13%; Aflatoxina G2 – aprox. 3.2%; Aflatoxina M1 – aprox. 1.5%

Reproductibilitatea aflatoxinei B1- proba de cereale contaminate este de 80-100%. Coeficientul mediu de variație este 8%.

9.2 Determinarea aflatoxinelor totale utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN AFLATOXINE TOTALE)

RIDASCREEN AFLATOXINE TOTALE este utilizat pentru determinarea cantitativă a aflatoxinelor totale din cereale și furaje. Kitul conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei: -cereale/furaje: extracție, filtrare și diluție;

-nuci, arahide, condimente: extracție cu coloane de imunoafinitate.

Timpul necesar pentru prepararea probei (10 probe): -cereale/furaje - 30 min.; pentru efectuarea testului –aprox. 45 min.

Limita de detecție: aprox. 1.75 ppb

Reproductibilitate: aprox. 85% ; coeficient de variație 15%

Reacții încrucișate: Aflatoxina B1 – 100%

Aflatoxina B2 – aprox. 200%

Aflatoxina G1 – aprox. 15%

Aflatoxina G2 – aprox. 16%

Aflatoxina M1 – aprox. 63%

Principiul testului :

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi anti-aflatoxină. Se adaugă standardele (probele), conjugatul enzimatic și anticorpii anti-aflatoxină. Aflatoxina liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor căpușiți pe plăcuță (test imunoenzimatic competitiv). În același timp, anticorpii de aflatoxină sunt legați de anticorpii imobilizați. Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat; conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de undă opțională > 600nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația aflatoxinei din probă.

Compoziția kitului:

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile, căpușite cu anticorpi;
- 6 standarde de aflatoxină (1,3ml fiecare) : 0ppb, 0.05ppb, 0.15ppb, 0.45ppb, 1.35ppb, 4.05ppb aflatoxina B1 în metanol;
- un conjugat (6ml) peroxidază concentrată;
- un anticorp anti-aflatoxină (6ml) monoclonal, concentrat;
- un cromogen (10ml), conține tetrametilbenzidină;
- o soluție de stopare (14ml), conține acid sulfuric 1N;
- o soluție tampon de spălare.

Materiale necesare :

Echipament: fotometru microELISA (450nm), moară, shaker, pâlnie și hârtie de filtru, pipete gradate, micropipete : 50μl, 100μl.

Reactivi: metanol.

Pregătirea probelor:

Probele trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

- proba de cereale/ furaje este triturată și amestecată cu ajutorul unui mixer;
- se cântăresc 2g de probă măcinată într-un vas cu capac;
- se adaugă 10ml metanol/apă distilată (70/30) și se amestecă 10min. la temperatura camerei (20-25C/ 68-77F) folosind un shaker;
- se filtrează folosind hârtie de filtru;
- se diluează 100μl de filtrat cu 600μl apă distilată;
- se folosesc 50μl per godeu.

Atenționare: dacă concentrația de aflatoxină se așteaptă să depășească 120ppb, diluarea probei se efectuează în soluție tampon 10% metanol (ex: 9ml soluție tampon + 1ml metanol 100%). Proba folosită trebuie să fie 10% metanol în soluție apoasă. Filtratul poate fi păstrat

la 2-8°C timp de 2 săptămâni și la -20°C timp de 2 luni. Se păstrează într-un vas sigilat și ferit de lumină.

Pregătiri preliminare:

- se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C), înainte de utilizare (40-45min);
- după utilizare reactivii se reintroduc la frigider;
- nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.
- se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.
- soluția de spălat se prepară dizolvându-se conținutul plicului într-un litru de apă distilată. Aceasta este stabilă 4 săptămâni.

Protocol de lucru:

- se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe în suport.
- se adaugă 50μl din fiecare standard și probă;
- se adaugă 50μl conjugat enzimatic în fiecare godeu;
- se adaugă 50μl soluție anticorp diluată în fiecare godeu. Se amestecă manual rotind plăcuța și se incubează 30 min la temperatura camerei (20-25°C);
- se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos pe o hârtie absorbantă pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl soluție de spălare și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori ;
- se adaugă 100μl cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 15 min. la temperatura camerei (20-25°C) ;
- se adaugă 100μl soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450 nm față de blank-ul de aer. Nu se vor depăși 30min după adăugarea soluției de stopare.

Rezultate :

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbanței primului standard și înmulțită cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

$$\frac{\text{Absorbanța standard (sau proba)}}{\text{Absorbanța zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbanță}$$

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de aflatoxină în ng/kg. Pentru a obține concentrația de aflatoxină în ng/kg din probă, concentrația citită din curba de calibrare trebuie înmulțită cu factorul de diluție. Conform standardelor factorul de diluție este 35 pentru cereale/furaje.

9.3 Determinarea ochratoxinei A utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN OCHRATOXINA A)

RIDASCREEN OCHRATOXINA A este utilizat pentru determinarea cantitativă a ochratoxinei A din cereale, furaje, bere. Kitul conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei:- cereale/furaje – extracție, centrifugare, filtrare;

-bere: extracție, centrifugare, filtrare, amestecare, a doua extracție, centrifugare și evaporare.

Timpul necesar pentru prepararea probei (10 probe)- cereale/furaje – aprox. 0.5h ; bere – aprox. 2.5h ; efectuarea testului – 45min.

Limita de detecție: cereale/furaje (9.1.)- 2.5 ppb

cereale/furaje (9.2.)- 1.25 ppb

bere – aprox. 50 ppb.

Reproductibilitate: în cereale/furaje – aprox. 100%

bere – aprox. 100%

Reacții încrucișate: Ochratoxina A - 100%

Ochratoxina C - 44%

Ochratoxina B - 14%

Ochratoxina α - <0.1%

Principiul testului :

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi pentru ochratoxina A. Se adaugă standardele sau probele și conjugatul enzimatic. Ochratoxina A liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat. Conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm. Absorbanța este invers proporțională cu concentrația de ochratoxina A din probă.

Compoziția kitului :

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile, captușite cu anticorpi anti-ochratoxina A;
- 6 standarde de ochratoxina A (1,3ml fiecare) 0ppt, 50ppt, 100ppt, 300ppt, 900ppt, 1800ppt;
- un conjugat (0.7ml) peroxidază concentrată;
- un substrat/cromogen (10ml) conține tetrametilbenzidină;
- o soluție de stopare (14ml) care conține acid sulfuric;
- o soluție tampon (7ml) pentru diluarea conjugatului;
- o soluție tampon de spălare (sare).

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm), centrifugă, evaporator, moară, shaker, agitator magnetic, pâlnie și hârtie de filtru, pipete gradate, pipete Pasteur, micropipete : 20μl, 200μl, 1000μl;

Reactivi: HCl (acid hidrocloric) 1N, diclormetan, soluție tampon NaHCO₃ 0.13M, pH 8.1.

Pregătirea probelor :

Probele trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

Cereale/furaje :

Pregătirea probelor pentru screening (limita de detecție 2.5 ppb):

- proba este triturată și amestecată cu ajutorul unui mixer;
- se cântăresc 5g de probă măcinată într-o eprubetă cu dop ;
- se adaugă 100ml NaHCO₃ 0.13M și se amestecă 15min cu ajutorul unui shaker ;
- se filtrează extractul prin hârtie de filtru sau se centrifughează 15min/3500g/la temperatura camerei ;
- se folosesc 50μl per godeu.

Cereale/furaje:

Pregătirea probelor pentru screening mai sensibil (limita de detecție 1.25 ppb):

- proba este triturată și amestecată cu ajutorul unui mixer;
- se cântăresc 2g de probă măcinată într-o eprubetă cu dop ;
- se adaugă 5ml HCl 1N și se amestecă 5 min. ;
- se adaugă 10ml diclormetan și se amestecă cu putere 15 min. ;
- se centrifughează 15 min/3500g/15°C ;
- se îndepărtează stratul superior apos până la probă ;
- se filtrează întregul strat de diclormetan folosind hârtie de filtru pentru a separa proba și se colectează filtratul într-o eprubetă de centrifugă ;
- se adaugă un volum echivalent de NaHCO₃ 0.13M, pH 8.1 și se amestecă 15 min.;
- se centrifughează 15 min/3500g/15°C ;
- se diluează 100 μl din stratul superior apos cu 400μl NaHCO₃ 0.13M, pH 8,1 ;
- se folosesc 50μl per godeu.

Bere :

- se filtrează berea cu ajutorul hârtiei de filtru;
- se diluează 2ml probă cu 2.5ml HCl 1N și 4ml diclormetan într-o eprubetă cu capac;
- se amestecă 5 min.;
- se centrifughează 15 min. la 3500g la 15°C;
- se îndepărtează stratul superior apos;
- se filtrează stratul diclormetan folosind hârtie de filtru și se colectează într-o eprubetă cu dop;
- se transferă 2ml din stratul de diclormetan într-o eprubetă cu dop;
- se extrage stratul diclormetan cu 2ml NaHCO₃ 0.13M amestecându-se continuu timp de 5 min.;

- se centrifughează 5 min la 3500g la 15°C;
- se colectează stratul superior;
- se repetă extracția și centrifugarea ;
- se combină cele 2 faze NaHCO_3 și se diluează cu 0.75ml HCL 1N și 2ml diclormetan;
- se amestecă 10 min. apoi se centrifughează 5 min./3500g la 15°C ;
- se îndepărtează stratul superior, se folosește stratul diclormetan și se evaporă la 60°C; se poate folosi și barbotarea cu azot.
- se redizolvă reziduul în 1ml NaHCO_3 0.13M;
- se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

- se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare. Se lasă 45 min. ca să ajungă la temperatura camerei.
- după utilizare reactivii se reintroduc la frigider;
- nu se permite uscarea godeurilor între etapele de lucru. Spălarea godeurilor joacă un rol foarte important.
- se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.
- conjugatul enzimatic este concentrat. Deoarece conjugatul enzimatic diluat are o stabilitate limitată se reconstituie numai cantitatea care este necesară. Înainte de pipetare trebuie amestecat. Pentru reconstituire conjugatul enzimatic este diluat 1:11 (1+10) în soluție tampon (ex: 200μl concentrat + 2.0 ml soluție tampon, suficient pentru 4 stripuri).
- soluția tampon pentru spălat este conținută în kit și se diluează într-un litru de apă distilată având o valabilitate de 4-6 săptămâni la 4°C. Pentru o valabilitate mai mare se reconstituie în 100ml apă distilată și se fac diluții ulterioare. Această soluție are valabilitate 4 luni.
- godeurile captușite cu anticorpi -se extrage numai numărul de godeuri care urmează să fie utilizate. Restul godeurilor se sigilează și se păstrează la frigider.

Protocol de lucru :

- se înserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe, în suport;
- se adaugă 50μl standard sau probă;
- se adaugă 50μl conjugat enzimatic diluat în fiecare godeu. Se amestecă rotind placa și se lasă la incubat 30 min. la temperatura camerei, la întuneric;
- se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos pe o hârtie absorbantă pentru eliminarea urmelor de lichid;
- se adaugă 250μl apă distilată și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori;
- se adaugă 100μl substrat/cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 15 min. la temperatura camerei (20-25°C), la întuneric;
- se adaugă 100μl soluție de stopare în fiecare godeu;
- se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450nm față de blank-ul de aer. Se va avea în vedere să nu se depășească citirea, 30 min. după adăugarea soluției de stopare.

Rezultate :

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbanței primului standard și se înmulțește cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

$$\frac{\text{Absorbanța standard (sau proba)}}{\text{Absorbanța zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbanța}$$

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de ochratoxina A în ng/kg. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în limita 75-675 ng/kg (ppt). Concentrația de ochratoxina A în ng/kg, corespunzând absorbției fiecărei probe poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare. Pentru a obține concentrația de ochratoxina A în ng/kg din probă, concentrația citită din curba de calibrare trebuie înmulțită cu factorul de diluție. Conform standardelor, factorul de diluție este: cereale/furaje (9.1.) = 20 ; cereale/furaje (9.2.) = 25 ; bere = 1.

Sensibilitate :

Limita minimă de detecție este de 2,5 ppb. Conform implementării testului, limita de detecție este 625ng/kg (ppt) pentru cereale/furaje ; 25ng/l (ppt) pentru bere.

Specificitate: a fost stabilită analizând interferența.

Interferența: Ochratoxina C - 44%
Ochratoxina B - 14%
Ochratoxina α - <0.1%

Reproductibilitate :

Reproductibilitatea unei probe de cereale este aprox. 100%.

9.4 Determinarea zearalenonei utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN ZEARALENONĂ)

RIDASCREEN ZEARALENONĂ este utilizat pentru determinarea cantitativă a zearalenonei din cereale, produse de panificație (pâine, biscuți, paste făinoase), ulei, bere, lapte, carne, furaje, ser și urină, conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei: cereale/furaje – extracție, filtrare și diluare;
bere –îndepărtarea CO₂ și diluție.

Timpu necesar pentru prepararea probei (10 probe)- cereale/furaje – aprox. 20min; bere – aprox. 10min; efectuarea testului – aprox.2.5h.

Limita de detecție: cereale/furaje- aprox. 1750ppt ; bere – aprox. 250ppt

Reproductibilitate: în cereale/furaje – aprox. 80%

Reacții încrucișate: Zearalenona - 100%

α -Zearalenol - aprox. 41.6%

Zeranol - aprox. 27.7%

β -Zearalenol - aprox. 13.8%

Principiul testului:

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi pentru zearalenonă. Se adaugă standardele sau probele și conjugatul enzimatic. Zearalenona liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat. Conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de undă opțională > 600 nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația zearalenonei din probă.

Compoziția kitului :

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile;
- 6 standarde de zearalenonă (1,3ml fiecare) : 0ppt, 50ppt, 150ppt, 540ppt, 1350ppt, 4050ppt;
- un conjugat (0.7ml);
- un substrat/cromogen (7ml);
- o soluție de stopare (14ml);
- o soluție tampon 1 (50ml);
- o soluție tampon 2 (7ml).

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm); moară; shaker; sticlărie: pahare de 100ml; pâlnie și hârtie de filtru Whatman nr. 1; centrifugă; evaporator; pipete gradate; pipete Pasteur; micropipete: 50 μ l, 100 μ l.

Reactivi: metanol, glucoronidaza, soluție tampon acetat de sodiu 50mM, soluție tampon Tris 20mM pH 8.5/metanol (80/20).

Pregătirea probelor :

Probele (cereale/furaje, produse de panificație) trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

- se cântăresc 5g de probă măcinată într-un container de 25ml de metanol/apă (70/30)
- se amestecă viguros 3 min.;
- se centrifughează 10 min. la 3500 rotații., la temperatura camerei;
- se filtrează folosind hârtie de filtru Whatman nr.1;

- se diluează filtratul 1:7 (1+6) cu soluție tampon pentru diluarea probei (ex: 100μl filtrat și 600μl soluție tampon pentru diluarea probei);
- se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

- se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare. După utilizare reactivii se reintroduc la frigider.
- nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.
- se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.
- conjugatul enzimatic este concentrat. Deoarece conjugatul enzimatic diluat are o stabilitate limitată se reconstituie numai cantitatea necesară. Înainte de pipetare trebuie amestecat. Pentru reconstituire conjugatul enzimatic este diluat 1:11 (1+10) în soluție tampon 2 (ex: 200μl concentrat + 2,0 ml soluție tampon, suficient pentru 4 godeuri).
- godeurile captușite cu anticorpi - se extrage numai numărul de godeuri care urmează să fie utilizate, restul acestora se sigilează și se păstrează la frigider.

Protocol de lucru:

- se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe, în suport ;
- se adaugă 50μl standard sau probă;
- se adaugă 50μl conjugat enzimatic în fiecare godeu. Se amestecă rotind placa și se lasă la incubat 2 ore la temperatura camerei, la întuneric;
- se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos pe o hârtie absorbantă pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl apă distilată și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori;
- se adaugă 50μl substrat și 50μl cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 30min la temperatura camerei (20-25°C), la întuneric ;
- se adaugă 100μl soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450nm față de blank-ul de aer. Se va avea în vedere să nu se depășească timpul de citire (60 min. după adăugarea soluției de stopare).

Rezultate:

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbantei primului standard și înmulțită cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

Absorbanța standard (sau proba) X 100 = % absorbanta

Absorbanța zero standard

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de zearalenonă în ng/kg. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în limita 50-1350 ng/kg (ppt). Concentrația de zearalenonă în ng/kg corespunzând absorbantei fiecărei probe poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare. Pentru a obține

concentrația de zearalenonă în ng/kg din probă, concentrația citită din curba de calibrare trebuie înmulțită cu factorul de diluție. Conform standardelor, factorul de diluție are valoarea 35 pentru cereale/furaje.

Sensibilitate: limita minimă de detecție este de 50ng/kg (ppt). Conform implementării testului, limita de detecție este 1750 ng/kg (ppt) pentru cereale/furaje.

Specificitatea: a fost stabilită analizând interferența.

Interferența: Zearalenonă100%
 α -Zearalenolaprox. 41.6%
 Zeranol.....aprox. 27.7%
 β -Zearalenol.....aprox. 13.8%

Reproductibilitate - în cereale este 80% cu un coeficient mediu de variație de 15%.

9.5 Determinarea fumonisinei utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN FUMONISIN)

RIDASCREEN FUMONISIN este utilizat pentru determinarea cantitativă a fumonisinei din cereale și produse derivate din cereale, conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei: extracție, filtrare și diluare.

Timpul necesar pentru prepararea probei (10 probe)– aprox. 30 min.; efectuarea testului – aprox. 1h.

Limita de detecție: în cereale -aprox 25 ppb

Reproductibilitate: în cereale– aprox. 60%

Reacții încrucișate: Fumonisin B1100%

 Fumonisin B2aprox. 40%

 Fumonisin B3.....aprox. 100%

Principiul testului:

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi pentru anticorpii anti-fumonisină. Se adaugă standardele sau probele, conjugatul enzimatic și anticorpii specifici. Fumonisina liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat; conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de

undă opțională > 600 nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația de fumonisină din probă.

Compoziția kitului:

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile;
- 6 standarde de fumonisină (1,3ml fiecare) 0ppm, 0.025ppm, 0.074ppm, 0.222ppm, 0.666ppm, 2ppm;
- un conjugat (6ml);
- un flacon anticorpi anti-fumonisină (6ml);
- un substrat (10ml);
- un cromogen (7ml);
- o soluție de stopare (14ml);

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm); moară; ultra-turax; sticlărie: pahare de 250 ml și 300ml ; pâlnie și hârtie de filtru Whatman nr. 1; micropipete : 50μl, 100μl, 1000μl.

Reactivi: metanol, metanol 70%, apă distilată.

Pregătirea probelor:

Probele trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

- se cântăresc 5g probă măcinată într-o eprubetă și se adaugă 25ml metanol 70%;
- se amestecă folosind ultra-turax timp de 2 min. sau se amestecă cu putere 3 min..;
- se filtrează extractul folosind hârtie de filtru Whatman nr. 1;
- se diluează proba filtrată 1:14 (1+13) cu apă distilată (ex: 100μl extract + 1.3ml apă);
- se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

-se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare. După utilizare reactivii se păstrează la frigider.

-nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.

-se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.

-godeurile captușite cu anticorpi - folia este tăiată de-a lungul fermoarului. Se extrage numai numărul de godeuri care urmează să fie utilizate. Restul de godeuri se sigilează și se păstrează la frigider.

-soluțiile standard - sunt gata de utilizare (se ia în considerare un factor de diluție 70 pentru probă).

Protocol de lucru:

-se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe, în suport;

-se adaugă 50μl standard sau probă;

-se adaugă 50μl conjugat în fiecare godeu;

-se adaugă 50μl anticorp anti-fumonisină în fiecare godeu. Se amestecă rotind placa și se lasă la incubat 30 min. la temperatura camerei, la întuneric.

-se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos, pe o hârtie absorbantă, pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl apă distilată și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de 2 ori.

-se adaugă 100μl substrat în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 15 min. la temperatura camerei (20-25°C), la întuneric.

-se adaugă 100μl soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450nm față de blank-ul de aer. Se va avea în vedere să nu se depășească 60 min după adăugarea soluției de stopare, până la efectuarea citirii.

Rezultate:

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbanței primului standard și înmulțită cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

Absorbanța standard (sau proba) X 100 = % absorbanța

Absorbanța zero standard

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de fumonisină în mg/kg. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară, în limita 0.074-0.666 mg/kg (ppm). Concentrația de fumonisină în mg/kg corespunzând absorbantei fiecărei probe, poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare.

Sensibilitate: limita minimă de detecție este de 50ng/kg (ppt). Conform implementării testului, limita de detecție este 1750ng/kg (ppt) pentru cereale/furaje.

Specificitatea: a fost stabilită analizând interferența.

Interferența: Fumonisin B1100%

Fumonisin B2aprox. 40%

Fumonisin B3.....aprox. 100%

Reproductibilitatea: unei probe de cereale este aprox. 60%, cu un coeficient mediu de variație de aprox. 8%.

9.6 Determinarea deoxinivalenolului utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN DON)

RIDASCREEN DON este utilizat pentru determinarea cantitativă a deoxinivalenolului din cereale, malț, produse de panificație (pâine, biscuiți, paste făinoase) furaje, bere și must. Kitul conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări. Prepararea probei:-cereale, produse panificație, malț, furaje – extracție, filtrare;

- bere – îndepărtarea CO₂;
- must – nu necesită preparare.

Timpul necesar pentru prepararea probei (10 probe)- cereale, malț, furaje – aprox. 10 min; bere – aprox. 5min; must – poate fi utilizat ca atare; durata de efectuare a testului – 45 min. Limita de detecție: cereale, produse de panificație, malț, furaje - 18.5ppb; bere – 3.7ppb; must – 3.7ppb.

Reproductibilitate: 85-110%

Reacții încrucișate: Deoxinivalenol – 100%

3-Acetildeoxinivalenol > 100%

15-Acetildeoxinivalenol – aprox. 19%

Nivalenol – aprox. 4%

Toxina T-2 - <1%

Principiul testului:

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi anti-DON. Se adaugă standardele sau probele, conjugatul enzimatic și anticorpii anti-DON. DON liber și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). În același timp, anticorpii de DON sunt legați de anticorpii imobilizați. Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat; conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de undă opțională > 600 nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația DON din probă.

Compoziția kitului:

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile;
- 5 standarde de DON (1,3ml fiecare) 0ppb, 3.7ppb, 11.1ppb, 33.3ppb, 100ppb;
- un conjugat (6ml);
- un flacon cu anticorpi anti-DON(6ml);
- un substrat/cromogen (12ml) ;
- o soluție de stopare (12ml);
- o soluție tampon pentru spălat (sare).

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm), moară, shaker, cilindru gradat: 100ml, 1l ; pâlnie și hârtie de filtru Whatman nr. 1 ; pipete gradate; micropipete : 50μl, 100μl, 1000μl.
Reactivi: apă distilată.

Pregătirea probelor:

Probele trebuie păstrate la loc rece, protejate de lumină.

Cereale, produse de panificație, malț, furaje:

-se cântăresc 5g de probă măcinată într-un vas cu capac și se adaugă 25ml apă distilată;

-se amestecă cu putere 3 min.;

-se filtrează folosind hârtie de filtru Whatman nr.1;

-se folosesc 50μl per godeu;

*volumul probei poate fi mărit: 25g cu 125ml apă distilată sau 50g cu 250ml apă distilată

Bere:-se folosește un volum suficient de bere și se îndepărtează CO₂ până când nu se mai formează bule;

-se folosesc 50μl per godeu;

Must:-se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

-se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare. După utilizare aceștia se păstrează la frigider.

-nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.

-se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.

-godeurile căptușite cu anticorpi - se extrage doar numărul de godeuri care urmează să fie utilizate, restul acestora sigilându-se și păstrându-se la frigider.

-soluția tampon pentru spălat- se dizolvă conținutul plicului într-un litru de apă distilată. Aceasta este stabilă 4 săptămâni. Soluția se poate reconstitui în 100 ml apă distilată și are valabilitate 3 luni. Înainte de începerea lucrului se reconstituie volumul care este necesar.

Protocol de lucru:

-se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe, în suport;

-se adaugă 50μl standard sau probă;

-se adaugă 50μl conjugat enzimatic în fiecare godeu;

-se adaugă 50μl soluție anticorp în fiecare godeu. Se amestecă manual rotind plăcuța și se incubează 30 min. la temperatura camerei (20-25°C);

-se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța cu fața în jos pe o hârtie absorbantă pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl soluție tampon pentru spălat și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori.

-se adaugă 100μl (2 picături) substrat/cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 15 min. la temperatura camerei (20-25°C).

-se adaugă 100μl (2 picături) soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450nm față de blank-ul de aer. Nu se vor depăși 60 min. după adăugarea soluției de stopare, până la efectuarea citirii.

Rezultate:

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbantei primului standard și înmulțită cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

Absorbanța standard (sau proba) X 100 = % absorbanță

Absorbanța zero standard

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de DON în $\mu\text{g/kg}$. Concentrația de DON în $\mu\text{g/kg}$ corespunzând absorbantei fiecărei probe, poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare. Pentru a obține concentrația de DON în $\mu\text{g/kg}$ din probă, concentrația citită din curba de calibrare trebuie înmulțită cu factorul de diluție. Conform standardelor, factorul de diluție este: pentru cereale, malț, furaje=5; pentru bere=1; pentru must=1.

Limita de detecție (LOD) a fost obținută prin citirea a 10 probe blank de diferite matrici.

LOD = media concentrațiilor + 2 x deviația standard.

Limita de cuantificare (LOQ) = media concentrațiilor + 10 x deviația standard.

Dacă toate valorile LOD se află sub standardul 2, atunci LOQ poate fi setat ca fiind la standardul 2.

values (ppb), n = 10	wheat	barley	malted barley	oats	corn
mean	26.3	4.6	30.7	78.0	27.6
s.d.	14.1	3.8	15.9	28.2	11.5
LOD	54	12	62	134	51
LOQ	167	42	190	360	143

Specificitatea: a fost stabilită analizând interferența.

Interferența: Deoxinivalenol – 100%

Nivalenol – aprox. 4%

Fusarenon X – <1%

Toxina T-2 - <1%

Accuracy and precision data with spiked wheat samples (n = 90, each level)

fortification (ppm)	0.5	1.0	2.5	5.0
mean (ppm)	0.526	1.0	2.4	4.1
s.d. (ppm)	0.095	0.224	0.240	0.435

Comparative testing of incurred wheat samples with HPLC (reference method)

ELISA	mean	0.841	4.020	2.302
(n = 30)	s.d.	0.156	0.328	0.147
HPLC	mean	0.6	3.88	2.28
(n = 5)	s.d.	0.116	0.503	0.16

Reproductibilitatea - în cereale, malț, furaje, bere este cuprinsă între 85-110%.

9.7 Determinarea toxinei T-2/HT-2 utilizându-se testul ELISA (RIDASCREEN TOXINA T-2/HT-2)

RIDASCREEN TOXINA T-2/HT-2 este utilizat pentru determinarea cantitativă a toxinei T-2/HT-2 din cereale și produse derivate din cereale. Kitul conține reactivii necesari și standardele pentru 96 de determinări.

Prepararea probei: extracție cu metanol

Timpul necesar: pentru prepararea probei (10 probe) – aprox. 30 min.; pentru efectuarea testului – aprox. 1.5h.

Limita de detecție: cereale, furaje <5ppb

Reproductibilitate: aprox. 90%

Reacții încrucișate: Toxina T-2 - 100%

Acetil toxina T-2 - aprox. 114%

Toxina HT-2 - aprox. 7%

Isotoxina T-2 - aprox. 2%

Principiul testului:

Testul se bazează pe reacția antigen-anticorp. Godeurile plăcii au fost marcate cu anticorpi pentru anticorpii anti-toxina T2/HT-2. Se adaugă standardele sau probele, conjugatul enzimatic și anticorpii anti-toxina T-2. Toxina T-2/HT-2 liberă și conjugatul enzimatic intră în competiție pentru situsurile de legare ale anticorpilor (test imunoenzimatic competitiv). Conjugatul enzimatic nelegat este eliminat prin pasul de spălare. Se adaugă în godeuri amestecul substrat-cromogen și se lasă la incubat. Conjugatul enzimatic legat va converti cromogenul în color într-o substanță de culoare albastră. Adăugarea reactivului de stopare va determina virarea culorii de la albastru la galben. Măsurarea se face spectrofotometric la 450 nm (lungime de undă opțională > 600 nm). Absorbanța este invers proporțională cu concentrația de toxină T2 din probă.

Compoziția kitului:

- o microplacă ELISA cu 96 de godeuri detașabile;
- 6 standarde de toxină T-2 (1,3ml fiecare) 0ppb, 0.1ppb, 0.2ppb, 0.4ppb, 0.8ppb, 1.6ppb;
- un conjugat (5ml);
- un flacon cu anticorpi anti-toxină T-2/HT-2 (5ml);
- un substrat (7ml);
- un cromogen (7ml);
- o soluție de stopare (14ml);
- o soluție tampon pentru diluarea probei (50ml).

Materiale necesare:

Echipament: fotometru microELISA (450nm), moară, agitator magnetic, pâlnie și hârtie de filtru, micropipete : 50μl, 100μl, 500μl, 1000μl;

Reactivi: metanol, PBS pH 7.2.

Pregătirea probelor:

- se cântăresc 5g probă măcinată și se dizolvă în 25ml metanol/apă distilată (70/30);
- se amestecă folosind agitatorul magnetic timp de 10 min;
- se filtrează extractul folosind hârtie de filtru;
- se diluează 50μl probă filtrată cu 300μl soluție tampon pentru diluarea probei 1:7 (1+6), cu factor de diluție 35;
- se folosesc 50μl per godeu.

Pregătire preliminară:

- se aduc reactivii la temperatura camerei (20-25°C) înainte de utilizare.
- după utilizare reactivii se reintroduc la frigider.
- nu este permisă uscarea godeurilor între pașii de lucru. Godeurile trebuie spălate foarte bine.
- se evită contactul cu lumina în timpul incubării. Se recomandă acoperirea plăcii.
- godeurile căptușite cu anticorpi - se extrage numai numărul de godeuri care urmează să fie utilizate. Restul godeurilor se sigilează și se păstrează la frigider.

Protocol de lucru:

- se inserează un număr necesar de godeuri pentru standarde și probe în suport;
- se adaugă 50μl standard sau probă;
- se adaugă 50μl conjugat în fiecare godeu;
- se adaugă 50μl anticorp anti-toxina T-2 în fiecare godeu. Se amestecă rotind placa și se lasă la incubat 1h la temperatura camerei, la întuneric;
- se aruncă lichidul și se bate cu putere plăcuța, cu fața în jos pe o hârtie absorbantă, pentru eliminarea urmelor de lichid. Se adaugă 250μl apă distilată și se aruncă lichidul. Se repetă etapa de spălare de două ori;

-se adaugă 50μl substrat și 50μl cromogen în fiecare godeu. Se amestecă rotind plăcuța și se incubează 30min la temperatura camerei (20-25°C), la întuneric;

-se adaugă 100μl soluție de stopare în fiecare godeu. Se amestecă ușor rotind plăcuța și se măsoară la 450nm față de blank-ul de aer. Se va avea în vedere să nu se depășească 60min după adăugarea soluției de stopare.

Rezultate:

Valoarea medie a absorbanțelor obținute pentru standarde și probe este împărțită la valoarea absorbanței primului standard și înmulțită cu 100. Standardul zero este egal cu 100% și valorile absorbanțelor sunt exprimate în procente.

$$\frac{\text{Absorbanța standard (sau proba)}}{\text{Absorbanța zero standard}} \times 100 = \% \text{ absorbanța}$$

Valorile calculate pentru standarde sunt introduse într-un sistem de coordonate pe hârtie semilogaritmică față de concentrația de toxină T-2 în μg/kg. Curba de calibrare ar trebui să fie liniară în limita 0.2-0.8 μg/kg (ppb).

Concentrația de toxină T-2 în μg/kg corespunzând absorbantei fiecărei probe, poate fi citită cu ajutorul curbei de calibrare. Când se lucrează se ține cont de factorul de diluție: cereale/furaje = 35 sau 350. De aceea, curba standard are o limită de 3.5 la 56 μg/kg (ppb) sau 35 la 560 μg/kg (ppb) de toxină T-2 în probele de cereale sau furaje.

Sensibilitate: limita minimă de detecție este de 0.1 μg/kg (ppb). Conform implementării testului, limita de detecție este 3.5 μg/kg (ppb) toxină T-2 în proba de cereale sau furaje.

Specificitatea: a fost stabilită analizând interferența.

Interferența: Toxina T-2100%
Acetil toxina T-2aprox. 114%
Toxina HT-2.....aprox. 7%
Isotoxina T-2.....aprox. 2%

Reproductibilitatea: unei probe de cereale sau furaje este aprox. 90%, cu un coeficient mediu de variație de aprox. 10%.

9.8 Determinarea patulinei utilizând testul HPLC (Cromatografie lichidă de înaltă performanță)

Utilizarea prevăzută:

Coloane cu polimer imprimat molecular (MIP) pentru utilizare împreună cu un HPLC pentru detectarea patulinei în suc de mere și piure de mere.

Informații generale:

Procedura se bazează pe tehnologia polimerului imprimat molecular (MIP), ceea ce face ca testul să fie specific, sensibil, rapid și simplu de efectuat. Coloanele conțin un polimer imprimat molecular specific toxinei de interes. După extracția toxinei, extractul de probă este centrifugat, filtrat și trecut prin coloana MIP. Orice toxină care este prezentă în probă este reținută de MIP în coloană. Coloana este spălată pentru a îndepărta materialul nelegat și toxina este apoi eliberată din coloană după eluare cu solvent. Eluatul este colectat înainte de analiza prin HPLC.

EASIMIP™ PATULIN folosește o procedură care se bazează pe o tehnologie MIP (MIP = polimeri imprimați molecular) și ca urmare, testul poate fi efectuat într-un mod specific, sensibil, rapid și ușor. Coloanele conțin un polimer specific care este specific toxinei care trebuie detectată (paulina). Procedura totală de extracție și curățare durează aproximativ 45 de minute. Rezultatul este o purificare și o concentrare îmbunătățite, a toxinei, din probele alimentare pentru o cromatogramă mult mai clară.

Pregătirea probelor:

Un eșantion reprezentativ trebuie obținut urmând una dintre procedurile de eșantionare recunoscute oficial. Se recomandă ca minim 1 kg de probă reprezentativă să fie măcinată fin și o porțiune (10 - 50 g în funcție de metoda utilizată) să fie îndepărtată și extrasă.

Limita de detecție (LOD): 0.06 ng/kg (ppt)

Evaluare: Se recomandă să se ruleze o curbă de calibrare cu cel puțin 3 - 6 puncte. La construirea unei curbe adecvate, nivelurile standardelor de calibrare trebuie să includă intervalul de rezultate așteptate. Soluțiile standard diluate trebuie preparate proaspete în ziua analizei și utilizate într-o perioadă de 24 de ore.

Pregătirea unei mostre de suc de mere:

- se măsoară 2,5 ml de probă într-un tub de centrifugă;
- se adaugă 2,5 ml de acid acetic 2 %. Se agită puternic timp de 20 de secunde. Coloana nu va fi lăsată să se usuce în timpul etapei de condiționare;
- pentru a condiționa coloana, se trec 2 ml de acetonitril 100 % prin coloană la un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se lasă un strat fin de acetonitril deasupra secțiunii albe a coloanei;
- se trece imediat 1 ml de apă prin coloană cu un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se lasă un strat fin de apă deasupra secțiunii albe a coloanei;
- se trec 4 ml de probă diluată (echivalentul a 2 ml de probă) prin coloană la un debit de 0,5 ml pe minut (1 picătură la fiecare 2 secunde). Un debit lent și constant este esențial pentru captarea toxinei;
- se spală coloana prin trecerea a 1 ml de bicarbonat de sodiu 1 % la un debit de 1 ml pe minut. (1 picătură pe secundă) pentru a îndepărta orice sare și componente ale matricei polare;
- se trec imediat 2 ml de apă prin coloană cu un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se usucă coloana prin trecerea aerului pentru a îndepărta lichidul rezidual.

- sub o hotă, se trec imediat 500 μ l de eter dietilic 100 % prin coloană la un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se usucă coloana prin trecerea aerului pentru a îndepărta lichidul rezidual;
- sub o hotă, se eluează toxina din coloană la un debit de 1 picătură pe secundă folosind 2 ml de 100 % acetat de etil și se colectează într-un tub de sticlă;
- se adaugă 1 picătură (aproximativ 10 μ l) de acid acetic 100 % la eluat. Se agită timp de 20 de secunde;
- se evaporă eluatul la sec sub azot la 35 - 45 °C. Eluatul nu trebuie să fie prea uscat, deoarece aceasta va degrada toxina.
- se reconstituie imediat cu 1 ml de acid acetic 0,1 %. Se agită timp de 20 de secunde;
- se injectează 100 μ l de eluat reconstituit în sistemul HPLC.

Pregătirea unei mostre de piure de mere:

- se cântăresc 10 g de probă într-un tub de centrifugă;
- se adaugă 130 μ l de pectinază și 10 ml de apă. Se vortexează timp de 20 de secunde;
- se incubează timp de 2 ore la 40 °C sau peste noapte la 21 - 25 °C;
- proba diluată se pune la centrifugă la 4.000 rpm, timp de 10 minute;
- se filtrează proba centrifugată printr-un filtru de seringă de 0,2 μ m (celuloză regenerată).
- pentru a condiționa coloana, se trec 2 ml de acetonitril 100 % prin coloană la un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se lasă un strat fin de acetonitril deasupra secțiunii albe a coloanei;
- se trece imediat 1 ml de apă prin coloană cu un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se lasă un strat fin de apă deasupra secțiunii albe a coloanei;
- se trece 5 ml de filtrat (echivalentul a 2,5 g de probă) prin coloană la un debit de 0,5 ml per minut (1 picătură la fiecare 2 secunde). Un debit lent și constant este esențial pentru captarea toxinei;
- se spală coloana prin trecerea a 4 ml de acid acetic 1 % la un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se usucă coloana prin trecerea aerului pentru a îndepărta lichidul rezidual;
- se trec imediat 4 ml de apă cu un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se usucă coloana prin trecerea aerului pentru a îndepărta lichidul rezidual;
- sub o hotă, se trec imediat 500 μ l de eter dietilic 100 % prin coloană la un debit de 1 ml pe minut (1 picătură pe secundă). Se usucă coloana prin trecerea aerului pentru a îndepărta lichidul rezidual;
- sub o hotă, se eluează toxina din coloană la un debit de 1 picătură pe secundă folosind 2 ml de 100 % acetat de etil și se colectează într-un tub de sticlă;
- se adaugă 1 picătură (aproximativ 10 μ l) de acid acetic 100 % la eluat. Se agită timp de 20 de secunde;
- se evaporă eluatul la sec sub azot la 35 - 45 °C. Notă: Asigurați-vă că eluatul nu este prea uscat, deoarece aceasta va degrada toxina.
- se reconstituie imediat cu 1 ml de acid acetic 0,1 %. Se agită la vortex timp de 20 de secunde.

-se injectează 100 µl de eluat reconstituit în sistemul HPLC.

Pregătirea standardelor:

Prepararea soluțiilor stoc de patulină 10.000 ng/ml:

1. Se poate cumpăra pulbere cristalină de patulină de la distribuitori autorizați. Pulberea este reconstituită conform instrucțiunilor furnizate și lăsată peste noapte la întuneric la temperatura camerei pentru a da un concentrat stoc.
2. Acesta este apoi utilizat pentru a prepara o soluție stoc de patulină de 10.000 ng/ml.

Curba de calibrare:

Se recomandă să fie rulată o curbă de calibrare cu cel puțin 3 - 6 puncte. În construirea unei curbe adecvate nivelurile standardelor de calibrare ar trebui să includă gama de rezultate așteptate.

Standardul diluat - soluțiile trebuie preparate proaspete în ziua analizei și utilizate într-o perioadă de 24 de ore.

Pentru a pregăti o curbă de calibrare în patru puncte:

- Standard 5: se iau 200 µl de 10.000 ng/ml și se aduc până la 8 ml cu acid acetic 0,1 % (echivalent cu 250 ng/ml);
 - Standard 4: se iau 5 ml de 250 ng/ml și se adaugă 5 ml de acid acetic 0,1 % (echivalent cu 125 ng/ml).
 - Standard 3: se iau 2 ml de 125 ng/ml și se adaugă 3 ml de acid acetic 0,1 % (echivalent cu 50 ng/ml).
 - Standard 2: se ia 1 ml de 50 ng/ml și adaugă 1 ml de acid acetic 0,1 % (echivalent cu 25 ng/ml).
 - Standard 1: se ia 1 ml de 25 ng/ml și adaugă 1 ml de acid acetic 0,1 % (echivalent cu 12,5 ng/ml).
- se injectează 100 µl din fiecare standard în sistemul HPLC.

CAP.10. REZULTATE ȘI DISCUȚII PRIVIND MICOTOXINELE IDENTIFICATE

CHAPTER 10. RESULTS AND DISCUSSION OF IDENTIFIED MYCOTOXINS

În perioada de studiu, respectiv anii 2015-2020, au fost prelevate și analizate un număr total de 698 de probe de produse agroalimentare de origine vegetală, pentru determinarea micotoxinelor, la nivelul județului Iași. O centralizare a probelor prelevate pentru fiecare parametru analizat și pentru fiecare perioadă studiată, este prezentată în tabelul 10.1.

Centralizatorul probelor analizate pentru determinarea micotoxinelor în perioada 2015-2020

The centralizer of samples analyzed for the dermination of mycotoxins in the period 2015-2020

Tabel 10.1

Parametrul analizat	Anul de analiză						Total probe analizate/ parametru
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	
Aflatoxina B1	27	11	9	14	13	11	85
Aflatoxine totale	27	14	9	14	14	12	90
Deoxinivalenol	34	27	14	21	22	15	133
Zearalenonă	32	21	12	17	23	14	119
Fumonisine	15	8	5	6	8	6	48
Ochratoxina A	27	20	21	26	32	22	148
Patulină	8	6	4	5	5	7	35
Toxina T2+HT2	4	8	7	7	8	6	40
Total probe analizate	174	115	81	110	125	93	698

10.1. Rezultate privind identificarea și monitorizarea aflatoxinei B1

Pe parcursul celor 6 ani de studiu a aflatoxinei B1 a fost analizat un număr total de **85 probe** (tabelul 10.2.), constând atât din produse primare (cereale boabe, fructe uscate) cât și din produse procesate (făină de grâu, mălai, griș din grâu, produse de panificație și patiserie), după cum urmează:

- 26 probe de cereale (grâu, porumb, secară)
- 19 probe de produse derivate din cereale (făină de grâu, mălai, griș)
- 34 de probe de fructe deshidratate (cumale, stafide, caise), arahide, castane și miez de nucă.
- 6 probe de alimente procesate (snacks-uri din porumb, covrigi, croissante, pâine albă).

Probele au fost prelevate din unități de depozitare a produselor alimentare cât și din unități de comerț cu amănuntul a acestora (supermarket-uri). Produsele prelevate au avut atât origine autohtonă cât și comunitară (făină grâu Ungaria, mălai UE, stafide Ungaria, mix de fructe UE) sau extracomunitară (curmale Iran, stafide Turcia, stafide Iran, arahide Argentina, miez de nucă Ucraina, caise și castane Turcia). Rezultatele obținute au fost comparate cu limitele maxime admise prevăzute de Regulamentul CE 1881/2006 care stabilește nivelurile maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare.

Probe analizate pentru determinarea aflatoxinei B1

Samples analyzed for the determination of aflatoxin B1

Tabel 10.2

Nr. crt.	AFLATOXINA B1				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (μg/kg)	Limita legală admisă (μg/kg)
1	grâu boabe	12	2	1,49/1,55	2
2	porumb boabe	10	0	nedetectabilă	5
3	secară boabe	4	0	nedetectabilă	2
4	făină de grâu	12	0	nedetectabilă	2
5	griș din grâu	2	0	nedetectabilă	2
6	mălai	5	0	nedetectabilă	2
7	stafide	8	0	nedetectabilă	2
8	curmale uscate	2	0	nedetectabilă	2
9	caise deshidratate	2	0	nedetectabilă	2
10	castane	3	0	nedetectabilă	2
11	mix de fructe uscate	3	0	nedetectabilă	2
12	arahide	3	0	nedetectabilă	8
13	miez de nucă	13	0	nedetectabilă	5
14	snacks din porumb	1	0	nedetectabilă	2

15	produse de patiserie	2	0	nedetectabilă	2
16	produse de panificație	3	0	nedetectabilă	2
	TOTAL	85	2	-	-

Pentru determinarea contaminării cu aflatoxina B1 au fost analizate 85 probe dintre care cca. 2,4% (2/85 p) au înregistrat valori pozitive pentru această micotoxină (figura 10.1). Acestea au fost prelevate din două unități cu profil de condiționare și depozitare a cerealelor, situate în Vlădeni și Tg. Frumos, fapt care sugerează prezența unei contaminări a produselor agricole primare. Pentru restul probelor analizate, conținutul de aflatoxina B1 a fost nedetectabil, ceea ce semnifică că produsele luate în studiu au fost sigure pentru consumul uman, din punct de vedere a conținutului de aflatoxina B1.

Concluzia generală, pe baza rezultatelor analizelor efectuate, a fost că produsele selectate și analizate, prelevate din unități situate pe teritoriul județului Iași, au fost sigure pentru consumul uman din punct de vedere al conținutului de substanțe cu potențial cancerigen, respectiv aflatoxina B1. Contaminarea cu această micotoxină, care poate să apară la produsele agricole primare, impune acordarea unei atenții sporite asupra analizării acestora, din punctul de vedere a conținutului în micotoxine

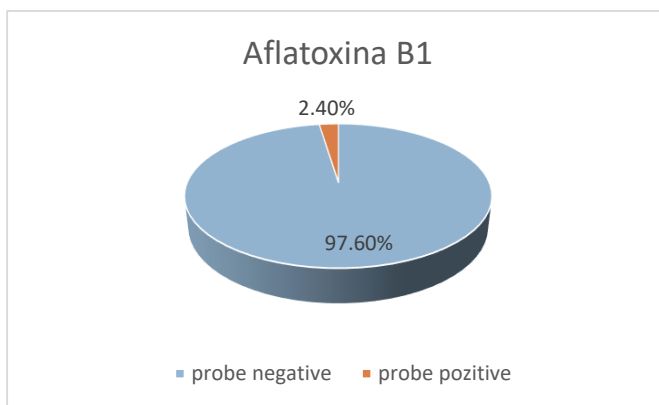


Fig. 10.1 Incidența aflatoxinei B1 în probele analizate
Fig. 10.1 Incidence of aflatoxin B1 in the analyzed samples

10.2 Rezultate privind identificarea și monitorizarea aflatoxinei totale

În perioada celor șase ani de studiu a fost analizat un număr total de **90 probe** de produse agroalimentare (tabel 10.3.), după cum urmează:

- 28 probe de cereale (grâu, secară, porumb)

- 22 probe de produse cerealiere (făină de grâu, mălai, griș)
- 34 probe de fructe deshidratate (curmale, stafide, caise), arahide, miez de nucă, castane
- 6 probe de alimente procesate (pufuleți, covrigi, croissante, pâine albă).

Probele au fost prelevate atât din unități de depozitare a produselor alimentare și a cerealelor, cât și din unități de comerț cu amănuntul a produselor alimentare, de tipul supermarket-urilor, de la nivelul județului Iași. Produsele prelevate au avut atât origine autohtonă, comunitară (făină de grâu Ungaria, mălai UE, stafide Ungaria, mix de fructe UE) și extracomunitară (curmale Iran, stafide Turcia, stafide Iran, arahide Argentina, miez de nucă Ucraina, caise și castane Turcia).

Probele analizate pentru determinarea aflatoxinei totale
Samples analyzed for the determination of total aflatoxin

Tabel 10.3

Nr. crt.	AFLATOXINA TOTALĂ				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (μg/kg)	Limita legală admisă (μg/kg)
1	grâu boabe	13	3	1,50/1,61/1,97	4
2	porumb boabe	11	1	2,65	10
3	secară boabe	4	0	nedetectabilă	4
4	făină de grâu	15	0	nedetectabilă	4
5	griș din grâu	2	0	nedetectabilă	4
6	mălai	5	0	nedetectabilă	4
7	stafide	8	0	nedetectabilă	4
8	curmale uscate	2	0	nedetectabilă	4
9	caise deshidratate	2	0	nedetectabilă	4
10	castane	3	0	nedetectabilă	4
11	mix de fructe uscate	3	0	nedetectabilă	4
12	arahide	3	0	nedetectabilă	15
13	miez de nucă	13	0	nedetectabilă	10
14	snacks din porumb	1	0	nedetectabilă	4
15	produs de patiserie	2	0	nedetectabilă	4
16	produs de panificație	3	0	nedetectabilă	4
	TOTAL	90	4	-	-

Conținutul de aflatoxină totală a probelor analizate a fost foarte scăzut, valorile obținute situându-se cu mult sub limita maximă impusă de legislația în vigoare (Reg. CE 1881/2006).

În anul 2015, pentru două probe din două loturi de grâu provenite de la o unitate de depozitare a cerealelor situată în zona Mircești s-au înregistrat valori pozitive (1,50/ 1,61 $\mu\text{g/kg}$) . De asemenea, în anul 2016 a fost înregistrată o probă de grâu prelevată de la o unitate de depozitare a cerealelor situată în comuna Andrieșeni, cu o valoare mai ridicată a conținutului de aflatoxină totală, respectiv 1,97 $\mu\text{g/kg}$ (tabelul 8.3). În anul 2019, o probă de porumb boabe a înregistrat valoare pozitivă (2.65 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA 4 $\mu\text{g/kg}$), aceasta fiind prelevată dintr-o unitate de depozitare a cerealelor situată în com. Bălțați, Acest fapt semnifică o potențială contaminare a produselor agricole primare, cu influență negativă asupra produselor alimentare obținute din acestea. Pentru restul categoriilor de probe analizate, conținutul de aflatoxină totală a fost nedetectabil, ceea ce denotă că produsele luate în studiu au fost sigure pentru consumul alimentar ulterior.

Din datele prezentate se poate deduce faptul că din totalul probelor analizate, a fost depistat un procent relativ redus de probe pozitive, cca. 4.4% (figura 10.2.), eșalonate temporal astfel: în anul 2015 (cca. 3%), respectiv în anul 2016 (cca.3%) și anul 2019 (cca.1%) comparativ cu anii 2017, 2018 și 2020 în care nu s-au înregistrat valori pozitive ale aflatoxinelor totale în produsele supuse analizelor de laborator.

Concluzia, pe baza rezultatelor de laborator obținute, a fost că produsele agricole primare pot fi potențial contaminate cu aflatoxine totale, acest lucru având un ulterior impact negativ asupra produselor alimentare obținute din acestea, cu eventuale repercursiuni asupra sănătății consumatorilor finali.

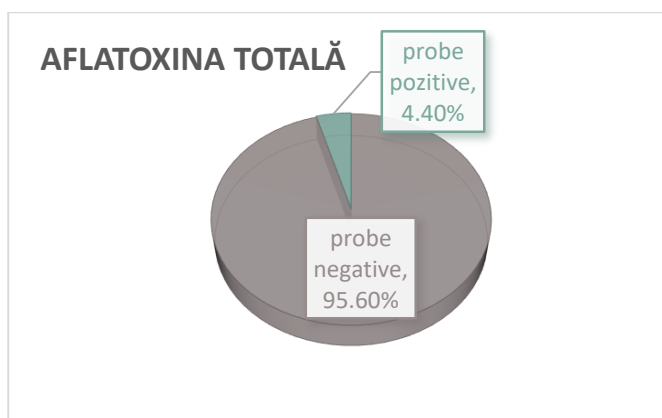


Fig. 10.2 Incidența aflatoxinei totale în probele analizate
Fig. 10.2 Incidence of total aflatoxin in the analyzed samples

10.3 Rezultate privind identificarea și monitorizarea ochratoxinei A

În perioada de efectuare a studiului a fost analizat un numar total de **148 probe de produse** (tabelul 10.4.) pentru depistarea ochratoxinei A, după cum urmează:

- 29 probe de cereale (grâu, porumb, secară);
- 26 probe de produse derivate din cereale (făină de grâu, mălai, gluten din grâu, snacks din porumb);
- 83 probe de băuturi (vin alb, vin roșu, cocktail-uri, suc de struguri);
- 5 probe de cafea prăjită;
- 5 probe de produse de panificație (pâine, biscuiți, paste făinoase).

Probele au fost prelevate din următoarele categorii de unități: depozite de cereale, depozite de produse alimentare, unități de procesare a porumbului, unități de producție a vinurilor din struguri, unități de comercializare a produselor alimentare. Toate aceste obiective sunt situate pe raza județului Iași. Probele prelevate au avut atât origine autohtonă (cereale boabe, snacks din porumb, vinuri, făinuri, mălai, pâine, paste făinoase) cât și proveniență comunitară (mălai UE, vin/cocktail Spania/ Franța, făină de grâu Ungaria, gluten din grâu Franța/Polonia, cafea Italia) și extra comunitară (vin R. Moldova, biscuiți Ucraina).

Probe analizate pentru determinarea ochratoxinei A *Samples analyzed for the determination of ochratoxin A*

Tabel 10.4

Nr. crt.	OCHRATOXINA A				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (µg/kg)	Limita legală admisă (µg/kg)
1	grâu boabe	13	3	1,56/1,56/1,56	5
2	porumb boabe	12	0	nedetectabilă	5
3	secară boabe	4	1	1,56	5
4	făină de grâu	9	0	nedetectabilă	3
5	mălai	9	0	nedetectabilă	3
6	gluten vital din grâu	6	2	4,556/3,5	10
7	pâine albă	3	0	nedetectabilă	3
8	biscuiți	1	1	3,5	3
9	paste făinoase	1	0	nedetectabilă	3
10	vin alb	35	1	0,483	2
11	vin roșu	23	0	nedetectabilă	2

12	băuturi pe bază de vin	10	0	nedetectabilă	2
13	snacks din porumb	2	0	nedetectabilă	3
14	suc de struguri	15	0	nedetectabilă	2
15	cafea	5	0	nedetectabilă	5
	TOTAL	148	8	-	-

Pentru determinarea contaminării cu ochratoxina A a produselor agroalimentare, au fost analizate 148 de probe dintre care, pentru 140 probe conținutul de ochratoxina A a fost nedetectabil. Pentru 8 probe s-au înregistrat valori pozitive ale conținutului de ochratoxina A, prezența acestei micotoxine reprezentând o contaminare a categoriilor de produse atât autohtone cât și cu alte origini, luate în studiu. Conținutul de ochratoxina A al probelor analizate a fost relativ scăzut, valorile obținute situându-se cu mult sub valorile limită impuse de legislația în vigoare.

În anul 2015 au fost înregistrate valori pozitive ale conținutului de ochratoxina A pentru o probă de vin alb origine Spania prelevată dintr-un supermarket situat în municipiul Iași (0,483 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA=2 $\mu\text{g/kg}$), reprezentând 1% din totalul probelor analizate în anul menționat.

În anul 2016 s-au înregistrat valori pozitive ale ochratoxinei A pentru 3 probe de grâu boabe autohton (1,56 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA=5 $\mu\text{g/kg}$) și 1 probă de secară autohtonă (1,56 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA=5 $\mu\text{g/kg}$). Probele provin din unități de condiționare și depozitare a cerealelor de pe raza județului Iași, din arealele de cultură: Mircești, Tg. Frumos, Andrieșeni și Vlădeni. Acestea reprezintă doar un procent de 3% din numărul total de probe analizate în anul de referință.

În anul 2018 s-a înregistrat valoare pozitivă a ochratoxinei A pentru o probă de gluten vital din grâu origine Polonia (4,556 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA= 10 $\mu\text{g/kg}$). Proba a fost prelevată dintr-o unitate de producție a aditivilor și ingredientelor pentru panificație din mun. Iași și reprezintă 1% din numărul total de probe analizate în 2018.

În anul 2019 s-au înregistrat valori pozitive ale ochratoxinei A pentru: o probă gluten vital din grâu origine Polonia (3,5 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA= 10 $\mu\text{g/kg}$) și o probă de biscuiți dulci origine R. Moldova (1,9 $\mu\text{g/kg}$ față de LMA= 3,0 $\mu\text{g/kg}$). Proba de gluten a fost prelevată dintr-o unitate de producție a ingredientelor pentru panificație, iar proba de biscuiți a fost prelevată dintr-o unitate de depozitare a produselor alimentare. Acestea reprezintă un procent de 1% din totalul probelor analizate în anul studiat.

Pentru restul categoriilor de probe analizate, conținutul de ochratoxina A a fost nedetectabil, fapt care denotă că produsele luate în studiu, indiferent de originea acestora, au fost sigure pentru consumul alimentar ulterior.

Așa cum este evidențiat în tabelul 10.5, valorile înregistrate pentru eșantioanele analizate, nu au depășit limitele maxime impuse de legislația specifică (Reg. CE 1881/2006).

Situația probelor pozitive pentru ochratoxina A
Status of positive samples for ochratoxin A

Tabel 10.5

Nr. crt.	Tipul probei	Anul analizei	Zona de proveniență a probei	Valoarea pozitivă înregistrată (μg/kg)	Limita maximă admisă(μg/kg)
1	Vin alb demidulce	2015	Spania	0,483	2
2	Grâu boabe	2016	Mircești	1,56	5
3	Grâu boabe		Tg. Frumos	1,56	
4	Grâu boabe		Vlădeni	1,56	
5	Secară boabe		Andrieșeni	1,56	
6	Gluten din grâu	2018	Polonia	4,556	10
7	Biscuiți dulci	2019	R. Moldova	1,9	3
8	Gluten din grâu		Polonia	3,5	10

Pentru determinarea contaminării cu ochratoxina A au fost analizate 148 de probe dintre care numai cca. 5,4% (8/148 p) au înregistrat valori pozitive pentru această micotoxină (figura 10.3). Produsele agricole primare (grâu, secară) dețin majoritatea în cazul acestui tip de contaminare micotoxică, însă se observă un grad de contaminare și în cazul produselor procesate, pe bază de cereale (gluten din grâu, biscuiți), ceea ce duce la concluzia unei continuități a contaminării, prin procesul de procesare neavând loc neapărat, o diminuare a conținutului micotoxic. Deci, conținutul ridicat de micotoxine al produselor primare se poate transmite și produselor derivate din acestea, chiar în urma unui proces de procesare a lor.

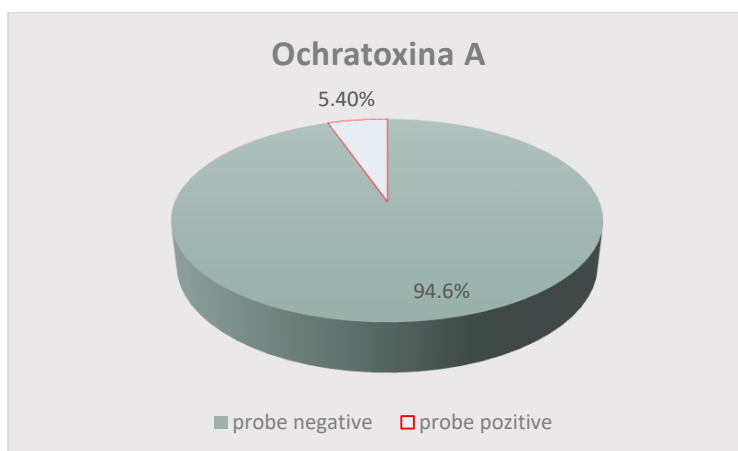


Fig. 10.3. Incidența ochratoxinei A în probele analizate
Fig. 10.3 Incidence of ochratoxin A in the analyzed samples

10.4 Rezultate privind identificarea și monitorizarea zearalenonei

În perioada luată în studiu au fost analizate **119 probe** (tabelul 10.6.) pentru determinarea conținutului în zearalenonă, astfel:

- 28 probe de cereale (grâu, porumb, secară)
- 13 probe de produse derivate din cereale (făină de grâu)
- 46 probe de produse de panificație (pâine diverse sortimente, covrigi, biscuiți)
- 32 probe de cereale pentru mic dejun (cereale mic dejun, fulgi de porumb, snacksuri din porumb) și porumb dulce conservat.

Probele au fost prelevate din următoarele sectoare de activitate desfășurate pe raza județului Iasi: depozitarea cerealelor, morărit, fabricarea pâinii, comercializarea produselor alimentare (hipermarket-uri). Originea produselor prelevate a fost diferită, tocmai pentru ca analiza acestora să fie cât mai vastă: Romania (cereale, făinuri, pâine diverse sortimente, covrigi, biscuiți, fulgi de cereale, pufuleți, popcorn), Ungaria/Polonia (porumb dulce conservat), Cehia/Belgia/UE (fulgi de cereale).

Probe analizate pentru determinarea zearalenonei
Samples analyzed for the determination of zearalenone

Tabel 10.6

Nr. crt.	ZEARALENONA				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (µg/kg)	Limita legală admisă (µg/kg)
1	grâu boabe	13	2	2,87/3,984	100
2	porumb boabe	11	4	2,68/2,68/2,87/2,87	100
3	secară boabe	4	0	nedetectabilă	100
4	făină de grâu	13	2	3,0/5,597	75
5	pâine albă	31	7	2,147/2,153/2,497/ 2,6 2,74/2,953/40,0	50
6	pâine neagră	6	2	4,064/4,064	50
7	pâine integrală	3	1	6,101	50
8	pâine de secară	2	1	6,101	50
8	covrigi	2	1	3,11	50
9	biscuiți	2	0	nedetectabilă	50
10	fulgi de porumb	14	1	5,016	100
11	cereale pentru mic dejun	7	0	nedetectabilă	75
12	porumb dulce în conservă	6	1	2,983	100
13	snacks din porumb	5	2	7,372/10,367	100
	TOTAL	119	24	-	-

În anul 2015 s-au depistat valori pozitive ale conținutului de zearalenonă pentru 16 probe de produse procesate (cca.50%) din totalul de eşantioane luate în studiu (10 probe pâine, 1 proba făină de grâu, 1 probă covrigi, 1 probă fulgi de porumb, 2 probe snacks-uri din porumb, 1 probă de porumb dulce în conservă). Probele au avut origini diferite, fiind prelevate atât din unități de producție a pâinii și produselor de panificație, cât și din unități de comerț cu amănuntul a produselor alimentare, tip supermarket.

În anul 2019 au fost înregistrate valori pozitive ale conținutului de zearalenonă pentru 3 probe de produse primare (cca.13% din totalul probelor analizate) luate în studiu (o probă grâu boabe, 2 probe porumb boabe).

În anul 2020 s-au înregistrat valori pozitive pentru zearalenonă în cazul a 5 eşantioane, după cum urmează: 1 probă grâu boabe, 2 probe porumb boabe, 1 probă făină de

grâu și 1 probă de pâine albă, toate acestea constituind un procent de cca. 35,7% din totalul eșantioanelor studiate în anul de referință.

Așa cum s-a pus în evidență în tabelul 10.7, valorile înregistrate nu au depășit limitele maxime admise impuse de legislația aplicabilă (Reg. CE 1881/2006). Pentru restul probelor analizate în perioada 2016-2018, nu au fost depistate valori pozitive ale conținutului de zearalenonă, acestea situându-se sub limita de detecție stabilită prin metoda de lucru, ceea ce semnifică că produsele luate în studiu nu au prezentat pericole micotoxice pentru consumatori.

Situația probelor pozitive pentru zearalenonă
The situation of positive samples for zearalenone

Tabel 10.7

Nr. crt.	Tipul probei	Anul analizei	Zona de proveniență a probei	Valoarea pozitivă înregistrată (μg/kg)	Limita maximă admisă (μg/kg)
1	snacks din porumb	2015	Belgia	10,367	100
2	snacks din porumb		Belgia	7,372	
3	fulgi din porumb		România	5,016	
4	covrigi		Mun. Iași	3,11	50
5	făină de grâu		Mun. Iași	5,597	75
6	pâine albă			2,497	50
7	pâine albă			2,74	
8	pâine albă			2,953	
9	pâine albă			40	
10	pâine albă			2,153	
11	pâine albă			2,147	
12	pâine de secară			6,101	
13	pâine integrală			6,101	
14	pâine neagră			4,064	
15	pâine neagră			4,064	
16	porumb dulce în conservă		Ungaria	2,983	100
17	grâu boabe	2019	Pașcani	3,984	100
18	porumb boabe		Vlădeni	2,68	100
19	porumb boabe		Bălțați	2,68	
20	grâu boabe		Tg. Frumos	2,87	100

21	porumb boabe	2020	Tg. Frumos	2,87	100
22	porumb boabe		Tg. Frumos	2,87	
23	făină de grâu		Mircești	3,0	75
24	pâine albă		Tg. Frumos	2,6	50

În vederea determinării prezenței zearalenonei în diferitele categorii de produse agroalimentare studiate, au fost prelevate și analizate 119 eșantioane, dintre care au înregistrat valori pozitive un număr de 24 de probe (tabelul 10.7), reprezentând un procent de cca. 20.17% din totalul eșantioanelor analizate (24/119p). Procentul de 79,83% a constituit diferența de probe pentru care nu s-a depistat conținut de zearalenonă (figura nr. 10.4). Produsele agricole primare (grâu, porumb) constituie baza de apariție în cazul acestui tip de contaminare cu zearalenonă, însă se observă un grad ridicat de contaminare și în cazul derivatelor din cereale (făină de grâu, pâine, covrigi, fulgi din porumb etc), ceea ce duce la concluzia unei contaminări în formă continuată. Se observă că procesarea produselor agricole nu duce neapărat la diminuarea conținutului acestora în micotoxine, acest fapt fiind îngrijorător pentru sănătatea consumatorilor.

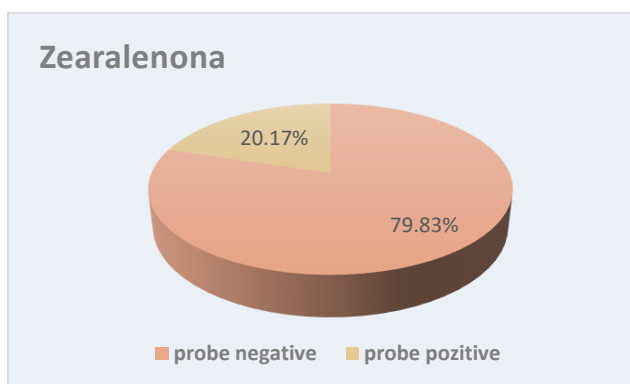


Fig. 10.4. Incidența zearalenonei în probele analizate
Fig. 10.4 Incidence of zearalenone in the analyzed samples

10.5 Rezultate privind identificarea și monitorizarea fumonisinei

În perioada de studiu 2015-2020, a fost analizat un număr total de **48 probe** de produse alimentare (tabelul 10.8), după cum urmează:

- 27 probe de cereale (porumb boabe);
- 21 probe de produse derivate din porumb (cereale mic dejun, fulgi de porumb, snacks din porumb, porumb dulce în conservă).

Probele au fost prelevate din următoarele categorii de obiective: depozite alimentare, depozite de cereale, unități de procesare a porumbului, cât și din unități de

comercializare a produselor alimentare, de tipul supermarket-urilor. Toate aceste obiective s-au situat pe raza județului Iași.

Eșantioanele prelevate au avut atât origine autohtonă (porumb boabe, fulgi de porumb, cereale pentru mic dejun, snacks din porumb) cât și proveniență comunitară (porumb dulce în conservă Ungaria și Polonia, fulgi de porumb Polonia/UE).

Probe analizate pentru determinarea fumonisinei
Sampled analyzed for fumonisin determination

Tabel 10.8

Nr. crt.	FUMONISINA				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (µg/kg)	Limita legală admisă (µg/kg)
1	porumb boabe	27	9	45,36/56,0/82,233/212,87/299,0/431,0/440,0/757,0/854,0	4000
2	fulgi de porumb	12	0	nedetectabilă	1000
3	porumb dulce în conservă	5	0	nedetectabilă	1000
4	snacks din porumb	4	0	nedetectabilă	1000
	TOTAL	48	9	-	-

Din totalul probelor luate în studiu, pentru un număr de 39 dintre acestea, conținutul de fumonisină a fost nedetectabil. Pentru 9 probe de porumb boabe autohton provenit din zonele: Podu Iloaiei, Tg. Frumos, Andrieșeni, Vlădeni, Pașcani, s-au înregistrat valori pozitive ale conținutului de fumonisine, prezența acestora reprezentând o contaminare a produselor agricole primare analizate. Valorile înregistrate (tabelul 10.9) nu au depășit limitele maxime impuse de normele legislative specifice (4000 µg/kg).

În anul 2015 pentru categoriile de probe prelevate și analizate nu s-a detectat conținut de fumonisină.

În anul 2016 au fost înregistrate valori pozitive pentru un număr de 4 probe de porumb boabe (cca. 10% din totalul probelor studiate) care au fost prelevate din depozite de cereale situate în zonele Tg. Frumos, Pașcani, Andrieșeni, Vlădeni.

În anul 2017 s-a depistat conținut pozitiv în fumonisină pentru 2 probe de porumb boabe (cca. 5% din totalul probelor) prelevate din unități de depozitare a cerealelor din zonele Tg. Frumos și Andrieșeni.

În 2018 numai o probă de porumb boabe (cca. 2% din total probe) a prezentat valoare pozitivă pentru acest tip de micotoxine. Proba a provenit din arealul de cultură Tg. Frumos, jud. Iași.

În anul 2019, din totalul eșantioanelor analizate pentru depistarea fumonisinei, doar o probă de porumb boabe (cca.2% din total) a prezentat valoare pozitivă la această micotoxină . Proba a fost prelevată din zona Podu Iloaiei- jud. Iași.

În anul 2020 s-a depistat o singură probă cu valoare pozitivă, constând în porumb boabe provenit din localitatea Vlădeni. Aceasta reprezintă cca 17% din totalul probelor analizate în anul specificat.

Așa cum este evidențiat în tabelul 9.9, valorile înregistrate pentru eșantioanele pozitive nu au depășit limitele maxime impuse de legislația specifică pentru aceste micotoxine (Reg. CE 1881/2006). Pentru restul categoriilor de probe supuse analizelor de laborator, conținutul de fumonisină a fost nedetectabil, fapt care denotă că categoriile de produse luate în studiu au fost sigure pentru consumul alimentar ulterior, indiferent de originea acestora. Se observă faptul că fumonisina s-a manifestat doar în produsele primare, aceasta nefiind detectată în nici un tip de produs procesat.

Situația probelor pozitive pentru fumonisină
Status of fumonisin positive samples

Tabel 10.9

Nr. crt.	Tipul probei	Anul analizei	Zona de proveniență a probei	Valoarea pozitivă înregistrată (μg/kg)	Limita maximă admisă conf. Reg. CE 1881/2007 (μg/kg)
1	porumb boabe	2016	Tg. Frumos	299,0	4000
2	porumb boabe		Pașcani	212,87	
3	porumb boabe		Andrieșeni	854,0	
4	porumb boabe		Vlădeni	56,0	
5	porumb boabe	2017	Tg. Frumos	757,0	
6	porumb boabe		Andrieșeni	431,0	
7	porumb boabe	2018	Tg. Frumos	45,36	
8	porumb boabe	2019	Podu Iloaiei	82,233	
9	porumb boabe	2020	Vlădeni	440,0	

Pentru determinarea contaminării cu fumonisină s-a analizat un număr total de 48 de probe dintre care cca. 18,8% (9/48 p) au înregistrat valori pozitive pentru această

micotoxină (fig. 10.5), diferența de 81,2% fiind libere de fumonisină, conform analizelor efectuate în laborator. Gradul de contaminare pentru această micotoxină a fost semnificativ, fiind detectat exclusiv în produsele primare, respectiv porumb boabe, fumonisina fiind specifică pentru acest produs agricol. În cazul derivatelor din porumb nu s-a înregistrat contaminare cu fumonisină, ceea ce denotă faptul că, în urma procesării porumbului a fost diminuată la maxim eventuala încărcătură micotică a acestuia.

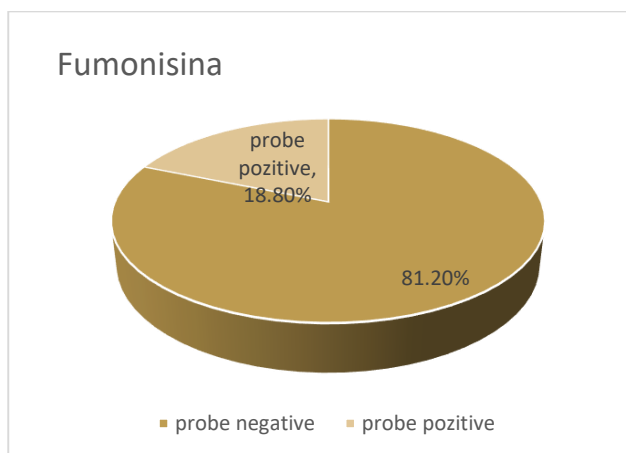


Fig. nr.10.5. Incidența fumonisinei în probele analizate
Fig. 10.5 Incidence of fumonisin in the analyzed samples

10.6 Rezultate privind identificarea și monitorizarea deoxinivalenolului

Pe parcursul celor 6 ani de studiu a fost analizat un număr total de **133 probe** de produse agroalimentare (tabelul 10.10.), respectiv:

- 47 probe de cereale (grâu, porumb, secară)
- 13 probe de produse derivate din cereale (făină de grâu tip 650, făină grâu tip 000)
- 57 probe de produse de panificație (pâine diverse sortimente, covrigi, biscuiți, paste făinoase)
- 16 probe de cereale pentru mic dejun (fulgi de grâu, fulgi de porumb, snacks din porumb).

Probele au fost prelevate din următoarele categorii de unități situate pe raza județului Iași: depozite de cereale, depozite alimentare, unități de producție (morărit, panificație), unități de comerț cu amănuntul a produselor alimentare. Originea produselor prelevate a fost diferită, tocmai pentru ca analiza acestora să fie cât mai vastă: Romania (cereale, făinuri, pâine diverse sortimente, biscuiți, paste făinoase, popcorn), R. Moldova (biscuiți), Bulgaria (paste făinoase), R. Cehă (cereale pentru mic dejun), UE (paste făinoase, cereale pentru mic dejun), Italia (paste făinoase).

Probe analizate pentru determinarea deoxinivalenolului
Samples analyzed for the determination of deoxynivalenol

Tabel 10.10

Nr crt	DEOXINIVALENOL				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (µg/kg)	Limita legală admisă (µg/kg)
1	grâu boabe	13	2	421,21/636,0	1250
2	porumb boabe	32	9	41,0/53,0/69,0/114,0/157,916/170,489/252,267/324,2/446,956	1750
3	secară	2	0	nedetectabil	1250
4	făină de grâu	13	10	21,0/22,0/23,0/82,0/83,0/136,0/242,322/347,353/491,0/593,0	750
5	paste făinoase	23	21	26,0/26,0/30,0/31,2/37,77/38,724/40,0/47,0/57,9/68,0/68,0/74,0/94,0/152,0/206,694/213,0/247,0/318,0/424,0/318,0	750
6	biscuiți	2	1	43,8	500
7	pâine albă	24	17	25,0/25,0/26,2/38,0/43,832/51,0/54,1/69,0/99,0/124,0/124,0/140,0/161,245/226,363/264,0/295,0/405,0	500
8	pâine integrală de secară	2	0	nedetectabil	500
8	covrigi	6	3	31,148/128,0/203,712	500
9	cereale pentru mic dejun	7	6	25,0/26,3/27,0/39,0/57,0/70,0	750
10	fulgi de cereale	8	2	60,0/70,0	750
13	snacks din porumb	1	0	nedetectabil	750
	TOTAL	133	71	-	-

Din totalul probelor luate în studiu, pentru un număr de 62 dintre acestea, reprezentând cca. 46,6% din totalul eșantioanelor analizate, conținutul de deoxinivalenol a fost nedetectabil. Pentru cca. 53,4% din totalul probelor analizate (71/133 p) au fost înregistrate valori ale conținutului de deoxinivalenol, prezența acestuia punând în evidență o contaminare substanțială a categoriilor de produse analizate, de proveniență românească sau cu alte origini.

În anul 2015 s-au înregistrat 31 probe cu valori pozitive pentru deoxinivalenol (4 probe de produse primare – porumb boabe provenit din unități de depozitare din zonele Vlădeni și Pașcani; 27 probe de produse procesate- 2 probe covrigi, 5 probe făină de grâu, 2 probe fulgi de cereale, 5 probe de pâine, 13 probe de paste făinoase).

În anul 2016 s-au înregistrat 7 probe cu valori pozitive pentru deoxinivalenol (1 probă de produs primar – porumb boabe provenit din zona Andrieșeni; 6 probe de produse procesate – 1 probă de pâine, 2 probe de paste făinoase, 1 probă de făină de grâu, 2 probe de cereale mic dejun).

În anul 2017 s-au depistat 6 probe cu valori pozitive pentru deoxinivalenol (2 probe de produse primare – 1 probă de grâu boabe, 1 probă de porumb boabe ambele provenite din zona Tg. Frumos; 4 probe de produse procesate – 2 probe făină grâu, 1 probă de pâine, 1 probă de paste făinoase).

În anul 2018, probele depistate pozitive pentru deoxinivalenol au fost în număr de 7, toate fiind reprezentate numai de produse procesate – 2 probe de pâine, 2 probe de paste făinoase, 2 probe de cereale pentru mic dejun, 1 probă de biscuiți).

În anul 2019 s-au depistat 12 probe pozitive la deoxinivalenol (2 probe de produse primare –porumb boabe ambele provenite din zona Tg. Frumos; 10 probe de produse procesate – 2 probe cereale pentru mic dejun, 1 probă de covrigi, 1 probă de făină de grâu, 4 probe de pâine albă, 2 probe de paste făinoase).

În anul 2020 au avut valori pozitive pentru aceasta micotoxină, un număr de 8 eșantioane: 1 probă de grâu boabe (proveniență Tg. Frumos), 1 probă de porumb boabe (proveniență Bălțați), 1 probă de făină de grâu (proveniență Mircești), 4 probe de pâine albă (mun. Iasi, Mircești) și 1 probă de paste făinoase (mun.Iași). Astfel cum este evidențiat în tabelul 10.11., valorile pozitive înregistrate pentru eșantioanele prezentate mai sus, nu au depășit limitele maxime impuse de legislația specifică (Reg. CE 1881/2006).

Situația probelor pozitive pentru deoxinivalenol
The situation of positive samples for deoxynivalenol

Tabel 10.11

Nr. crt.	Tipul probei	Anul analizei	Zona de proveniență a probei	Valoarea pozitivă înregistrată (μg/kg)	Limita maximă admisă (μg/kg)
1	porumb boabe	2015	Vlădeni	157,916	1750
2	porumb boabe		Vlădeni	252,267	
3	porumb boabe		Pașcani	446,956	
4	porumb boabe		Pașcani	170,489	
5	covrigi		R. Moldova	31,148	500
6	covrigi		România	203,712	
7	făină de grâu		mun.Iași	347,353	750
8	făină de grâu		Deleni-Hârlău	242,322	
9	făină de grâu		Pașcani	136	
10	făină de grâu		Butea	82	
11	făină de grâu		Butea	83	750
12	fulgi de porumb		UE	70	
13	fulgi de porumb		România	70	500
14	pâine		Mun. Iași	161,245	
15	pâine		Hârlău	226,363	
16	pâine		Mun. Iași	25	
17	pâine		Mircești	99	
18	pâine		Mun. Iași	25	750
19	paste făinoase		UE	38,724	
20	paste făinoase		România	206,694	
21	paste făinoase		România	37,77	
22	paste făinoase		Italia	294,946	
23	paste făinoase		Bulgaria	26	
24	paste făinoase		UE	318	
25	paste făinoase		România	68	
26	paste făinoase		România	40	
27	paste făinoase		Bulgaria	26	
28	paste făinoase		România	68	
29	paste făinoase		UE	424	
30	paste făinoase		România	74	
31	paste făinoase		UE	318	

32	cereale mic dejun	2016	UE	57	750
33	cereale mic dejun		România	39	
34	pâine		Mun. Iasi	38	500
35	făină de grâu		Mun. Iasi	22	750
36	paste făinoase		Italia	213	750
37	paste făinoase		Italia	94	
38	porumb boabe		Andrieșeni	114	1750
39	făină de grâu	2017	Mun. Iași	23	750
40	făină de grâu		Mun. Iași	21	
41	pâine		Mun. Iași	43,832	500
42	grâu boabe		Tg. Frumos	636	1250
43	paste făinoase		UE	47	750
44	porumb boabe		Tg. Frumos	41	1750
45	biscuiți	2018	UE	43,8	500
46	fulgi de cereale		România	60	750
47	cereale mic dejun		UE	26,3	
48	pâine		Mun. Iași	26,2	500
49	pâine		Mun. Iași	54,1	
50	paste făinoase		Italia	57,9	750
51	paste făinoase		România	31,2	
52	porumb boabe	2019	Tg. Frumos	69,0	1750
53	porumb boabe		Bălțați	324,2	
54	cereale mic dejun		Polonia	25,0	750
55	cereale mic dejun		Ungaria	27,0	
56	covrigi		Pașcani	128,0	500
57	făină de grâu		Mircești	491,0	750
58	pâine		Mun. Iasi	51,0	500
59	pâine		Mun. Iasi	124,0	
60	pâine		Tg. Frumos	140,0	
61	pâine		Tansa	295,0	
62	paste făinoase		România	30,0	500
63	paste făinoase		Italia	152,0	
64	grâu boabe	2020	Tg. Frumos	421,21	1250
65	porumb boabe		Bălțați	53,0	1750
66	făină de grâu		Mircești	593,0	750
67	pâine albă		Tg. Frumos	124,0	500
68	pâine albă		Mun. Iași	264,0	
69	pâine albă		Mun. Iași	69,0	
70	pâine albă		Mun. Iași	405,0	
71	paste făinoase		Italia	247,0	500

Din datele prezentate reiese faptul că a fost depistat un procent ridicat de probe pozitive, respectiv 53,4% (71/133p) față de numărul total de probe analizate (fig. 10.6). Din analiza rezultatelor se observă o contaminare substanțială a produselor de morărit și panificație, ceea ce relevă faptul că cerealele, respectiv grâul boabe a avut un grad de contaminare ridicat încă din câmp. Metodele de procesare primară a boabelor de grâu nu au putut duce la diminuarea conținutului de micotoxine, astfel încât incidența acestora în produsele procesate să fie cât mai redusă

Concluzia generală este că, pe baza rezultatelor analizelor efectuate pentru produsele selectate, de proveniență diferită, prelevate de pe întreg lanțul alimentar, există un potențial ridicat de contaminare a produselor alimentare cu deoxinivalenol. Trebuie acordată o atenție sporită surselor de contaminare cu această micotoxină, în vederea diminuării pe cât posibil, a prezenței acesteia în produsele alimentare, pentru a se putea înlătura impactul negativ care poate avea loc asupra sănătății umane.

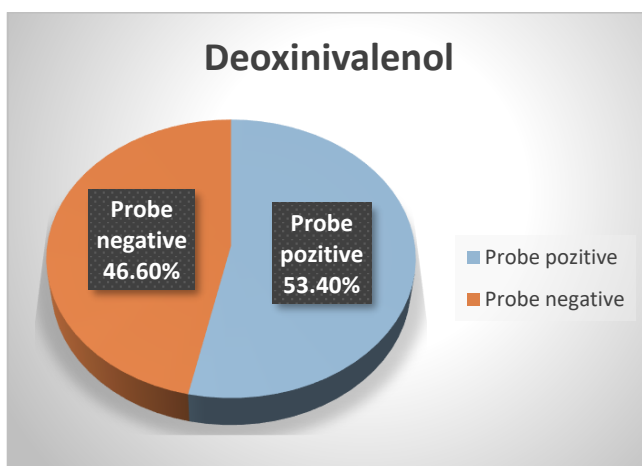


Fig. 10.6. Incidența deoxinivalenolului în probele analizate
Fig. 10.6 Incidence of deoxynivalenol in the analyzed samples

10.7 Rezultate privind identificarea și monitorizarea toxinei T-2/HT-2

În perioada de studiu 2015-2020, au fost prelevate și analizate **40 probe** de produse agroalimentare (tabelul 10.12), după cum urmează:

- 28 probe de cereale boabe autohtone (grâu, porumb, secară)
- 11 probe de cereale pentru micul dejun
- 1 probă snacks din porumb.

Eșantioanele au fost prelevate atât din unități de condiționare și depozitare a cerealelor din zonele Mircești, Tg. Frumos, Vlădeni, Andrieșeni, cât și din unități de comercializare a produselor alimentare (supermarket-uri) de pe raza județului Iași. Originea

produselor luate în analiză a fost atât autohtonă (cereale boabe, cereale pentru micul dejun, snacks din porumb) cât și comunitară (cereale mic dejun UE/Polonia/Cehia), pentru acoperirea unui spectru mai larg în vederea detectării toxinei T2/HT2, aceasta fiind supusă monitorizării de către Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentelor (EFSA), în vederea stabilirii ulterioare a unei limite legale maxime pentru aceasta.

Probe analizate pentru determinarea toxinei T-2/HT-2
Samples analyzed for the determination of T-2/HT-2 toxin

Tabel 10.12

Nr. crt.	TOXINA T-2/HT-2				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (μg/kg)	Limita legală admisă (μg/kg)
1	cereale pentru mic dejun	11	1	33,83	monitorizare
2	grâu boabe	16	0	-	monitorizare
3	porumb boabe	10	1	123,9	monitorizare
4	secară boabe	2	0	-	monitorizare
5	snacks din porumb	1	0	-	monitorizare
	TOTAL	40	2	-	-

Din totalul eșantioanelor analizate s-au depistat doar două probe care au prezentat în componență această micotoxină, respectiv o probă de „musli cu fructe” origine România (33,83 μg/kg), proba fiind prelevată și analizată în anul 2016. Cea de-a doua probă este constituită din porumb boabe producția 2020, provenind din arealul de cultură a comunei Vlădeni (tabelul 10.12.). Din datele prezentate se deduce faptul că a fost depistat un procent nesemnificativ de probe pozitive pentru toxina T2/HT2 (cca. 5%) din totalul probelor supuse analizelor de laborator, acestea situându-se sub limita de detecție stabilită prin metoda de lucru a laboratorului (figura 10.7.). În concluzie, produsele analizate au fost sigure pentru consumul uman, fără a se prejudicia sănătatea consumatorilor.

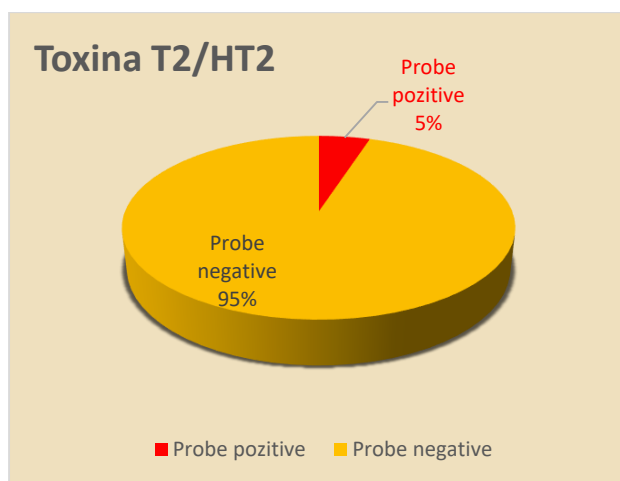


Fig. 10.7. Incidența toxinei T2/HT2 în probele analizate
 Fig. 10.7 Incidence of T-2/HT-2 toxin in the analyzed samples

10.8 Rezultate privind identificarea și monitorizarea patulinei

În perioada supusă studiului (2015-2020) au fost prelevate și analizate **35 de probe** din următoarele categorii de produse (tabelul 10.13):

- 12 probe de sucuri din fructe românești, care au avut ca materie primă principală merele autohtone;
- 1 probă distilat din mere fabricat în municipiul Iași într-o unitate de producție a băuturilor alcoolice;
- 22 probe de produse alimentare pe bază de mere (piure de fructe, gem, mere rase conservate, piure de fructe pentru copii de vârstă mică, suc de fructe pentru copii).

Eșantioanele au fost prelevate atât din unități de fabricare a sucurilor de fructe și băuturilor distilate din fructe, cât și din unități de comercializare a produselor alimentare de pe raza județului Iași. Probele luate pentru studiu au avut atât origine autohtonă (suc de mere, conservă de mere, piure din fructe, distilat din mere, magiun din mere) cât și proveniență comunitară (piure de mere Polonia/Franța/Ungaria, piure de fructe pentru copii Germania/Ungaria/Cehia/Spania/Austria/Franța), în vederea analizării unui spectru cât mai larg de contaminare.

Probe analizate pentru determinarea patulinei
Samples analyzed for the determination of patulin

Tabel 10.13

Nr. crt.	PATULINA				
	Produsul analizat	Nr probe analizate	Nr probe pozitive	Valori înregistrate (µg/kg)	Limita legală admisă (µg/kg)
1	Suc de fructe	12	0	-	50
2	Mere în conservă	3	0	-	25
3	Gem de mere	1	0	-	25
4	Piure de mere pentru copii mici	11	0	-	10
5	Suc de fructe pentru copii	1	1	4,65	10
5	Piure de mere	6	0	-	25
5	Distilat de mere	1	0	-	50
	TOTAL	35	1		-

În anul 2019 s-a înregistrat valoare pozitivă pentru o singură probă de suc de fructe destinat copiilor. Produsul a fost originar din Ungaria (4,65µg/kg), însă rezultatul obținut nu a depășit limita maximă impusă de legislație (LMA=10,0µg/kg). Procentual, proba declarată pozitivă a reprezentat 2,9% din totalul probelor analizate pentru depistarea acestei micotoxine (figura 10.8). Pentru restul eşantioanelor analizate în perioada 2015-2020 nu s-au depistat valori pozitive ale patulinei. În concluzie, toate produsele alimentare luate în studiu, indiferent de origine, au fost sigure pentru consumul uman ulterior, din punct de vedere a conținutului de patulină, produsele fiind lipsite de nocivitate.

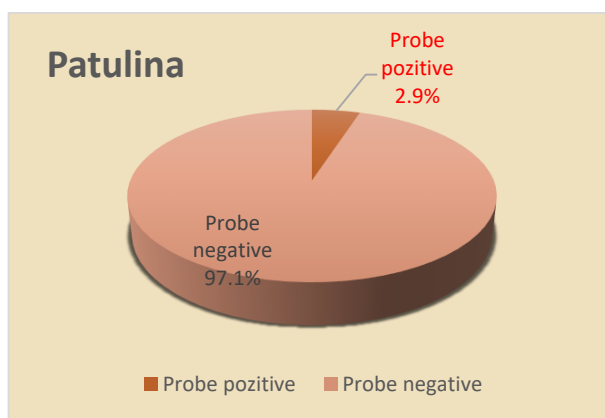


Fig. 10.8 Incidența patulinei în probele analizate
Fig. 10.8 Incidence of patulin in the analyzed samples

CAP. 11. CONCLUZII GENERALE

În întreaga lume, micotoxinele pot constitui un real pericol pentru sănătatea oamenilor și a animalelor. În ultimii ani, există o preocupare în creștere privind riscul expunerii populației la contaminarea cu micotoxine, acumularea acestora în organismul uman ducând la un nivel mare de toxicitate și chiar la carcinogenitate. Uniunea Europeană a demarat o puternică monitorizare a micotoxinelor și cercetarea modului cum se produc, cât și cum se diseminează pe lanțul trofic spre om. Sunt atent cercetate metodele de contaminare a produselor alimentare și a hranei pentru animale.

Concluziile generale desprinse din analiza valorilor procentuale a tuturor micotoxinelor care au înregistrat valori pozitive în eșantioanele prelevate de la nivelul județului Iași (figura 11.1) sunt următoarele:

- incidența majoră în produsele agroalimentare s-a înregistrat pentru deoxinivalenol (53,4%).

- zearalenona s-a manifestat în procent de 20.17% din totalul probelor analizate, urmată îndeaproape de fumonisina cu valoarea procentuală de 18.75%.

- pentru celelalte categorii de micotoxine, procentul de probe pozitive a avut valori mult mai mici, respectiv: 5.41% pentru ochratoxina A, 5% pentru toxina T2/HT2, 4.4% pentru aflatoxina totală, 2,86% pentru patulină și 2,35% pentru aflatoxina B1. Acestea din urmă, nu au constituit o reală îngrijorare din punctul de vedere al siguranței produselor agroalimentare luate în studio și care ulterior au ajuns în alimentația umană sau animală.

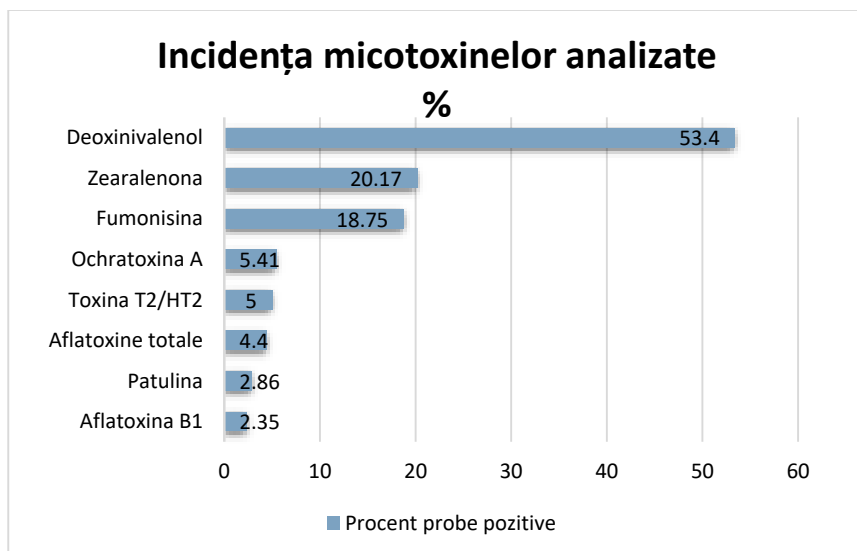


Fig. 11.1. Incidența micotoxinelor în produsele analizate
Fig. 11.1 Incidence of mycotoxins in the analyzed products

Pe parcursul perioadei de studiu, respectiv anii 2015-2020, s-a prelevat și analizat un număr total de: 213 probe de cereale, 138 probe produse derivate din cereale, 145 probe de pâine și produse de panificație, 32 probe de produse oleaginoase, 96 probe de fructe, legume și sucuri de fructe, 5 probe de cafea și 69 probe de băuturi alcoolice.

Din totalul de 698 de probe analizate s-au înregistrat valori pozitive pentru următoarele categorii de eșantioane: 37 probe de cereale, 25 probe de produse derivate din cereale (făinuri panificabile, fulgi de cereale), 56 probe de pâine și produse de panificație, 2 probe de sucuri și 1 probă de vin. Însă, toate valorile pozitive înregistrate s-au încadrat în limitele legislative maxime admise, fără ca acestea să constituie un pericol real pentru siguranța produselor alimentare și implicit pentru sănătatea consumatorilor.

Gradul mare de contaminare s-a înregistrat în cazul eșantioanelor de cereale și produse derivate din acestea, precum și în cazul produselor de panificație, analiza micotoxinelor relevând un nivel mai ridicat și periculos de deoxinivalenol, zearalenonă și fumonisină. Toate valorile înregistrate nu au depășit însă, limitele legislative, prevăzute în Reg. CE 1881/2008. În cereale 17,37% din eșantioane au fost contaminate, în produsele derivate din cereale 18.12% din probe sunt infectate, dar cea mai alarmantă problemă este că, contaminarea micotoxică este prezentă în produsele de panificație, în procent de 38,62% din totalul probelor analizate.

Intervalul de contaminare s-a prezentat astfel:

-la cereale: aflatoxina B1=1,49 - 1,55 μg / kg, aflatoxina totală=1,5 - 1,97 μg / kg; deoxinivalenol=41,0 - 636,0 μg / kg; ochratoxina A= 1,56 μg / kg; fumonisina = 45,36 - 854,0 μg / kg.

- la produsele derivate din cereale: deoxinivalenol= 21,0 - 491,0 μg/ kg; zearalenonă=5,597 μg / kg; ochratoxina A =4,556 μg / kg.

- la produsele de panificație: deoxinivalenol =25,0 - 424,0 μg / kg; zearalenonă = 2,147 - 40,0 μg / kg.

În urma analizei principalelor micotoxine, rezultate care sunt centralizate în tabelul 11.1, s-a evidențiat un nivel ridicat și îngrijorător de deoxinivalenol și zearalenonă în produsele de panificație. Întrucât pâinea și produsele de panificație reprezintă alimente de bază în regimul nutrițional al majorității populației din țara noastră, se impune o monitorizare permanentă și riguroasă a acestor categorii de produse, cu referire la contaminarea micotoxinică.

Centralizatorul rezultatelor privind micotoxinele din produsele alimentare, la nivelul județului Iași în perioada 2015-2020
The centralizer of results regarding mycotoxins in food products, at the level of Iași County in the period 2015-2020

Tabel 11.1

Produs	Total probe analizate (nr)	Total probe contaminate cu micotoxine (nr)	Procent probe contaminate (%)	Număr de probe contaminate							
				Aflatoxină B1 (nr probe)	Aflatoxină totală (nr probe)	Ochratoxina A (nr probe)	Zearalenona (nr probe)	Fumonisina (nr probe)	Deoxinivalenol (nr probe)	Toxina T2/HT2 (nr probe)	Patulina (nr probe)
cereale	213	37	17,37	2	4	4	6	9	11	1	0
derivate din cereale (făinuri, fulgi cereale)	138	25	18,12	0	0	2	4	0	18	1	0
prod. de panificație	145	56	38,62	0	0	1	13	0	42	0	0
produse oleaginoase	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
fructe, legume, sucuri	96	2	2,08	0	0	0	1	0	0	0	1
cafea	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
băuturi fermentate (vin, bere)	69	1	1,45	0	0	1	0	0	0	0	0
Total probe	698	121	-	2	4	8	24	9	71	2	1

Eventuala prezență a micotoxinelor în produsele alimentare, constituie o problemă de securitate sanitară a acestora. Menținerea calității și salubrității produselor alimentare, pentru a se asigura sănătatea oamenilor în urma consumului acestora, reprezintă un obiectiv foarte important care este monitorizat în cadrul sectorului agroalimentar, pe principiul ‘de la furcă la furculiță’. Produsele agricole trec printr-o succesiune de transformări tehnologice, de aceea produsele alimentare finale trebuie să prezinte un risc microbiologic și toxicologic minim sau acesta să fie chiar inexistent.

Referitor la prezența micotoxinelor în produsele alimentare, trebuie avute în vedere următoarele aspecte:

- prevenirea contaminării materiilor prime vegetale și a produselor procesate din acestea, care constă în respectarea condițiilor agrotehnice, de cultivare și recoltare, precum și a condițiilor de depozitare;
- aplicarea bunelor practici agricole (GAP) de către operatorii din domeniu;
- respectarea trasabilității produselor alimentare de-a lungul „lanțului alimentar” în stadiile de producție, procesare, depozitare și distribuție;
- asigurarea sistemului de inspecție minuțioasă a acestor etape, pentru ca riscul de contaminare să fie redus la minim și alimentele care ajung pe masa consumatorilor să fie sigure pentru consum. (Banu, 2007)

O situație generală privind prezența micotoxinelor în produsele alimentare se caracterizează printr-o contaminare pe scară largă, la niveluri scăzute, acest fapt ducând la riscuri pentru sănătatea umană legate doar de expunerea cronică la micotoxine. În același timp, nu trebuie să fie ignorată toxicitatea sinergică a micotoxinelor prezente în mod simultan, în special în cereale și produsele cerealiere. Pentru a se asigura o protecție eficientă a sănătății publice, produsele care conțin contaminanți ce depășesc nivelurile maxime nu trebuie să fie introduse pe piață nici ca atare, nici amestecate cu alte produse alimentare, nici să fie utilizate ca ingrediente în alte produse alimentare.

În ceea ce privește categoriile de alimente specifice, cerealele ar trebui să ocupe locul întâi pe o ipotetică „listă de avertizare”, datorită importanței lor dietetice la nivel european și a nivelului frecvent ridicat de contaminare a acestora.

În vederea protejării sănătății publice, trebuie respectate nivelurile maxime impuse de normele legislative specifice privind contaminarea cu micotoxine pentru produsele agroalimentare. Această abordare garantează că operatorii din sectorul alimentar aplică toate măsurile posibile pentru a preveni sau limita cât mai mult contaminarea, în vederea protejării sănătății consumatorilor și în mod deosebit a categoriilor vulnerabile (copii, persoane în vârstă).

CHAPTER 11. GENERAL CONCLUSIONS

All over the world, mycotoxins can pose a real danger to human and animal health. In recent years, there is a growing concern regarding the risk of population exposure to mycotoxin contamination, their accumulation in the human body leading to a high level of toxicity and even carcinogenicity. The European Union has started a strong monitoring of mycotoxins and research into how they are produced and how they spread through the food chain towards humans. Methods of contamination of food products and animal feed are carefully researched.

The general conclusions derived from the analysis of the percentage values of all mycotoxins that registered positive values in the samples taken from Iași county (figure 11.1) are as follows:

- the major incidence in agro-food products was recorded for deoxynivalenol (53.4%).
- zearalenone appeared in 20.17% of the total analyzed samples, closely followed by fumonisin with a percentage value of 18.75%.
- for the other categories of mycotoxins, the percentage of positive samples had much lower values, respectively: 5.41% for ochratoxin A, 5% for T2/HT2 toxin, 4.4% for total aflatoxin, 2.86% for patulin and 2.35 % for aflatoxin B1. The latter did not constitute a real concern from the point of view of the safety of the agro-food products taken in the studio and which later ended up in human or animal food.

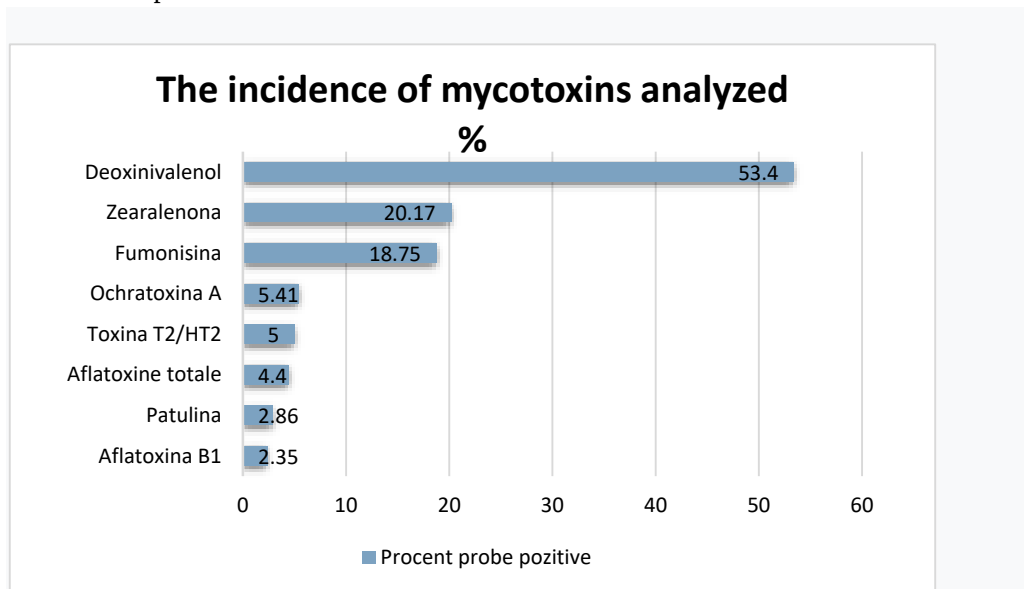


Fig. 11.1 Incidence of mycotoxins in the analyzed products

During the study period, namely the years 2015-2020, a total number of: 213 cereal samples, 138 samples of products derived from cereals, 145 samples of bread and bakery

products, 32 samples of oil products, 96 samples of fruits, vegetables and fruit juices, 5 samples of coffee and 69 samples of alcoholic beverages.

From the total of 698 analyzed samples, positive values were recorded for the following categories of samples: 37 samples of cereals, 25 samples of products derived from cereals (baking flour, cereal flakes), 56 samples of bread and bakery products, 2 juice samples and 1 wine sample. However, all the positive values recorded were within the maximum legal limits allowed, without them constituting a real danger for the safety of food products and implicitly for the health of consumers.

The high degree of contamination was recorded in samples of cereals and products derived from them, as well as in the case of bakery products, mycotoxin analysis revealing a higher and dangerous level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisin. However, all the recorded values did not exceed the legislative limits, provided in Reg. CE 1881/2008. In cereals 17.37% of the samples were contaminated, in products derived from cereals 18.12% of the samples are infected, but the most alarming problem is that mycotoxic contamination is present in bakery products, in percentage of 38.62% of the total analyzed samples.

The contamination interval was as follows:

- in cereals: aflatoxin B1=1.49 - 1.55 µg / kg, total aflatoxin = 1.5 - 1.97 µg / kg; deoxynivalenol=41.0 – 636.0 µg/kg; ochratoxin A= 1.56 µg/kg; fumonisin = 45.36 – 854.0 µg / kg.
- for products derived from cereals: deoxynivalenol= 21.0 – 491.0 µg/kg; zearalenone=5.597 µg/kg; ochratoxin A =4.556 µg / kg.
- for bakery products: deoxynivalenol = 25.0 – 424.0 µg / kg; zearalenone = 2.147 – 40.0 µg / kg.

Following the analysis of the main mycotoxins, the results of which are centralized in table 11.1, a high and worrying level of deoxynivalenol and zearalenone was revealed in bakery products. Since bread and bakery products are basic foods in the nutritional regime of the majority of the population in our country, a permanent and rigorous monitoring of these categories of products is required, with reference to mycotoxin contamination.

The possible presence of mycotoxins in food products constitutes a problem of their sanitary security. Maintaining the quality and sanitation of food products, in order to ensure the health of people following their consumption, is a very important objective that is monitored within the agri-food sector, on the principle of 'fork to fork'. Agricultural products go through a succession of technological transformations, therefore the final food products must present a minimal or even non-existent microbiological and toxicological risk.

Regarding the presence of mycotoxins in food products, the following aspects must be taken into account:

- prevention of contamination of plant raw materials and products processed from them, which consists in observing agrotechnical, cultivation and harvesting conditions, as well as storage conditions;
- application of good agricultural practices (GAP) by operators in the field;
- respecting the traceability of food products along the "food chain" in the stages of production, processing, storage and distribution;

-ensuring the thorough inspection system of these stages, so that the risk of contamination is reduced to a minimum and the food that reaches consumers' tables is safe for consumption. (Banu, 2007)

The general situation regarding the presence of mycotoxins in foodstuffs is characterized by widespread contamination at low levels. This leads to risks to human health related only to chronic exposure to mycotoxins. At the same time, the synergistic toxicity of mycotoxins present simultaneously, especially in cereals and cereal products, should not be ignored. In order to ensure effective protection of public health, products containing contaminants exceeding the maximum levels must not be placed on the market as such, nor mixed with other foodstuffs, nor used as ingredients in other foodstuffs.

Regarding specific food categories, cereals should be at the top of a hypothetical "warning list", due to their dietary importance at European level and their frequently high level of contamination.

In order to protect public health, the maximum levels imposed by the specific legislative norms regarding mycotoxin contamination for agri-food products must be respected. This approach guarantees that operators in the food sector apply all possible measures to prevent or limit contamination as much as possible, in order to protect the health of consumers and especially vulnerable categories (children, elderly people).

Centralizatorul rezultatelor privind micotoxinele din produsele alimentare, la nivelul județului Iași în perioada 2015-2020
The centralizer of results regarding mycotoxins in food products, at the level of Iași County in the period 2015-2020

Tabel 11.1

Produs	Total probe analizate (nr)	Total probe contaminate cu micotoxine (nr)	Procent probe contaminate (%)	Număr de probe contaminate							
				Aflatoxină B1 (nr probe)	Aflatoxină totală (nr probe)	Ochratoxina A (nr probe)	Zearalenona (nr probe)	Fumonisina (nr probe)	Deoxinivalenol (nr probe)	Toxina T2/HT2 (nr probe)	Patulina (nr probe)
cereale	213	37	17,37	2	4	4	6	9	11	1	0
derivate din cereale (făinuri, fulgi cereale)	138	25	18,12	0	0	2	4	0	18	1	0
prod. de panificație	145	56	38,62	0	0	1	13	0	42	0	0
produse oleaginoase	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
fructe, legume, sucuri	96	2	2,08	0	0	0	1	0	0	0	1
cafea	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
băuturi fermentate (vin, bere)	69	1	1,45	0	0	1	0	0	0	0	0
Total probe	698	121	-	2	4	8	24	9	71	2	1

BIBLIOGRAFIE BIBLIOGRAPHY

1. Abrunhosa L., Paterson R. and Venâncio A. 2010, *Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination*. *Toxins*, **2**: 1078-1099.
2. Abbas M. et al., 2013, Biodiversity effects on plant stoichiometry, *PLoS ONE* **8**: e58179.
3. Adam G. et al., 2003, *Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* **278**:47905-47914.
4. Ahn J.Y. et al., 2010, *Developments in mycotoxin analysis: An update for 2010-2011*, *World Mycotoxin Journal* **5**(1) 3-30
5. Aprodu I. & Banu I., 2015, *Co-occurrence of fumonisins and T-2 toxins in milling maize fractions under industrial conditions*, *Journal of food*
6. Ariño A. et al., 2007, *Influence of agricultural practices on the contamination of maize by fumonisin mycotoxins*, PMID: 19435247
7. Andersen B., Smedsgaard J. and Frisvad J.C., 2004 *Penicillium expansum: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products*, *J. Agric. Food Chem.* **52**:24212428.
8. Aziz N.H. et al. 1997, *Composition of some crops seeds on aflatoxin B1 production by Aspergillus flavus*, jssae.journals
9. Banu C. ș.a., 2007, *Suveranitate, securitate și siguranță alimentară*, Ed. ASAB, București
10. Battilani P. et al., 2008, *Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change*, *National Library of Medicine* PMID: 27066906
11. Beckett S.T., 1994, *Industrial Chocolate Manufacture and Use 2nd edition*, Blackie Academic & Professional/Chapman & Hall, London
12. Begum F. and Samajpati N., 2000, *Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds*, *Naturwissenschaften* **87**:275- 277
13. Benigni A., 2016, *Occurrence of Mycotoxins in Harvested Maize in Kenya and Tanzania and Postharvest Control by Photosensitisation*, A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at The University of Queensland in 2016
14. Bennett G.A., Richard J.L. et Eckhoff S.R., 1996, *Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **392**, 317-22
15. Bensassi F., Gallerne C., Sharaf el dein O., Hajlaoui M. R., Lemaire C., & Bacha H., 2014, *In vitro investigation of toxicological interactions between the fusariotoxins deoxynivalenol and zearalenone*. *Toxicon*, **84**, 1– 6.
16. Berca M., 2011, *Micotoxinele, o problemă veche dar nouă pentru siguranța alimentară*, Ed. Ceres, București

17. Brădăţan Gh., 2007, *Siguranţa alimentelor*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iaşi
18. Broggi L.E. et al., 2002, *Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina*, Food Additives&Contaminants vol.19
19. Bryla D.R. ş.a., 2014, *Effects of nitrogen rate and application method on early production and fruit quality in highbush blueberry*, Canadian Journal of Plant Science
20. Brooker D.B. et al., 1992, *Drying and storage of grain and oilseeds*. New York, An AVI Book, Van Nostrand Reinhold.
21. Binder E.M., *Managing the risk of mycotoxins in modern feed production*, Anim Feed Sci Technol. 133:149–166. 2007
22. Bullerman L.B. & Bianchini A., 2007, *Stability of mycotoxins during food processing*, International Journal of Food Microbiology, 119, 140–6.
23. Carraturo Federica ş.a., 2018, *Comparative assessment of the quality of commercial black and green tea using microbiology analyses*, BMC Microbiology, volume 18
24. Castegnaro M. şi Pfohl-Leszkowicz Annie, 1999, *Endemic nephropaty and urinary tract tumours in the Balkans*, Cancer Research, 47: 3608–3609.
25. Castelo, M.M., Sumner S.S. and Bullerman L.B., 2001, *Occurrence of fumonisins in corn-based food products*, J. Food Prot. 61:704-707.
26. Cavin C. et al., 2007, *Reduction in Antioxidant Defenses may Contribute to Ochratoxin A Toxicity and Carcinogenicity*, Toxicological Sciences, Vol. 96, Issue 1, Pages 30–39
27. Chakrabarti D.K. and Ghosal S., 1986, *Occurrence of free and conjugated 12,13-epoxytrichothecenes and zearalenone in banana fruits infected with Fusarium moniliforme*, Appl. Environ. Microbiol. 51:217-219.
28. Chulze S.N. et al., 2010, *Fusarium and fumonisin occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages*, J. Agric. Food Chem. 44:2797-2801.
29. Coman I., Popescu O., 1985, *Micotoxine şi micotoxicoze*, Ed. Ceres, Bucureşti
30. Cotuna Otilia, Popescu Gh., 2009, *Securitatea şi calitatea produselor vegetale, siguranţa vieţii*, Ed. Mirton, ISBN 978-973-52-0571-3
31. Derache R., 1988, *Micotoxins*, Med. et Nut
32. Delage N., d'Harlingue A., Colonna Ceccaldi B. and Bompeix G., 2003, *Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine*, Food Contr. 14:225-227
33. D'Mello J.P.F., Porter J.K., Macdonald A.M.C. and Plăcintă C.M., 1997, *Fusarium mycotoxins*. In: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants* (J.P.F.D'Mello, ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 287-301.
34. Diana Di Mavungu et al., 2009, *LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements*, Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment 26(6):885-95
35. Dörrenhaus A., Flieger A., Golka K., Schulze H., Albrecht M., Degen G.H. and Föllmann W., 2000, *Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin Ochratoxin A*, Toxicology Science 53:271–277
36. Dragan Y. P., Bidlack W. R., Cohen S. M., Goldsworthy T. L., Hard G.C., Howard P.C., Voss K. A., 2001, *Implications of apoptosis for toxicity, carcinogenicity, and*

- risk assessment: *Fumonisin B(1)* as an example, *Toxicological Sciences*, **61**(1), 6– 17.
37. Drusch S. and Ragab W., 2003, *Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits*, *J. Food Prot.* 66:1514-1527.
 38. Duarte S.C., Pena A. and Lino C.M., 2010, *A review on Ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products*, *Food Microbiol.* 27:187–198.
 39. Dunkel F., 1988, *Incorporating cultures' role in the food and agricultural sciences*, Academic Press
 40. Dunnick J.K., Elwell M.R., Huff J. and Barrett J.C., 1995, *Chemically induced mammary gland cancer in the National Toxicology Program's carcinogenesis bioassay*, *Carcinogenesis*. 16:173–179
 41. Frisvad J.C. and Thrane U., 1996, *Mycotoxin production by foodborne fungi*. In: *Introduction to Food-Borne Fungi* (R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg, eds). Centraalbureau voor Schimmelcultures: Baarn, The Netherlands, 5th Edition, pp. 251-260
 42. Gallaz L. and Stalder R., 1976, *Ochratoxin A in Kaffee*. *Chem. Microbiol. Technol., Lebensm.* 4:147-149.
 43. Gamanya, R. and L. Sibanda. 2001 *Survey of Fusarium moniliforme (F. verticillioides) and production of fumonisin B1 in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe* *Int. J. Food Microbiol.* 71:145-149
 44. Hagler W.M., Towers N.R., Mirocha C.J., Eppley R.M., and Bryden W.L., 2001, *Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen?*, p. 321-331. In B. A. Summerell, J. F. Leslie, D. Backhouse, W. L. Bryden, and L. W. Burgess (ed.), *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium. APS Press, St. Paul, Minn
 45. Harrison T., 2003, *The importance of quality from an international confectionery industry viewpoint. ICCO international seminar on quality and financial aspects of the cocoa campaign, Abidjan, 17-19 May 2000*. Probert, T. Officials deride EU ochratoxin regulations. *Public Ledger*, (72, 336), 4, 1 September 2003.
 46. Hesseltine C.W., Shotwell O.L., Ellis J.J. and Stubblefield R.D., 1966. *Aflatoxin formation by Aspergillus flavus*, *Bacteriol. Rev.* 30:795-805.
 47. Huang T, et al., 2007, *Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China*, *Food Addit Contam.* 24:181–185
 48. Jalili and Jinap, 2012, *Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili*, *Food Control* vol. 24, Issues 1-2,160-164
 49. Jackson L.S., Beacham-Bowden T., Keller S.E., Adhikari C., Taylor K.T., Chirtel S.J. and Merker R.I., 2003, *Apple quality, storage and washing treatments*
 50. Jouany J.P., 2009, *Journal of Microbiological Methods*, 77(1), 8-16
 51. Karlovsky P. et al., 2016, *Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination*, *Mycotoxin Res.* 32 (4): 179-205
 52. Kershaw S.J., 1982, *Occurrence of aflatoxins in oilseeds providing cocoa-butter substitutes*, *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1210-1212

53. Khaneghah A.M. et al., 2019, *The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products*, Fungal Biology, vol 123, 611-617
54. Kuiper-Goodman T., Scott P.M. and Watanabe H., 1987, *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone*, Reg. Toxicol Pharmacol. 7:253–306.
55. Kuiper-Goodman, T., 1995, *Mycotoxins: risk assessment and legislation*. Toxicol. Lett.82-83:853-859.
56. Larsen T.O., Frisvad J.C., Ravn G. and Skaaning T. , 1998. *Mycotoxin production by Penicillium expansum on black currant and cherry juice*. Food Addit. Contam. 15:671–675.
57. Laslo C., 1995, *Elemente de ecotoxicologie*, Academic Press, Cluj-Napoca, 132, 32-40;
58. Leblanc J.C., Malmauret L., Delobel D. and Verger P., 2002, *Simulation of the exposure to deoxynivalenol of French consumers of organic and conventional foodstuffs*, Reg. Toxicol Pharmacol, 36: 149-154
59. Leggott N. H., 2000, *Occurrence of patulin in commercial processing of apple juice*, South African Journal of Science, 96:241-243
60. Levi C.P., Trenk H.L. and Mohr H.K., 1974, *Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans*, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57:866-870.
61. Lioi M.B., Santoro A., Barbieri R., Salzano S. and Ursini M.V., 2004, *Ochratoxin A and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes*, Mutat Res. 557:19–27
62. Lu S.H., Hsieh L.L., Luo F.C. and Weinstein I.B., 1988, *Amplification of the EGF receptor and c-myc genes in human esophageal cancers*, Int J Cancer. 42:502–505
63. MAFF., 1999, *1998 survey of retail products for ochratoxin A*. Food Surveillance Information Sheet No. 185
64. MacDonald, S., P. Wilson, K. Barnes, A. Damant, R. Massey, E. Mortby and M.J.Shepherd, 1999, *Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey*. Food Addit. Contam. 16:253-260.
65. Magan N. and Aldred D., 2007, *Post-harvest control strategies Minimizing Mycotoxins in the food chain*, Int. J. Food Microbiology 119:131-139
66. Mahfoud R., Maresca M., Garmy N., and Fantini, J. , 2002, *The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: Mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione*, Toxicology and Applied Pharmacology, 209– 218
67. Majerus, P., Bresch H. and Otteneder H., 2000, *Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings*, Arch. Lebensmittelhygiene 51:85-97.
68. Malir J. et al., 2014, *Transfer of Ochratoxin A into Tea and Coffee Beverages*, Toxins 2014, 6(12), 3438-3453
69. Marasas W.F., van Rensburg S.J. and Mirocha C.J., 1979, *Incidence of Fusarium species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei*, J Agric Food Chem. 27:1108–1112

70. Marasas, W.F., 1995, *Fumonisin: their implications for human and animal health*, Nat. Toxins 3:193-198.
71. Marin-Kuan M., Nestler S., Verguet C., Bezençon C., Piguet D., Mansourian R., Holzwarth J., Grigorov M., Delatour T., Mantle P. et al., 2006, *A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of Ochratoxin A carcinogenicity in rat*, Toxicol Science 89:120–134
72. Majerus P., Rosner H. and Scheuer R., 2000, *Burden of ochratoxin A in food and in the consumer*. Final report JECFA 47
73. Markaki P., Delpont-Binet C., Grosso F. and Dragacci S., 2001, *Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography*, J. Food Prot. 64:533-537.
74. Martins M.L., Gimeno A., Martins H.M. and Bernardo F., 2002, *Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots*, Food Addit. Contam. 19(6):568-574.
75. Măruțoiu C., Tofană M., 2001, *Analiza micotoxinelor*, Ed. Napoca Star, Cluj-Napoca
76. Mills J.T., 1989, *Quality of stored cereals*, Chapman&Hall, London
77. Molto G., Samar M.M., Resnik S., Martinez E.J. and Pacin A., 2000, *Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment*, Food Addit. Contam. 17:809-813.
78. Mortimer D.N., Parker I., Shepherd M.J. and Gilbert J., 1985, *A limited survey of retail apple and grape juices for the mycotoxin patulin*, Food Addit. Contam. 2:165-170.
79. Moss M.O., 2008, *Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables*, J. Appl. Microbiol. 104
80. Moss M.O., 2002, *Mycotoxin review-2. Fusarium*, Mycologist, 16:158-161
81. Neira G. et al., 1997, *Safety evaluation of certain mycotoxins in food*, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting,
82. Ogundero V.W., 1987, *Crown-rot fungi of Nigerian bananas cv. Robusta and the effects of benomyl on their exoenzymes*, J. Basic Microbiol. 27:43-47
83. Ough C.S. and Corison C.A., 1980, *Measurement of patulin in grapes and wines*, J. Food Sci. 43:476-478.
84. Ozbey F. and Kabak B., 2012, *Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices*, Food Control 28 (2):354-361
85. Ordin 163/2006 a ANSVSA de aprobare a Normei privind prevenirea și reducerea contaminării cu patulină în sucul de mere și în sucul de mere folosit ca ingredient pentru alte băuturi
86. Park D.L., 2002, *Effect of processing on aflatoxin*, Advances in Experimental Medicine and Biology, 504:173-179
87. Pearson T.C., 2004, *Pancreatic mucinous cystic neoplasm defined by ovarian stroma: demographics, clinical features, and prevalence of cancer*, National Center for Biotechnology Information, 2(11):1026-31

88. Peraica M., Radi B., Luci A. and Pavlovi M., 1999, *Toxic effects of mycotoxins in humans*, Bulletin of the World Health Organization, 77(9), 754– 766.
89. Pestka J.J., 2007, *Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks*, Anim Feed Sci Technol. 137:283–298.
90. Pfohl-Leszkowicz A. and Manderville R.A., 2012, *An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of Ochratoxin A carcinogenicity*. Chem Res Toxicol. 25:252–262.
91. Pfohl-Leszkowicz A., Chekir-Ghedira, L., & Bacha, H. , 1995, *Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues*, Carcinogenesis 2315– 2320.
92. Pieters, M.N., Freijer J., Baars B.J., Fiolet D.C., J. van Klaveren, and Slob W., 2002, *Risk assessment of deoxynivalenol in food: concentration limits, exposure and effects*, Adv. Exp. Med. Biol. 504:235-248.
93. Pietri A., Bertuzzi T., Pallaroni L. and Piva G., 2001, *Occurrence of ochratoxin A in Italian wines*, Food Addit. Contam. 18:647-654.
94. Pitt J.I., 2000, *Toxigenic fungi: Which are important?*, Med. Mycol. 38(Supp. 1):17-22
95. Plăcintă D., 2007, *Micromicete ce se transmit prin semințele de cereale păioase. Prevenire și combatere*, Ed. Univ., Suceava
96. Plăcintă D., d'Mello J.F.P. and MacDonald A.M.C., 1999, *A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feeds with Fusarium mycotoxins*, Anim. Feed Sci. Tech. 78:21-37.
97. Raicu Cristina, Baci Doina, 1978, *Patologia seminței*, Ed. Ceres, București, 207 p.
98. Regulament (CE) 856/2005 referitor la toxinele de *Fusarium sp.*
99. Regulamentul (CE) nr. 1881/2006 de stabilire a nivelurilor maxime pentru anumiți contaminanți din produsele alimentare
100. Regulamentului (CE) nr. 401/2006 de stabilire a modalităților de prelevare de probe și a metodelor de analiză pentru controlul oficial al conținutului de micotoxine din produsele alimentare
101. Rocha O., Ansari K. and Doohan F.M., 2005, *Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review*, Food Addit Contam. 22:369–378. 2005
102. Robens J.F., and Richard J.L., 1992, *Aflatoxins in animal and human health*, Review in Environmental and Contamination and Toxicology 127, 69-94
103. Roberts D. W. and Yendol W. G., 1971, *Use of fungi for microbial control of insects*, Pp. 125–149 in H. D. Burges and N. W. Hussey (eds.), *Microbial Control of Insects and Mites*. Academic Press, London.
104. Rotter B.A., 1996, *Invited review: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)*, J Toxicol Environ Health A. 48:1–34. 1996
105. Samson, R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O., 1996, *Introduction to foodborne fungi (5th ed)*, The Netherlands:Centraalbureau voor Schimmelcultures, p.322.
106. Sara Aura, Borbil S., 2007, *Miceți și micotoxine*, Ed. Risoprint, Cluj-Napoca

107. Santos L., 2010, *Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in Capsicum powder*, International Journal of Food Microbiology, 151(3) 270-276
108. Savu C., 1999, *Poluarea mediului și prezența substanțelor toxice în alimente-controlul calității alimentelor*, Ed. Semne, București.
109. Savu C. ș.a., 2004, *Siguranța alimentelor, riscuri și beneficii*, Ed. Semne, București
110. Schoental R., 1985, *Trichothecenes, zearalenone, and other carcinogenic metabolites of Fusarium and related microfungi*, Adv Cancer Res. 45:217–290.
111. Schothorst R.C. and van Egmond H.P., 2005, *Report from SCOOP task 3.2.10 'collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states'*, Toxicol Lett. 153:133–143.
112. Schothorst R.C. and Jekel A.A., 2003, *Mycotoxins in the human food chain*, academia.edu: 24524301
113. Scott P.M., 1991, *The natural occurrence of trichothecenes*, In: *Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects*, Vol. I (V.R. Beasley, ed). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-26.
114. Sydenham E. H. et al., 1997, *The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice*, Food Additives and Contaminants, 14:429-434
115. Schothorst R.C. and van Egmond H.P., 2004, *Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states*, Report from SCOOP task 3.2.10; Subtask: trichothecenes. Toxicol. Lett. 153:133-143.
116. Schumacher D.M., Metzler M. and Lehmann L., 2005, *Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione*, Arch. Toxicol. 79:110–121.
117. Scott P.M., 1991, *Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grain*, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage, pag. 529-572
118. Scott P.M., 1996, *Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing*, AOAC Int. 79:875-882.
119. Scott, P.M., Miles W.F., Toft P. and Dube J.G., 1972, *Occurrence of patulin in apple juices*, J. Agric. Food Chem. 20:450-451.
120. Sewram V., Nair J. J., Nieuwoudt T. W., Gelderblom W. C., Marasas W. F. and Shephard G. S., 2001, *Assessing chronic exposure to fumonisin mycotoxins: The use of hair as a suitable noninvasive matrix*, Journal of Analytical Toxicology, 25(6), 450– 455
121. Shenasi M., Aidoo K.E. and Candlish A.A., 2002, *Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stages of maturation*, Int. J. Food Microbiol. 15:113-119.
122. Siwela M. et al., 2005, *Decontamination of aflatoxin-contaminated maize by dehulling*, Journal of the Science of Food and Agriculture 85(15): 2535-2538
123. Smith J.E., 1997, *Mycotoxins*, Animal Feed Science and Tehnology, vol 69 pag 155-166

124. Speijers G.J.A. and Speijers M.H.M., 2004, *Combined toxic effects of mycotoxins*, Toxicology Letters, 153 (1), 91-98
125. Stănescu V., 1987, *Controlul sanitar veterinar al produselor de origine animală*, Ed. Științifică, București
126. Stefanaki I., Foufa E., Tsatsou-Dritsa A, and Dais P., 2003, *Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried wine fruits*, Food Addit. Contam. 20:74-83.
127. Stewart S.G., 1968, *Carcinogenesis: A broad critique*, J. Clin. Pathol. 21:534.
128. Străjeru Silvia ș.a., 2001, *Conservarea și utilizarea resurselor genetice vegetale*, Ed. Universității, Suceava
129. Tangni E.K., Ponchaut S., Maudoux M., Rozenberg R. and Larondelle Y., 2002, *Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment*, Food Addit. Contam. 19:1169-1179.
130. Tănase C., Mititiuc M., 2001, *Micologie*, Ed. Univ. "Al. I. Cuza", Iași
131. Tofan Clemansa, 2004, *Igiena și securitatea produselor alimentare*, Editura AGIR, București
132. Tofană Maria, 2011, *Contaminanți alimentari: performanțe analitice legislative: pesticide și micotoxine*, Editura Mega, Cluj-Napoca
133. Torres M.R., Sanchis V. and Ramos A.J., 1998, *Occurrence of fumonisins in Spanish beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method*, Int. J. Food Microbiol. 39:139-143.
134. Tosun A. and Ozden S., 2015, *Ochratoxin A in red pepper flakes commercialized in Turkey*, Food Additives and Contaminants, Part. B surveillance 9(1)
135. Trenk H.L., Butz M.E. and Chu F.S., 1971, *Production of ochratoxins in different cereal products by Aspergillus ochraceus*, Appl Microbiol. 21:1032-1035
136. Trucksess M.W., Scott P.M., 2008, *Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review*, Food Addit. Contam. 25
137. Turner-Richard J.L., 2007, *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses - an overview*, Int. J. Food Microbiol. 119:3-10.
138. Ueno Y., 1984, *Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes*, Fundam Appl Toxicol. 4:S124-S132
139. Ulea E., Lipșa F. D., 2011, *Microbiologie*, Ed. Ion Ionescu de la Brad, Iași.
140. Ulea E., 2001, *Protecția plantelor. Fitopatologie*, Ed. "Ion Ionescu de la Brad", Iași
141. Van der Stegen G.H.D., Essens P.J.M. and van der Lijn J., 2001, *Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin A in coffee.*, J. Agric. Food Chem. 49:4713-4715.
142. Vepríkova Z. et al., 2015, *Mycotoxins in Plant-Based Dietary Supplements: Hidden Health Risk for Consumers*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 63(29)
143. Vidal A., Claeys L., Vanhoorne M., Vervaet C., Huybrechts B., De Boevre M., 2014, *Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours*, Scientific Reports, 8(1), 1- 11

144. Vinas I., Dadon J. and Sanchis V., 1993, *Citrinin-producing capacity of Penicillium expansum strains from apple packing houses of Lerida (Spain)*, Int. J. Food Microbiol. 19:153-156.
145. Visconti A., Pascale M. and Centonze G., 2000, *Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and HPLC*, J. Chromatogr. A 864:99-101.
146. Weng Y. et al., 1994, *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*, Nature Genetics volume 7, pages 85–90
147. Wright M., 1979, *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*, Nature Genetics volume 7, pages 85–90
148. Wolff J., Bresch H., Cholmakov-Bodechtel C., Engel G., Erhardt S., Gareis M., Majerus P., Rosner H. and Scheuer R., 1997, *Burden of ochratoxin A in food and in the consumer. Final report*, Institute for the biochemistry of cereals and potatoes. Federal Institute for Research on Cereals, Potatoes and Fats, Detmold, Germany.
149. Yazar S and Omurtag GZ, 2008, *Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals*. Int J Mol Sci. 9:2062–2090. 2008.
150. Yoshizawa T., 1991, *Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice)*, In: Mycotoxins and Animal Foods (J.E. Smith and R.S. Henderson, eds). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 301-324.
151. Zain M. E., 2011, *Impact of mycotoxins on humans and animals*, Journal of Saudi Chemical Society
152. Zimmerli B. and Dick R., 1996, *Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment*, Food Addit. Contam. 13:655-668.
153. www.academia.edu
154. www.agro.basf.ro
155. www.ansvsa.ro
156. www.eur-lex.europa.eu
157. www.librariaonline.ro
158. www.biblioteca.regielive.ro
159. www.contaminanȚinaturali.ro
160. www.eufic.org
161. www.efsa.europa.eu/publications
162. www.ec.europa.eu/food/nchemicalsafety/contaminants
163. www.fao.org
164. www.food-info.net
165. www.food.ec.europa.eu/safety/rasff
166. www.iarc.fr
167. [www.ibna.ro/ brosur/micotoxine-norme-alimentare](http://www.ibna.ro/brosuri/micotoxine-norme-alimentare)
168. www.informatii.agrorurale.ro
169. www.mycotoxins.org
170. www.mycotoxins.info

171. www.micotoxinas.com
172. www.nutripharm.ro
173. OMS, 2001
174. OMS, 2002
175. www.pdfcoffee.com/proiect-micotoxine
176. www.rompan.ro
177. www.scrigroup.com/afaceri/agricultura
178. www.scriidoc.com
179. www.toxicologiealimentara.ro
180. www.vdocuments.site/studiul-efectelor-de-contaminare-a-alimentelor-cu-micotoxine
181. www.zdocs.ro/doc/filiera-cereale

ANEXE
ANEXES

LISTA LUCRĂRILOR ȘTIINȚIFICE PUBLICATE
LIST OF PUBLISHED SCIENTIFIC PAPERS

1. **Maricica VASILACHI (ALEXANDRU)**, Florin-Daniel LIPȘA, Andreea-Mihaela FLOREA , Eugen ULEA, 2020, *Analysis of deoxynivalenol in cereals and foods derived from them, at the level of Iași County*, Scientific Papers, Serie B Agronomy, vol. 63(2), page 63-68, ISSN (print) 1454-7414, ISSN (electronic) 2069-7627
2. **Maricica VASILACHI (ALEXANDRU)**, Florin-Daniel LIPȘA, Andreea-Mihaela FLOREA, Eugen ULEA, 2020, *Analysis of mycotoxins from cereal products at Iasi County*, Scientific Papers, Serie B Agronomy, vol. 63(2), page 209-2015, ISSN (print) 1454-7414, ISSN (electronic) 2069-7627

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Pagina

Tabelul 2.1 Temperaturi minime de dezvoltare a mucegaiurilor producătoare de micotoxine	18
Tabelul 2.2 Exigențele termice pentru dezvoltarea mucegaiurilor	18
Tabelul 2.3 Valori ale a_w necesare pentru dezvoltarea unor mucegaiuri și pentru producția de micotoxine.....	19
Tabelul 3.1 Micotoxine cu potențial toxic pentru organismele vii	23
Tabelul 3.2 Nivelul de aflatoxine admis în produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006.....	25
Tabelul 3.3 Nivelul maxim de ochratoxina A din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006	29
Tabelul 3.4 Nivelul maxim de zearalenonă din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006	31
Tabelul 3.5 Nivelul maxim de fumonisine din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006	33
Tabelul 3.6 Nivelul maxim de deoxinivalenol din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006	35
Tabelul 3.7 Nivelul maxim de patulină din produsele alimentare conform Reg. CE nr. 1881/2006	38
Tabelul 4.1 Micotoxine care se dezvoltă în cultura agricolă	39
Tabelul 4.2 Micotoxine care se dezvoltă la depozitare.....	40
Tabelul 5.1 Compararea eficacității metodelor de decontaminare chimică	55
Tabelul 6.1 Micotoxinele clasificate de către IARC, care identifică și evaluează cauzele de mediu ale cancerului la om.....	58
Tabelul 6.2 Micotoxinele și posibilele efecte cancerigene.....	59
Tabelul 10.1 Centralizatorul probelor analizate pentru determinarea micotoxinelor, în perioada 2015-2020	103

Tabelul 10.2 Probe analizate pentru determinarea aflatoxinei B1	104
Tabelul 10.3 Probe analizate pentru determinarea aflatoxinei totale	106
Tabelul 10.4 Probe analizate pentru determinarea ochratoxinei A	108
Tabelul 10.5 Situația probelor pozitive pentru ochratoxina A.....	110
Tabelul 10.6 Probe analizate pentru determinarea zearalenonei	112
Tabelul 10.7 Situația probelor pozitive pentru zearalenonă.....	113
Tabelul 10.8 Probe analizate pentru determinarea fumonisinei.....	115
Tabelul 10.9 Situația probelor pozitive pentru fumonisină	116
Tabelul 10.10 Probe analizate pentru determinarea deoxinivalenolului	118
Tabelul 10.11 Situația probelor pozitive pentru deoxinivalenol.....	120
Tabelul 10.12 Probe analizate pentru determinarea toxinei T-2/HT-2.....	123
Tabelul 10.13 Probe analizate pentru determinarea patulinei	125
Tabelul 11.1 Centralizatorul rezultatelor privind micotoxinele din produsele alimentare, la nivelul județului Iași în perioada 2015-2020	128

LISTA FIGURILOR LIST OF FIGURES

	Pagina
Fig. 2.1 Factorii care influențează producția de micotoxine	16
Fig. 3.1 Boabe de grâu infestate cu <i>Fusarium</i> sp.....	25
Fig. 3.2 Porumb infestat cu <i>Fusarium</i> sp.	30
Fig. 3.3 Fructe infestate cu <i>Penicillium</i> sp.	36
Fig. 6.1 Efectele toxice asociate micotoxinelor	59
Fig. 6.2 Cancer de ficat	61
Fig. 6.3 Cancer renal	62
Fig. 6.4 Cancer de sân	63
Fig. 6.5 Tumoră hipofizară	64
Fig. 6.6 Cancer esofagian	64
Fig. 6.7 Tumoră cerebrală	66
Fig. 6.8 Cancer osos	67
Fig. 6.9 Cancer de stomac	68
Fig. 8.1 Tehnica de prelevare a probelor	75
Fig. 8.2 Probe globale	76
Fig. 8.3 Probe globale	76
Fig. 8.4 Probă globală	76
Fig. 8.5 Măsuri în caz de neconformitate a probelor.....	78
Fig. 9.1 Cititor de microplăci multiscan ELISA	79
Fig. 10.1 Incidența aflatoxinei B1 în probele analizate	105
Fig. 10.2 Incidența aflatoxinei totale în probele analizate	107
Fig. 10.3 Incidența ochratoxinei A în probele analizate	111
Fig. 10.4 Incidența zearalenonei în probele analizate.....	114
Fig. 10.5 Incidența fumonisinei în probele analizate	117
Fig. 10.6 Incidența deoxinivalenolului în probele analizate.....	122
Fig. 10.7 Incidența toxinei T2/HT2 în probele analizate	124
Fig. 10.8 Incidența patulinei în probele analizate	125
Fig. 11.1 Incidența micotoxinelor în produsele analizate	126