

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**



TEZA DE DOCTORAT

**EVALUAREA NIVELULUI CONTAMINĂRII CU OCHRATOXINĂ A ȘI
AFLATOXINE A FURAJELOR ȘI PRODUSELOR ALIMENTARE ÎN ZONA
DE VEST ROMÂNIEI**

**Ing. chim. Oprea Lăcrămioara Aurora Ruxanda
(căs. Damiescu)**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC
PROF. Dr. dr. h.c. ALEXANDRA TRIF**

TIMIȘOARA 2010

REZUMAT

Cuvinte cheie: ochratoxină A, aflatoxină B₁, aflatoxină M₁, nutrețuri, produse alimentare, test imunoenzimatic, lichid cromatografie cu spectrometrie de masă

Lucrarea se extinde pe 178 pagini, conține 113 tabele, 101 grafice, 36 figuri, 2 Anexe.

Teza de doctorat este structurată, conform normelor, în două părți: „Studiu bibliografic” și „Cercetări proprii”.

PARTEA I

STUDIUL BIBLIOGRAFIC

Sinteza bibliografică cuprinde cinci capitole și se extinde pe 42 pagini, 205 titluri bibliografice.

Capitolul 1, INTRODUCERE, conține prezentarea istoricului cunoașterii contaminării micotoxice și riscul prezenței micotoxinelor în substratul alimentar pentru sănătatea consumatorului.

Capitolul 2, MICEȚII TOXINOGENI, cuprinde trei subcapitole:

Subcapitolul 2.1. Considerații generale cuprinde considerațiilor generale despre fungi, sunt prezentate caracteristicile fungilor (încadrarea, structura, reproducerea și tipurilor de muceți cu clasificarea în cele patru diviziuni :Zigomicete, Ascomicete, Basidiomicete și Deuteromicete, specificul structural și de reproducere, principalii reprezentanți).

Subcapitolul 2.2 Factorii care influențează dezvoltarea muceților și elaborarea de micotoxine cuprinde prezentarea factorilor care influențează dezvoltarea muceților și elaborarea de micotoxine (substratul / compoziția chimică a substratului, valoarea pH, coeficientul de activitate al apei, umiditatea relativă a aerului, temperatura, aerția, luminozitatea, agenții biologici, microorganismele concurente, capacitatea genetică, perioada de timp de la contaminare, lucrările agrotehnice și fitosanitare), cu precizarea ponderii contribuției la dezvoltarea muceților și a elaborării de micotoxine.

Subcapitolul 2.3. Principalii muceți producători de aflatoxine și ochratoxine cuprinde prezentarea principalilor muceți producători de aflatoxine și ochratoxine, genurile *Aspergillus* și *Penicillium* (clasificarea taxonomică, substraturile preferate, caracterele culturale generale, caracterele microscopice generale) și speciile producătoare de aflatoxine și/ sau ochratoxine, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A.niger*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. verrucosum* sin. *viridicatum*, (caracterele culturale, caracterele microscopice).

Capitolul 3, AFLATOXINELE, cuprinde șase subcapitole:

Subcapitolul 3.1. :descrierea speciile de muceți producătoare de aflatoxine ;

Subcapitolul 3.2. prezentarea substraturile pe care sunt elaborate de preferință aflatoxinele;

Subcapitolul 3.3. prezentarea proprietățile fizico-chimice ale aflatoxinelor;

Subcapitolul 3.4. prezentarea biosintezei aflatoxinelor;

Subcapitolul 3.5. Toxicitatea cuprinde două părți:

Subcapitolul 3.5.1. : metabolizarea aflatoxinelor, cu specificarea importanței cunoașterii și înțelegerii procesului de metabolizare în înțelegerea toxicității și a acțiunii carcinogene a aflatoxinelor, cu explicarea căilor de metabolizare, a corelației metabolit-toxicitate, metabolit-acțiune mutagenă, carcinogenă;

Subcapitolul 3.5.2 :dozele toxice pentru diverse specii;

Subcapitolul 3.6 : efectele aflatoxinelor asupra sănătății și productivității pornind de la leziunile biochimice, efectele imunotoxice:supresarea imunității mediat celulare și, în mai mică măsură a celei umorale, efectele hematotoxice, hepatotoxice-ficatul organ țintă, efectul carcinogen hepatic, renal, intestinal, pulmonar, efectul asupra funcției de reproducere, alte efecte.

Capitolul 4, OCHRATOXINELE cuprinde șase subcapitole

Subcapitolul 4.1. prezintă speciile producătoare;

Subcapitolul 4.2. prezintă substraturile pe care sunt elaborate de preferință ochratoxinele;

Subcapitolul 4.3. prezintă proprietățile fizico-chimice ale ochratoxinei A;

Subcapitolul 4.4 - biosinteza ochratoxinelor- determinismul genetic;

Subcapitolul 4.5 Toxicitatea cuprinde două părți:

Subcapitolul 4.5.1. - metabolizarea ochratoxinelor, prezentarea căilor și a sediilor detoxifierii-duodenul, ileonul, pancreasul au capacitate de hidroliză superioară ficatului și rinichilor, capacitatea crescută de detoxifiere prin hidroliză a rumegetoarelor)

Subcapitolul 4.5.2 - dozele letale pentru diverse specii ;

Subcapitolul 4.6.: efectele asupra sănătății și productivității pornind de la leziunile biochimice, efectele imunotoxice: imunosupresie-afectarea organelor imunocompetente, efectele neurotoxice-afectarea hipocampusului și cerebelului, efecte nefrotoxice severe, efecte hepatotoxice mai puțin importante comparativ cu cele nefrotoxice, efecte carcinogene renale, hepatice, efecte asupra aparatului reproducător: afectarea spermatogenezei, nivelului testosteronului, efecte embriotoxice și teratogene-anomalii osoase și viscerale, precum și alte efecte: reducerea creșterii în greutate, scăderea producției de ouă, lapte).

Capitolul 5, „ MICOTOXINELE ÎN PRODUSELE ALIMENTARE”,

Subcapitolul 5.1. :prezența aflatoxinelor și ochratoxinelor în produsele alimentare în diverse zone ale lumii. și riscul diferitelor categorii de alimente pentru consumatorul uman

Subcapitolul 5.2.: influența micotoxinelor asupra calității produselor alimentare(afectarea valorii nutritive prin reducerea nivelului glucidelor, lipoliză, oxidarea lipidelor, proteoliză, depleția sulfului, fosforului, magneziului și oligoelementelor

Subcapitolul 5.3 : limitele maxime admise de legislația română armonizată cu Directivele europene

PARTEA a II-a

CERCETĂRI PROPRII

Se extinde pe 139 pagini și cuprinde cinci capitole, la care se adaugă bibliografia .

Capitolul 6. MOTIVAȚIA, SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRILOR

6.1. MOTIVAȚIA

- Precaritatea cercetărilor privind prevalența și nivelul aflatoxinelor și ochratoxinei A în nutrețuri și produse alimentare în zona de vest a României
- Necesitatea, impusă de toxicitatea crescută, a evaluării contaminării nutrețurilor și a produselor alimentare în scopul protecției stării de sănătate a animalelor și omului.
- Recomandarea EFSA de studiere a potențialei creșteri a contaminării cu aflatoxină B₁ a cerealelor din țările Uniunii Europene, ca rezultat al schimbărilor climatice, cu scopul, ca pe baza analizei datelor, să se creeze modele predictive, scenariii definite și pentru a crea hărți care să localizeze zonele în care este posibil să apară o potențială contaminare a cerealelor.

6.2. SCOPUL

Cercetările au vizat evaluarea gradul de contaminare micotoxică a diferitelor tipuri de nutreț și a produselor alimentare de origine animală și non-animală din zona de vest a României în perioada 2004-2009.

6.3. OBIECTIVELE CERCETĂRILOR:

- urmărirea dinamicii anuale a prevalenței AFB₁ și/OTA în: nutrețuri de volum, nutrețuri suculente, a materii prime vegetale pentru nutrețuri combinate, nutrețuri combinate, premixuri vitamino-minerale, concentrate proteino-vitamino-minerale;
- evaluarea nivelului de contaminare cu aflatoxina B₁ și/sau ochratoxina A a diferitelor categorii de nutreț ;
- prevalența aflatoxinei B₁ (AFB₁) și/sau ochratoxinei A (OTA) în carnea de la diferite specii, în preparatele din carne de porc și în condimentele utilizate pentru preparatele din carne de porc ;
- nivelurile de contaminare cu AFB₁ și/sau OTA a probelor de carne de la diferite specii, a preparatelor din carne de porc și a condimentelor utilizate pentru preparatele din carne de porc ;
- frecvența aflatoxinei M₁ (AFM₁) în laptele materie primă, laptele destinat consumului, laptele praf și în produsele lactate – iaurt, brânzeturi, unt;
- nivelurile de contaminare cu aflatoxina M₁ , metabolit al aflatoxinei B₁;
- frecvența AFB₁ și/sau OTA în produsele alimentare de origine non-animală (alune, fistic, nuci, fructe uscate, bere, vin, cafea);
- nivelurile de contaminare cu AFB₁ și/sau OTA a produselor de origine non-animală;
- optimizarea metodei de analiză prin tehnica lichid-cromatografiei cuplată cu spectrometrie de masă Varian 394 (LC-MS/MS) ;

- studiu comparativ al metodei de analiză uzuale de identificare și dozare a aflatoxinei B₁ și a ochratoxinei A (testul imunoenzimatic ELISA) cu metoda ultraperformantă - lichid-cromatografia cuplată cu spectrometria de masă (LC-MS/MS).

Capitolul 7 „MATERIALE ȘI METODE”

Cercetările s-au efectuat în perioada 2004-2009, în zona de vest a României, în județele Arad, Bihor, Caraș-Severin, Mehedinți, Satu-Mare și Timiș, pe un număr semnificativ de probe: 2174 probe de nutrețuri, 5796 produse alimentare de origine animală: 1284 probe de carne de la diferite specii și preparate din carne autohtone, 4234 de probe de carne din import, 278 probe de preparate din carne destinate exportului, 371 probe de condimente utilizate la preparatele din carne de porc, 1106 probe de produse de origine non-animală (alune, fistic, nuci, fructe uscate, cafea prăjită, cafea măcinată, sucuri de fructe, bere, vin).

Metodele utilizate la analizarea probelor sunt validate și acreditate.

Capitolul 8 „REZULTATE ȘI DISCUȚII” cuprinde 5 subcapitole

Subcapitolul 8.1. : cercetările privind prevalența și nivelul aflatoxinei B₁ și/sau ochratoxinei A în diferite categorii de furaje (nutrețuri de volum - *Subcapitolul 8.1.1.*, nutrețuri suculente - *Subcapitolul 8.1.2.*, materii prime pentru nutrețuri combinate - *Subcapitolul 8.1.3.*, nutrețuri combinate - *Subcapitolul 8.1.4.*, premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale - *Subcapitolul 8.1.5.*)

Subcapitolul 8.2. : cercetările privind contaminarea produselor alimentare de origine animală (carne de la diverse specii- *Subcapitolul 8.2.1.*), preparatelor din carne de porc (*Subcapitolul 8.2.2.*), condimentelor utilizate pentru preparatele din carne de porc (*Subcapitolul 8.2.3.*)

Subcapitolul 8.3. cuprinde prevalența și nivelul aflatoxinei M₁ în lapte și produse lactate (lapte materie primă - *Subcapitolul 8.3.1.*, lapte de consum uman direct - *Subcapitolul 8.3.2.*, lapte praf - *Subcapitolul 8.3.3.*, produse lactate - *Subcapitolul 8.3.4.*)

Subcapitolul 8.4. cuprinde cercetările privind contaminarea produselor alimentare de origine non-animală (nuci - *Subcapitolul 8.4.1.*, cafea boabe prăjită și cafea măcinată - *Subcapitolul 8.4.2.*)

Subcapitolul 8.5. cuprinde cercetările privind optimizarea metodei LC-MS/MS pentru determinarea micotoxinelor și compararea acesteia cu metoda imunoenzimatică (optimizarea metodei - *Subcapitolul 8.5.1.*, metoda ELISA - *Subcapitolul 8.5.2.*, compararea metodelor - *Subcapitolul 8.5.3.*)

Capitolul 9. CONCLUZII GENERALE

Cercetările efectuate în perioada 2004-2009 privind evaluarea nivelului contaminării cu ochratoxină A și aflatoxine a furajelor și produselor alimentare în zona de vest a României au evidențiat:

- ❖ Prevalența și nivelul aflatoxinei B₁ și/sau ochratoxinei A în diferitele categorii de nutrețuri în zona de vest a României
 - dinamica ascendentă a prevalenței contaminării cu aflatoxină B₁ și/sau ochratoxină A în perioada 2004-2007 și scăderea marcantă în perioada 2008-2009 la toate categoriile de nutrețuri;
 - variația frecvenței probelor contaminate în funcție de tipul de nutreț:
 - ✚ aflatoxină B₁: nutrețuri de volum (30,2%), nutrețuri suculente (23,8%), nutrețuri combinate (22,4%), materii prime pentru nutrețuri combinate (21,6%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (17%);
 - ✚ ochratoxină A: nutrețuri suculente (16,2%), nutrețuri de volum (14,9%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (12,4%), materii prime pentru nutrețuri combinate (12,1%), nutrețuri combinate (12,1%);
 - ✚ aflatoxină B₁ și ochratoxină A: nutrețuri suculente (12,5%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (11,2%), nutrețuri de volum (9,9%), materii prime pentru nutrețuri combinate (9%), nutrețuri combinate (8,9%).
 - diferențe între județe privind prevalența micotoxinelor luate în studiu fără a se putea stabili o ierarhie a acestora în funcție de categoria de nutreț și tipul de micotoxină;
 - diferențe ale nivelului mediu de contaminare între diferitele categorii de nutrețuri:
 - ✚ aflatoxină B₁: nutrețuri de volum (26,50 ppb), nutrețuri suculente (22,05 ppb), materii prime pentru nutrețuri combinate (17,19 ppb), nutrețuri combinate (4,43 ppb), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (3,50 ppb);
 - ✚ ochratoxină A: materii prime pentru nutrețuri combinate (4,97 ppb), nutrețuri combinate (4,81 ppb), nutrețuri suculente (4,63 ppb), nutrețuri de volum (4,61 ppb), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (3,04 ppb);
 - ✚ aflatoxină B₁ și ochratoxină A, pentru aflatoxina B₁: nutrețuri de volum (15,40 ppb), nutrețuri suculente (10,50 ppb), materii prime pentru nutrețuri combinate (9,59 ppb),

- nutrețuri combinate (3,44 ppb), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (3,36 ppb);
 - ✚ aflatoxină B₁ și ochratoxină A, pentru ochratoxina A nutrețuri suculente (3,58 ppb), materii prime pentru nutrețuri combinate (3,36 ppb), nutrețuri de volum (3,32 ppb), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (3,20 ppb), nutrețuri combinate (3,0 ppb).
 - depășirea limitelor maxime admise de legislația în vigoare (probe neconforme, procent din probele pozitive):
 - ✚ aflatoxină B₁: nutrețuri de volum (54,8%), nutrețuri suculente (40,4%), materii prime pentru nutrețuri combinate (30,6%), nutrețuri combinate (20,6%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (0%);
 - ✚ ochratoxină A: nutrețuri de volum (55,5%), nutrețuri suculente (41%), materii prime pentru nutrețuri combinate (38,2%), nutrețuri combinate (32,3%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (0%);
 - ✚ absența probelor neconforme în cazul contaminării mixte, indiferent de sortimentul de nutreț;
 - variații ale procentului de depășire a valorilor limitelor maxime admise:
 - ✚ aflatoxină B₁: nutrețuri de volum (minimum 23%, maximum 47,4%), nutrețuri suculente (minimum 33,3%, maximum 50%), materii prime pentru nutrețuri combinate (minimum 27,3%, maximum 40%), nutrețuri combinate (minimum 15,3%, maximum 36,3%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (0%);
 - ✚ ochratoxină A: nutrețuri de volum (minimum 50%, maximum 57,2%), nutrețuri suculente (minimum 33,3%, maximum 42,8%), materii prime pentru nutrețuri combinate (minimum 36,3%, maximum 42,8%), nutrețuri combinate (minimum 22,6%, maximum 42,1%), premixuri vitamino-minerale și concentrate proteino-vitamino-minerale (0%);
 - diferențe nesemnificative între județe privind nivelul de contaminare al nutrețurilor cu aflatoxină B₁ și/sau ochratoxină A;
- ❖ Prevalența și nivelul aflatoxinei B₁ și/sau ochratoxinei A în diferitele produse alimentare de origine animală în zona de vest a României:
- Carne și preparate din carne
 - absența contaminării cu aflatoxină B₁ și/sau ochratoxină A a probelor de carne autohtonă și din import de la diverse specii (bovine, suine, ovine, cabaline, pasăre, pește);
 - contaminarea preparatelor din carne de porc cu aflatoxină B₁ (15,9%), ochratoxină A (7%) și aflatoxină B₁ asociată cu ochratoxină A (3,8%);
 - nivel scăzut de contaminare cu aflatoxină B₁ (sub 1,5 ppb) și/sau ochratoxină A (sub 1,3 ppb) ale preparatelor din carne de porc;
 - prevalența diferită a aflatoxinei B₁ în condimentele utilizate pentru preparatele din carne de porc: boia de ardei (6,6%), enibahar (3,7%), piper (3,5%), nucșoară (3,1%), ghimbir (2,8%), coriandru (2,4%), cimbru și praf de usturoi (1,9%).
 - depășirea limitei maxime admise pentru aflatoxină B₁ în toate probele de condimente analizate, ierarhia condimentelor în funcție de gradul de depășire al limitei maxime admise fiind: boia de ardei (+110,8%), piper boabe (+87,8%), cimbru (+42,6%), enibahar (+21,4%), nucșoară (+16%), coriandru (+15,2%), ghimbir (+14,6%), praf de usturoi (+14,2%);
 - prevalența diferită a ochratoxinei A în condimentele utilizate pentru preparatele din carne de porc: piper (2,1%), coriandru(1,8%), cimbru(1,3%), ghimbir(0,9%), enibahar (0,7%), boia (0,3%).
 - ierarhia condimentelor în funcție de nivelul contaminării cu ochratoxină A: cimbru, boia de ardei, piper boabe, praf de usturoi, enibahar, nucșoară, coriandru și ghimbir (în absența precizărilor legislative referitoare la limita maximă admisă pentru ochratoxină A în condimente, toate probele au fost considerate neconforme);
 - frecvența diferită a aflatoxinei B₁ și ochratoxinei A în condimentele utilizate pentru preparatele din carne de porc, procent de depășire a limitei maxime admise pentru aflatoxină B₁ în probele de cimbru (+109%), boia de ardei (+83,8%), piper boabe (+56%) și praf de usturoi (+11%).

➤ Lapte materie primă și produse lactate (aflatoxina M₁)

- prezența aflatoxinei M₁ în 15,3% din probele de lapte materie primă;
 - 26,1% din probele de lapte materie primă neconforme, cu depășiri ale limitei maxime admise de minimum 80% și maximum 140%;
 - 15,8% din probele de lapte de consum uman direct și 17% din probele de lapte praf contaminate, dar fără depășirea limitei maxime admise;
 - absența contaminării probelor de iaurt, brânzeturi și unt;
- ❖ Prevalența și nivelul aflatoxinei B₁ și/sau ochratoxinei A în produsele alimentare de origine non-animală
- absența contaminării cu aflatoxină B₁ și/sau ochratoxină A a probelor de alune, fistic, sucuri de fructe, fructe uscate, bere, vin;
 - contaminarea a 20,8% din probele de nuci cu aflatoxină B₁, dar fără a se depăși limita maximă admisă,
 - contaminarea a 7,4% din probele de cafea boabe prăjite și a 4,6% din probele de cafea măcinată cu ochratoxină A, dar fără a se depăși limita maximă admisă.
- ❖ Cercetările efectuate în scopul optimizării metodei LC-MS/MS Varian 394 și al comparării metodei LC-MS/MS optimizată cu metoda ELISA, au evidențiat:
- metodei LC-MS/MS optimizată, prin modificarea parametrilor de lucru (gradient, debit, timp de scanare, faze mobile) este superioară metodei Varian 394, având procente de recuperare superioare pentru toți analiții luați în studiu;
 - ierarhia metodelor în funcție de procentul de recuperare este LC-MS/MS optimizată, ELISA și LC-MS/MS Varian 394;
 - sensibilitatea mai crescută a metodei LC-MS/MS optimizată, comparativ cu metoda LC-MS/MS Varian 394 (diferența procentuală a valorilor micotoxinelor determinate fiind de +37,39%);
 - diferențe procentuale sensibil egale între procentul mediu de recuperare (-5,51%) și nivelul mediu (-5,44%) al analiților determinați între metoda ELISA și metoda LC-MS/MS optimizată;
 - avantajul metodei LC-MS/MS optimizate comparativ cu metoda ELISA, bazat pe posibilitatea determinării simultane, rapide, a mai multor micotoxine și prepararea mai rapidă a probelor.

Cele două Anexe sunt curbele de calibrare pentru aflatoxina B₁, ochratoxina A și lactonele acidului resorcilic.