

## Rezumatul Tezei de doctorat

În contextul actual al cercetărilor în domeniu, contaminarea fungică a alimentelor se înscrie printre factorii prioritari de risc pentru sănătatea populației, datorită potențialului micotoxinogen ce derivă din riscul ridicat de contaminare a produselor agricole și alimentare, referindu-se cu precădere la cereale și derivate din acestea.

Elaborarea unor măsuri naturale și eficiente de prevenire, diminuarea și combaterea micotoxinozei în vederea protecției consumatorilor față de riscul toxicității acute și cronice a compușilor elaborați de fungii toxicogeni, cât și reducerea consumului de substanțe chimice în industria alimentară, au fost studiate în această teză cu scopul de a dezvolta noi strategii alternative pentru a garanta siguranța alimentară și protejarea mediului înconjurător.

Astfel, în cadrul acestei teme de cercetare au fost propuse, produse și testate preparate naturale antifungice și antimicotoxigene utilizabile în industria alimentară, urmărindu-se prin intermediul acestei abordări alternative, reducerea semnificativă a efectelor secundare negative ale produselor chimice de sinteză asupra sănătății umane și asupra mediului înconjurător, precum și valorificarea principiilor active din plante în contextul economiei circulare și sustenabile. Investiția în economia durabilă este o modalitate de a satisface nevoile unei populații în continuă creștere și răspunde interesului public de consum al produselor sigure din punct de vedere alimentar.

**Teza de doctorat cu titlul: CERCETĂRI PRIVIND CONTROLUL CONTAMINĂRII FUNGICE ȘI CU MICOTOXINE A CEREALELOR ȘI PRODUSELOR DERIVATE** este structurată în patru părți principale. Prima parte se referă la „Stadiul actual al cunoașterii” în care sunt prezentate aspecte generale privind contaminarea fungică și măsuri de reducere a acesteia. A doua parte a tezei „Cercetări proprii” este structurată în 4 capitole fiecare aferent unei direcții de cercetare. A treia parte a tezei este reprezentată de „Concluzii generale și recomandări” și ultima parte „Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei”. Studiul de literatură este precedat de o introducere în care sunt abordate motivația alegerii temei de cercetare, importanța și actualitatea temei în contextul actual și obiectivele stabilite.

Teza de doctorat elaborată, este structurată pe **6 capitole**, cuprinde **13 tabele** și **37 figuri** și beneficiază de aportul a **272 referințe bibliografice** de actualitate pentru tema de cercetare abordată. În teză este inclusă și lista cu lucrările științifice publicate de doctorandă în domeniul cercetării efectuate.

În contextul abordării temei de cercetare propuse, **obiectivele de cercetare** identificate și prezentate în introducere, se referă la:

### **O1. Monitorizarea atacului fungic și a dezvoltării de micotoxine în cereale și produse derivate și elaborarea de măsuri de prevenție naturale pe bază de uleiuri esențiale**

Scopul acestui studiu a fost de a monitoriza contaminarea microbiologică, precum și cu micotoxinele derivate a probelor de grâu destinat panificației provenit din 4 unități din zona de vest a țării și de a testa posibilitatea de utilizare a unor uleiuri esențiale ca și agenți antifungici și antimicotici în depozitele de cereale. În acest sens s-au realizat următoarele activități: i) studiul speciilor fungice dezvoltate pe cereale în condiții controlate; ii) Determinarea conținutului de micotoxine: Deoxinivalenol, Fumonisine, Zearalenone și Ochratoxine elaborate de fungi în probe de grâu prin metoda imunoenzimatică ELISA, iii) aplicarea de tratamente cu uleiuri esențiale în concentrații diferite prin stropire pe probe de grâu; iii) evaluarea gradului de inhibare a dezvoltării fungice și a micotoxinelor în prezenta uleiurilor esențiale.

### **O2. Contribuții privind potențialul antifungic și antimicotoxigen al uleiurilor esențiale utilizate sub formă de vapori, în atmosferă controlată pentru protecția grâului, a produselor derivate și de panificație.**

Acest obiectiv a urmărit posibilitatea de utilizare a vaporilor de uleiuri esențiale în atmosferă controlată în scopul asigurării unei mai bune protecții antifungice și antimicotoxigene semințelor de grâu în timpul depozitării,

precum și transferul micotoxinelor din grâu în produsele derivate și influența tratamentului cu uleiuri esențiale asupra proprietăților senzoriale ale făinii.

În acest sens s-au realizat următoarele activități: i) tratamentul probelor de grâu contaminate natural cu DON cu uleiuri esențiale în formă de vapori; ii) evaluarea frecvenței fungice în probele tratate și a potențialului antimicotoxicogen; iii) evaluarea efectului fitotoxic al vaporilor de ulei esențial asupra germinării semințelor de grâu în atmosfera modificată; iv) Influența proceselor de măcinis și coacere asupra transferului de micotoxine din grâu în produsele derivate (făină, pâine); v) obținerea unui produs de panificație din grâu tratat cu uleiuri esențiale și analiza senzorială a acestuia.

### **O3. Contribuții privind utilizarea tescovinei din struguri ca agent antifungic și antimicotoxicogen în grâul pentru consum alimentar**

Scopul acestui obiectiv a fost de a studia posibilitatea utilizării extractului de tescovină ca și agent antifungic în protecția grâului pentru panificație în contextul actual al conceptului de economie circulară.

Activitățile derulate se referă la: i) obținerea extractului de tescovină, ii) tratamentul cu extract în 3 concentrații diferite; iii) studiul efectului antifungic în timp și iv) potențialul antimicotoxicogen împotriva DON în timp.

### **O4. Contribuții privind obținerea, caracterizarea și testarea unor preparate naturale pe bază de uleiuri esențiale ca agenți antifungici și antimicotoxigeni destinați grâului de panificație**

Acest obiectiv a avut în vedere obținerea unor preparate naturale pe bază de uleiuri esențiale sub formă de emulsii binare și terțiare care au fost analizate din punct de vedere al potențialului antifungic și antimicotoxicogen.

Activitățile derulate au constat în: i) caracterizarea chimică prin GC-MS a amestecurilor binare și terțiare de uleiuri esențiale utilizate; ii) obținerea emulsiilor binare și terțiare și caracterizarea fizico-chimică a acestora; iii) tratamentul antifungic cu produsele obținute; iv) frecvența fungică și a încărcării cu DON la diferite intervale de la aplicarea tratamentului; v) influența tratamentului asupra compoziției chimice a grâului de panificație; vi) corelații între compoziția chimică a uleiurilor esențiale și contaminarea probelor cu DON.

## **Partea I. Stadiul actual al cunoașterii**

Această parte cuprinde două capitole: primul capitol: „Contaminarea fungică și cu micotoxine a cerealelor și produselor derivate” și al doilea capitolul „Strategii și metode de prevenire și combatere a infestării cu fungi și micotoxine a cerealelor și produselor derivate în depozite și unități de procesare a cerealelor”.

Primul capitol este structurat în 4 subcapitole în care sunt abordate aspecte cu privire la: i) scurt istoric privind contaminarea fungică și cu micotoxine; ii) principalele fungi și grupe de micotoxine care contaminează cerealele și produsele derivate; iii) descrierea stadiului actual al cercetării cu privire la contaminarea fungică și micotoxicologică a cerealelor și produselor derivate; iv) Factorii care influențează dezvoltarea fungilor și micotoxinelor pe cereale și produse derivate în depozite și unități de procesare a cerealelor.

Al doilea capitol prezintă: *Strategii și metode de prevenire și combatere a infestării cu fungi și micotoxine a cerealelor și produselor derivate în depozite și unități de procesare a cerealelor*, fiind structurat în 2 subcapitole în care se prezintă: i) metode clasice de prevenire și combatere a infestării cu fungi și micotoxine a cerealelor și produselor derivate, ii) metode inovative de prevenire și combatere a infestării cu fungi și micotoxine a cerealelor și produselor derivate pe bază de preparate naturale.

## **PARTEA a II-a. Cercetări proprii**

Această parte a tezei de doctorat include cercetările proprii efectuate și prezintă rezultatele obținute, fiind structurată în **4 capitole**. Fiecare capitol cuprinde scopul studiului, elemente introductive în tematica abordată, materiale și metode, rezultate și discuții și concluziile parțiale formulate.

Scopul cercetărilor efectuate în **Capitolul 3**, intitulat: “ **CONTRIBUȚII PRIVIND UTILIZAREA ULEIURILOR ESENȚIALE ÎN CONTROLUL CONTAMINĂRII CU FUNGI ȘI MICOTOXINE A CEREALELOR ȘI PRODUSELOR DERIVATE DIN DEPOZITE ȘI UNITĂȚI DE MORĂRIT** ” a fost de a studia posibilitatea de utilizare a uleiurilor esențiale (cimbru de grădină, oregano, coriandru, mărar și fenicul) ca și agenți antifungici și antimicotocicogeni asupra semințelor de grâu. În acest scop s-au analizat în prima fază încărcătura fungică și cu micotoxine (DON și fumonisine) a 4 probe de cereale provenite de la producători locali din zona de vest a țării. Probele cu contaminare ridicată au fost supuse tratamentului antifungic aplicat prin pulverizare cu OE și apoi a fost analizat conținutul de fungi și micotoxine la intervale diferite după aplicarea tratamentului, precum și efectele asupra germinății grâului.

Infestarea boabelor de cereale de către ciuperci este o problemă serioasă la nivel mondial, fenomen care reduce randamentul, calitatea și valoarea nutritivă a cerealelor și dezvoltă producția de micotoxine care sunt dăunătoare atât oamenilor, cât și animalelor. Prevenirea contaminării cu agenți patogeni prin utilizarea uleiurilor esențiale este considerată o strategie viabilă nepoluantă pentru a reduce riscurile asociate contaminării cu micotoxine a alimentelor procesate și a furajelor. Volatilitatea ridicată, absența toxicității și mai ales efectele lor antimicrobiene recomandă utilizarea preparatelor naturale pe bază de OE în agricultura ecologică, horticultura și industria alimentară.

Rezultatele obținute în cadrul acestui studiu a condus la următoarele **concluzii**:

- Conținutul inițial de micotoxine analizate (DON, FUMO, ZEA) în probele de grâu provenite din cultura organică și convențională este pozitiv pentru toate probele analizate, dar nu depășește limita maximă admisă pentru niciuna din probele analizate, respectiv pentru nicio micotoxină studiată;
- Valorile conținutului de DON și FUMO este mai mare în cazul probelor provenite din agricultura organică față de probele cultivate în sistem industrial, în timp ce valoarea înregistrată pentru ZEA a fost mai mare în cazul probelor din cultura convențională.
- Valorile superioare în cazul DON și FUMO din cultura organică sunt asociate cu încărcătura în *Fusarium* mai ridicată din probele provenite din cultura organică.
- Rezultatele noastre evidențiază potențialul antifungic al OE, în special al celor din familia Lamiaceae (cimbru de grădină și oregano), și efectele antifungice împotriva DON prezentate de OE din familia Umbeliferae (mărar și coriandru).
- Capacitatea germinativă a grâului nu este afectată de tratamentul cu OE, care le recomandă ca potențiali agenți naturali antifungici și antimicotocicogeni cu aplicabilitate în agricultură și protecția cerealelor și a materiilor prime vegetale utilizate în industria alimentară.
- Rezultatele obținute au arătat că indicii de colonizare a semințelor (SCI), după o săptămână de tratament este mai mare decât controlul în cazul fumigării semințelor de grâu cu ulei esențial de oregano și fenicul și mai mic decât controlul în cazul uleiurilor esențiale de coriandru, cimbru și mărar. Speciile fungice predominante în această fază sunt: *Fusarium*, *Cladosporium* și *Rhizopus*. La două săptămâni după tratament, se observă că tratamentul cu uleiuri esențiale asigură protecție fungică. SCI este maximă în cazul controlului, iar potențialul de inhibare a colonizării micelare crește în ordinea: fenicul < mărar = oregano < coriandru < cimbru. Cu excepția uleiului de mărar, care nu a redus contaminarea cu *Fusarium*, celelalte uleiuri esențiale asigură o reducere semnificativă a numărului de semințe contaminate cu acest tip de ciupercă.
- În ceea ce privește efectul antimicotocicogen, nivelul DON scade în urma tratamentului cu uleiuri esențiale, în toate variantele experimentale testate, scăderea fiind mai pronunțată după 14 zile de la aplicarea tratamentului, față de 7 zile.

În **Capitolul 4** sunt prezentate: “ **CONTRIBUȚII PRIVIND POTENȚIALUL ANTIFUNGIC ȘI ANTIMICOTOXICOGEN AL ULEIURILOR ESENȚIALE UTILIZATE SUB FORMĂ DE VAPORI, ÎN ATMOSFERĂ CONTROLATĂ PENTRU PROTECȚIA GRÂULUI, A PRODUSELOR DERIVATE ȘI DE PANIFICAȚIE** ”.

Având în vedere rezultatele anterioare obținute și prezentate în capitolul 4 cu privire la efectul antifungic și antimicotocicogen al celor trei OE: cimbru (TEO), oregano (OEO) și coriandru (CEO) aplicate prin stropire la

semintele de grâu, prezentul studiu își propune să clarifice câteva aspecte pentru asigurarea utilizării durabile a OE: (i) dacă tratamentul cu uleiuri esențiale sub formă de vapori poate oferi o mai bună protecție antifungică și antimicotoxigenă semințelor de grâu în timpul depozitării; (ii) dacă există un efect fitotoxic al vaporilor de ulei esențial asupra germinării semințelor de grâu în atmosfera modificată; (iii) dacă EO oferă efect antimicotoxigen în grâu; (iv) dacă tratamentul cu OE influențează, din punct de vedere senzorial, produsele de panificație obținute din grâu expus cu OE.

Rezultatele obținute în acest studiu au condus la următoarele **concluzii**:

- S-a demonstrat posibilitatea utilizării uleiului esențial de cimbru, oregano și coriandru pentru a controla ciupercile de depozitare și prevenirea apariției micotoxinelor DON pentru două concentrații calculate la volumul de aer, 0,2 și, respectiv, 0,4%.

- Efectul fungicid al vaporilor de OE a fost obținut după 7 zile pentru ciupercile de câmp (de exemplu, Drechslera), în timp ce pentru Fusarium, efectul antifungic a fost dovedit după 14 zile de fumigație cu OE.

- Germinarea semințelor a fost inhibată după 7 zile de expunere; în ordinea, oregano > thymus > coriandru, efectul vaporilor de OE acționând cumulativ în timp și a fost afectat atât emisia de radicle cât și lungimea răsadului.

- Nu au existat diferențe senzoriale sesizabile între cele două concentrații aplicate în ceea ce privește evaluarea senzorială a pâinii obținute din semințe expuse timp de 28 de zile la vapori de OE. În ceea ce privește acceptabilitatea generală, pe primul loc se situează varianta de pâine din semințe fumigate cu TEO urmată de CEO și OEO.

- Uleiurile esențiale TEO, OEO și CEO în fază de vapori pot fi o alternativă durabilă la conservarea semințelor de grâu pentru coacere, asigurând siguranță și protecție împotriva ciupercilor producătoare de micotoxine. Din cauza efectelor negative asupra germinării, nu este recomandată aplicarea acestora dacă destinația semințelor este obținerea unei culturi de câmp.

**Scopul studiului realizat în Capitolul 5 și intitulat " CONTRIBUTII PRIVIND UTILIZAREA TESCOVINEI DIN STRUGURI CA AGENT ANTIFUNGIC ȘI ANTIMICOTOXIGEN ÎN GRÂUL PENTRU CONSUM ALIMENTAR "** a fost de a testa și analiza efectele antifungice și anti-toxice ale tratamentelor cu extracte naturale pe bază de tescovină de struguri. Această cercetare își propune să ofere o soluție naturală pentru prevenirea, controlul sau reducerea contaminării fungice în sectorul agricol, industria alimentară și în subunitățile de depozitare, măcinare și prelucrare a cerealelor, dar și să încurajeze sisteme alimentare durabile, orientate către strategii inovatoare pentru valorificarea subproduselor și a deșeurilor din procesele de fabricație, rezultând cantități mari de deșeurii din industria de prelucrare a fructelor la nivel global.

Rezultatele obținute cu privire la posibilitatea de reducere a contaminării fungice și cu micotoxine a grâului destinat panificației prin utilizarea tescovinei au condus la următoarele **concluzii**:

- Conform datelor obținute, pentru a asigura controlul antifungic optim al grâului în depozite, se recomandă utilizarea unui tratament GPE 10 %, care reduce semnificativ contaminarea grâului cu Fusarium, efectul fiind raportat abia după 14 zile de la administrare.
- Rezultatele au arătat un efect diferit al extractelor de tescovină de struguri asupra dezvoltării ciupercilor și mușcăiurilor, în funcție de tulpină și de timpul de tratament. În ceea ce privește efectul antifungic împotriva Fusarium dezvoltat pe sâmbânța de grâu, rezultatele au indicat că administrarea de concentrații mai mici (5-6,5%) duce la efectul inhibitor chiar și după 7 zile de tratament și crește în timp.
- În ceea ce privește efectul antimicotoxigen, nivelul DON scade după tratamentul cu extracte de tescovină de struguri în toate variantele experimentale testate, cu o scădere mai mare după 7 zile față de 14 zile după tratament, în funcție de concentrație.
- Datorită bioactivității ridicate și lipsei de toxicitate, tescovină de struguri poate fi folosit ca agent natural antifungic și antifungic în protecția cerealelor în contextul economiei circulare.

- În ceea ce privește efectul antimicotoxigen al GPE, nivelul DON scade odată cu concentrația GPE în toate variantele experimentale testate, cu o scădere mai mare după 7 zile față de 14 zile după tratament.
- Datorită potențialului bio-activ ridicat și absenței toxicității, tescovina de struguri poate fi folosită ca agent natural antifungic și antimicotoxigen în protecția cerealelor în contextul economiei circulare ca alternativă la produsele sintetice.
- Datele rezultate lasă posibilitatea implementării acestor strategii bazate pe produse naturale, sigure pentru mediu, biodegradabile și scăzute de toxicitate, în prevenirea și controlul sau reducerea contaminării fungice, în sectorul agricol, în industria alimentară și în subunități de depozitare, măcinare și prelucrare a cerealelor.

Al patrulea studiu prezentat în **capitolul 6**, se referă la: `` **CONTRIBUȚII PRIVIND OBTINEREA UNOR PREPARATE NATURALE PE BAZĂ DE ULEIURI ESENȚIALE CA AGENȚI ANTIFUNGICI ȘI ANTIMICOTOXIGENI DESTINATE GRÂULUI DE PANIFICAȚIE** `` și are ca scop studiul efectului antifungic și antimicotoxigen împotriva dezvoltării deoxinivalenolului (DON) al uleiurilor esențiale (EO) binare și terțiare de *Thymus vulgaris*, *Oreganum sativum* și *Coriandrum sativum*, precum și a emulsiilor obținute pe baza de uleiuri esențiale pe boabele de grâu destinate industriei de panificație. De asemenea, a fost studiată compoziția chimică a uleiurilor esențiale, caracteristicile fizice ale emulsiilor și influența tratamentului asupra compoziției proximate a semințelor de grâu.

Pe baza rezultatelor noastre anterioare care au demonstrat potențialul antifungic și antimicotoxicogen al EO de coriandru, cimbru și oregano, în acest studiu au fost evaluate, pe de o parte, efectele sinergice/antagoniste obținute prin combinarea EO analizate anterior, pe de altă parte, să se obțină emulsii naturale pe bază de amestecuri binare și terțiare din EO, pe care să le testăm din punct de vedere al efectelor antifungice și antimicotoxice.

Deși potențialul antifungic și antibacterian al EO a fost demonstrat, în prezent există puține studii privind sinergismul sau antagonismul exercitat de utilizarea în comun a EO.

Astfel, în acest studiu au fost propuse preparate naturale pe bază de amestec binar/terțiar de EO cu rol antifungic și antimicotoxicogen, vizând prin această abordare alternativă, asigurarea siguranței alimentelor și reducerea semnificativă a efectelor secundare ale micotoxinelor asupra sănătății umane.

În acest sens, obiectivele acestui studiu se referă la: i) obținerea de amestecuri binare și terțiare pe bază de coriandru, cimbru și oregano; ii) caracterizarea chimică a amestecurilor prin GC-MS; iii) obținerea și caracterizarea emulsiilor naturale pe bază de EO; iv) evaluarea potențialului antifungic și antimicotoxigen al amestecurilor de EO și emulsiilor naturale pe boabele de grâu destinate panificației; v) să studieze influența contaminării cu ciuperci/micotoxine asupra proprietăților fizico-chimice ale făinii de grâu.

**Concluziile** rezultate ca urmare a realizării acestui studiu sunt:

- Rezultatele obținute în acest studiu arată posibilitatea utilizării amestecurilor binare/terțiare de EO și emulsii pe bază de EO de oregano, coriandru și cimbru ca alternative sănătoase și prietenoase cu mediul în industria de prelucrare a grâului la fungicidele sintetice.

- Preparatele naturale obținute sub forma de emulsii ulei în apă (O/W) stabilizate folosind un produs natural (lecitina) ca emulgator, reprezintă sisteme stabile cu capacitate de dispersie redusă, capabile să fie utilizate în depozitele de cereale și brutării ca agenți antifungici și antimicotoxicogeni.

- Compoziția chimică a evidențiat faptul că timol și o-cymen-ul au fost componentele majore, în EO binar de cimbru, respectiv linalol în EO binar de coriandru și carvacrol și o-cymen în EO binar de oregano.

- Rezultatele au arătat că, pe baza potențialului zeta, sistemul terțiar asigură stabilitatea maximă a emulsiei, în timp ce emulsiile binare și în particular emulsia pe bază de cimbru și oregano este sistemul mai puțin stabil.

- Din punct de vedere al potențialului antifungic, rezultatele au arătat că depozitarea semințelor de grâu în atmosferă îmbogățită cu vapori de uleiuri esențiale are un efect direct asupra microbiotei semințelor, fapt observat mai ales după 28 de zile prin determinarea indicelui de frecvență fungică totală din seminte.

- În ceea ce privește efectul antifungic și antimicotoxicogen, rezultatele au arătat că cel mai mare potențial de inhibiție, atât în ceea ce privește ciupercile, cât și DON, s-a observat pentru amestecul binar pe bază de cimbru și oregano, efectul fiind maxim asupra ciupercilor la utilizarea amestecului binar de EO, respectiv pe

DON în cazul emulsiei binare bazate pe aceleași EO. Compoziția proximală a semințelor de grâu contaminate cu DON a arătat o creștere a conținutului de proteine și substanțe minerale după tratamentul cu OE și modificări ale culorii semințelor de grâu.

- Obținerea unor preparate naturale tip emulsii binare/tertiare care au fost caracterizate din punct de vedere al stabilității, prin determinarea potențialului zeta, indicându-se faptul că sistemele ternare sunt mai stabile comparativ cu cele binare și se recomandă utilizarea amestecurilor de 3 componente în prepararea unor emulsii stabile destinate produselor fitofarmaceutice din agricultura ecologică;

- Toate combinațiile binare/tertiare au potențial de inhibiție împotriva dezvoltării fungice, dar perioada de acțiune diferă în funcție de tipul de ulei esențial și tulpini.

- Efectul antimicoticogen împotriva DON a fost înregistrat pentru toate combinațiile binare/tertiare studiate.

- Efectul antifungic și antimicoticogen a fost maxim atunci când amestecul pe bază de cimbru și oregano a fost aplicat pe semințele de grâu, cu mențiunea că combinația de OE binare a fost mai activă împotriva funghiilor, în timp ce emulsia binară a fost mai activă împotriva dezvoltării DON. Acest lucru evidențiază faptul că excipienții adăugați în prepararea emulsiei (în cazul nostru lechitina) pot îmbunătăți efectele antimicoticogence ale uleiurilor esențiale.

- Efectul maxim asupra *Fusarium*, principalul patogen în cultura grâului, a fost obținut prin expunerea la amestecul binar TO și s-a observat o eficiență mai mare în cazul tratamentului cu amestec de uleiuri comparativ cu emulsii, fapt explicat prin expunerea prelungită a sporilor/hifelor la vaporii de uleiuri esențiale, ceea ce în timp afectează viabilitatea acestora.

- De remarcat faptul că combinația terțiară, atât sub formă de EO, cât și de emulsie, nu conduce la un efect antifungic și antimicoticogen maxim, ceea ce indică faptul că între cele trei uleiuri există efecte antagoniste care influențează potențialul de acțiune împotriva ciupercilor și DON. dezvoltare.

- Inhibarea DON a variat în cazul amestecurilor de OE binare în ordinea: TC > TOC > OC > TO, în timp ce la emulsii ordinea inhibării a fost: TOE > TCE > TOCE > OCE. Trebuie remarcat faptul că formulele care includ cimbru în compoziție arată rata maximă de inhibiție.

- Utilizarea amestecurilor binare și terțiare ca agent antifungic pe semințele de grâu destinate panificației influențează parametrii fizico-chimici ai semințelor.

- Controlul temperaturii și umidității până la faza de depozitare în siguranță a fost un punct cheie pentru atenuarea concentrației de micotoxine din boabele de cereale

- Prin aplicarea tratamentelor valorile proteice sunt stimulate, mai ales în cazul emulsiilor, creșterea conținutului de proteine din semințele de grâu fiind asociat cu acumularea mai mare de DON.

- Conținutul de substanțe minerale a grâului crește prin aplicarea tratamentelor, atât cu OE, cât și cu emulsii, maximul valoric înregistrându-se pentru emulsia terțiară (TOCE).

- Culoarea grâului este afectată de tratamentul cu uleiuri esențiale și emulsii și depinde de natura uleiului și a excipienților utilizate la prepararea emulsiilor, observându-se diferențe semnificative față de control după expunerea la OE și emulsii binare/tertiare, care pot influența proprietățile senzoriale ale făinii obținute după tratament.

- Analiza corelațiilor între parametrii au arătat o corelație pozitivă foarte semnificativă între compuşii chimici majoritari ai uleiurilor esențiale (o-Cimen,  $\beta$ -Linalool, Timol și Carvacrol) și gradul de inhibare al DON. Principalii compuși chimici ai OE analizate, conform profilului GC-MS, au fost: Analiza corelației a arătat o corelație pozitivă foarte mare între acești compuși și inhibarea DON.

- În ceea ce privește analiza senzorială a probelor de pâine obținute din grâu tratat cu amestecuri binare și terțiare consumatorii au apreciat cel mai puțin gustul și mirosul conferit de cimbru, în timp ce produsele cu tratament pe bază de oregano și coriandrul, atât sub formă de amestecuri binare de uleiuri esențiale cât și de emulsii, au fost cele mai apreciate.

### **Partea a III-a. Concluzii generale și recomandări**

Prin **concluziile generale și recomandările** formulate, teza de doctorat contribuie la dezvoltarea cunoașterii științifice în domeniul controlului dezvoltării fungice și a elaborării de micotoxine în cereale și produse derivate. Impactul tezei de doctorat se reflectă la nivel **științific, aplicativ, social și ecologic**.

Contribuțiile la nivel **științific** se referă la:

- Obținerea unor soluții inovative de protecție fungică și antimicoticogenă a cerealelor și produselor derivate prin asocierea uleiurilor esențiale și a extractelor naturale din plante, care se doresc a fi brevetate;
- Contributii privind corelațiile între compoziția chimică a uleiurilor esențiale și efectele antifungice și antimicoticogene exercitate de acestea;
- Studiul *in vitro* și *in vivo* a impactului matricelor vegetale constituente și a preparatelor naturale asupra dezvoltării fungice și a elaborării de micotoxine;
- Studiul efectelor sinergice/antagonice generate asupra producției fungice și de micotoxine prin asocierea principiilor active din plante;
- Studiul influenței contaminării fungice și cu micotoxine asupra principalilor indici calitativi și de panificație a produselor derivate din cereale;
- Evidențierea importantei tratamentelor termice aplicate în industria panificației ca și metode de prevenție și reducere a contaminării fungice a alimentelor făinoase;
- Contributii cu privire la impactul tratamentului cu uleiuri esențiale și preparate naturale asupra proprietăților senzoriale ale produselor de panificație.

Din punct de vedere **aplicativ**, teza de doctorat oferă soluții practice, naturale aplicabile în depozitele de cereale și unitățile de morărit și panificație în scopul prevenției și reducerii contaminării fungice. De asemenea, sunt propuse recomandări privind gestionarea judicioasă a controlului fungic și preventiv în depozitele de cereale, unități de morărit și panificație.

Rezultatele obținute confirmă faptul că practicarea agriculturii organice conduce la creșterea încărcăturii fungice și a riscului de contaminare cu micotoxine, comparativ cu agricultura convențională, în special a incidentei deoxinivalenolului și a fumonisinelor ca urmare a incidentei ridicate de dezvoltare a speciilor de *Fusarium* în câmp pe cultura grâului.

Pe baza rezultatelor obținute se evidențiază posibilitatea utilizării amestecurilor binare/terțiare de uleiuri esențiale de oregano, coriandru și cimbru ca alternative sănătoase și prietenoase cu mediul la produsele sintetice de control fungic și micotoxic în depozitele de cereale și industria panificației.

Se recomandă utilizarea uleiurilor esențiale de cimbru, oregano și coriandru aplicate în fază de vapori în scopul conservării semințelor de grâu destinate panificației, asigurând astfel protecție maximă împotriva fungilor producătoare de micotoxine.

Rezultatele obținute vin să confirme faptul că aplicarea tratamentelor pe bază de uleiuri esențiale în protecția grâului de panificație nu se reflectă semnificativ în mod negativ asupra proprietăților senzoriale ale pâinii și se recomandă utilizarea acestora în amestec binar de tip ulei esențial de coriandru și oregano.

Analiza comparativă a uleiurilor esențiale provenite din familia Lamiaceae (oregano, cimbru) respectiv a celor provenite din familia Umbeliferae (mărar, fenicul și coriandru) indică faptul că efectul antifungic este mai pronunțat în cazul aplicării tratamentelor din prima familie de plante, respectiv efectul antimicoticogen, împotriva DON, este mai pronunțat în cazul utilizării plantelor umbelifere.

Teza de doctorat propune soluții inovative de obținere a unor preparate naturale de tip emulsii stabile utilizând ca agent emulsifiant lecitina în amestec binar/terțiar cu uleiuri esențiale, soluții ce se pot transfera mediului economic în vederea preparării la scară pilot și macro și ulterior a comercializării.

Impactul tezei de doctorat se reflectă și la nivel social și ecologic prin soluțiile formulate în prevenția și reducerea contaminării produselor cerealiere și a alimentelor făinoase și promovarea alimentației sănatoase, venind astfel în sprijinul consumatorului și contribuind la creșterea calității vieții.

De asemenea, teza de doctorat propune soluții de prevenție și reducere a contaminării fizice și/sau naturale pe bază de extracte și uleiuri esențiale din plante având un impact pozitiv asupra mediului înconjurător.

Nu în ultimul rând prin utilizarea tescovinei, un subprodus din vinificație, în tehnologia de obținere a preparatelor naturale, teza de doctorat se înscrie în tendințele actuale de promovare a economiei circulare și durabile.

### **Partea a IV-a. Elemente de originalitate și perspective de continuare a cercetărilor**

De-a lungul anilor, eforturile cercetării științifice inovative s-au dedicat căutării de noi materiale antifungice din surse naturale pentru conservarea alimentelor și găsirea de soluții alternative la preparatele chimice de sinteză. În acest sens, teza de doctorat vine să completeze cercetările efectuate în acest domeniu și să ofere soluții inovative de protecție cu aplicații în industria alimentară.

**Elementele de originalitate** ale tezei de doctorat se referă la următoarele aspecte, care sporesc valoarea științifică a studiilor efectuate:

- Obținerea și caracterizarea *in vitro* și *in vivo* a unor preparate naturale pe bază de uleiuri esențiale în sisteme binare și terțiare cu efecte antifungice și antimicotoxice;
- Optimizarea metodelor de aplicare a soluțiilor de protecție antifungică prin compararea efectelor obținute în cazul aplicării tratamentului prin stropire cu uleiuri esențiale respective fumigare;
- Evaluarea potențialului sinergetic antifungic și antimicotoxicogen obținut prin asocierea uleiurilor esențiale în combinații și emulsii binare/terțiare;
- Studiul influenței contaminării cu *Fusarium* sp. sau DON asupra compoziției nutriționale a grâului;
- Analiza corelației dintre compoziția chimică a uleiurilor esențiale și gradul de inhibare a dezvoltării micotoxinei deoxinivalenol în grâul destinat panificației;
- Cercetări privind potențialul zeta al preparatelor naturale binare și terțiare și crearea de sisteme stabile cu capacitate de dispersie redusă, capabile să fie utilizate în depozitele de cereale și brutării ca agenți antifungici și antimicotoxicieni.
- Propunerea de soluții inovative de protecție antifungică pe bază de extract de țescovină de struguri care poate fi folosit ca agent natural antifungic și antifungic în protecția cerealelor în contextul economiei circulare.

În vederea continuării eforturilor științifice derulate în cadrul acestei teze de doctorat, sunt propuse următoarele **perspective de continuare a cercetărilor**:

- Studiarea și a altor uleiuri esențiale și extracte din plante din punct de vedere al efectelor antifungice și antimicotoxice;
- Aplicarea preparatelor naturale binare și terțiare obținute și caracterizate în acest studiu și în protecția și conservarea a altor produse alimentare, în special în inhibarea biofilmului creat în produsele din carne și lactate;
- Găsirea de noi soluții tehnologice de aplicare a uleiurilor esențiale în industria alimentară care să favorizeze biodisponibilitatea compusilor biologic activi și studiul factorilor care influențează transferul acestora în produsele alimentare;
- Extinderea cercetărilor privind potențialul antimicrobian al uleiurilor esențiale și a preparatelor naturale prin testarea și asupra altor tulpini fungice sau bacteriene;
- Aprofundarea cercetărilor în direcția evaluării impactului pe care uleiurile esențiale îl au asupra compusilor biologic activi și nutriționali ai produselor alimentare;
- Evaluarea posibilității de transfer tehnologic către agenții economici din industria de morărit și panificație a formulelor binare/terțiare de produse naturale de protecție în vederea producerii la scară industrială și comercializării;
- Diseminarea rezultatelor obținute specialiștilor din industria alimentară sub forma unui set de măsuri privind prevenția și metodele de reducere a contaminării aplicabile în depozite și unitățile de morărit și panificație.



## ABSTRACT OF PhD THESIS

In the current context of research in the field, fungal contamination of food is among the priority risk factors for the health of the population, due to the mycotoxinogenic potential that derives from the high risk of contamination of agricultural products and foodstuffs, referring especially to cereals and their derivatives.

The development of natural and effective measures to prevent, reduce and combat mycotoxinogenesis in order to protect consumers from the risk of acute and chronic toxicity of compounds developed by toxicogenic fungi, as well as to reduce the consumption of chemical substances in the food industry, have been studied in this thesis in order to develop new alternative strategies to guarantee food safety and environmental protection.

Thus, within this research topic, natural antifungal and antimycotoxinogenic preparations usable in the food industry have been proposed, produced and tested, with the aim of this alternative approach is to significantly reduce the negative side effects of synthetic chemical products on human health and the environment, as well as the valorization of the active principles from plants in the context of the circular and sustainable economy. Investing in the sustainable economy is one way to meet the needs of an ever-growing population and responds to the public interest in consuming food-safe products.

The doctoral thesis with the title: **RESEARCH ON THE CONTROL OF FUNGAL AND MYCOTOXIN CONTAMINATION OF CEREALS AND DERIVED PRODUCTS** is structured in four main parts. The first part refers to the "current state of knowledge" in which general aspects regarding fungal contamination and measures to reduce it are presented. The second part of the thesis "Own research" is structured in 4 chapters, each related to a research direction. The third part of the thesis is represented by "General conclusions and recommendations" and the last part "Originality and innovative contributions of the thesis". The literature study is preceded by an introduction in which the motivation for choosing the research topic, the importance and topicality of the topic in the current context and the established objectives are addressed.

The developed doctoral thesis is structured in 6 chapters, includes 13 tables and 37 figures and benefits from the contribution of 272 up-to-date bibliographic references for the research topic addressed. The thesis also includes the list of scientific works published by the doctoral student in the field of research carried out.

In the context of approaching the proposed research topic, the research objectives identified and presented in the introduction refer to:

### **O1. Monitoring the fungal attack and the development of mycotoxins in cereals and derived products and the development of natural preventive measures based on essential oils**

The purpose of this study was to monitor the microbiological contamination, as well as the mycotoxins derived from wheat samples intended for baking from 4 units in the western part of the country and to test the possibility of using some essential oils as antifungal and antimycotic agents in grain warehouses. In this sense, the following activities were carried out: i) the study of fungal species developed on cereals under controlled conditions; ii) Determination of the content of mycotoxins: Deoxynivalenol, Fumonisin, Zearalenone and Ochratoxins developed by fungi in wheat samples by immunoenzymatic ELISA method, iii) application of treatments with essential oils in different concentrations by sprinkling on wheat samples; iii) evaluating the degree of inhibition of fungal development and mycotoxins in the presence of essential oils.

### **O2. Contributions regarding the antifungal and antimycotoxinogenic potential of essential oils used in the form of vapors, in a controlled atmosphere for the protection of wheat, its derivatives and bakery products.**

This objective pursued the possibility of using essential oil vapors in a controlled atmosphere in order to ensure a better antifungal and antimycotoxinogenic protection of wheat seeds during storage, as well as the transfer of mycotoxins from wheat in the derived products and the influence of the treatment with essential oils on the sensory properties of the flour.

In this sense, the following activities were carried out: i) the treatment of wheat samples naturally contaminated with DON with essential oils in vapor form; ii) evaluation of the fungal frequency in the treated

samples and the antimycotoxicogenic potential; iii) evaluation of the phytotoxic effect of essential oil vapors on the germination of wheat seeds in the modified atmosphere; iv) The influence of milling and baking processes on the transfer of mycotoxins from wheat to the derived products (flour, bread); v) obtaining a bakery product from wheat treated with essential oils and its sensory analysis.

### **O3. Contributions on the use of grape pomace as an antifungal and antimycotoxicogenic agent in wheat for food consumption**

The purpose of this objective was to study the possibility of using pomace extract as an antifungal agent in the protection of wheat for baking in the current context of the circular economy concept.

The activities carried out refer to: i) obtaining the extract of pomace, ii) the treatment with extract in 3 different concentrations; iii) the study of the antifungal effect over time and iv) the antimycotoxicogenic potential against DON over time.

### **O4. Contributions regarding the obtaining, characterization and testing of natural preparations based on essential oils as antifungal and antimycotoxicogenic agents intended for baking wheat**

This objective had in mind the obtaining of natural preparations based on essential oils in the form of binary and tertiary emulsions that were analyzed from the point of view of antifungal and antimycotoxicogenic potential.

The activities carried out consisted of: i) chemical characterization by GC-MS of the binary and tertiary mixtures of essential oils used; ii) obtaining binary and tertiary emulsions and their physico-chemical characterization; iii) antifungal treatment with the obtained products; iv) the fungal frequency and the loading with DON at different intervals after the application of the treatment; v) the influence of the treatment on the chemical composition of baking wheat; vi) correlations between the chemical composition of the essential oils and contamination of samples with DON.

## **Part I. Current state of knowledge**

This part includes two chapters: the first chapter: "Fungal and mycotoxin contamination of grains and derived products" and the second chapter "Strategies and methods for preventing and combating fungal and mycotoxin infestation of grains and derived products in warehouses and units of grain processing".

The first chapter is structured in 4 subchapters in which aspects are addressed regarding: i) brief history regarding fungal and mycotoxin contamination; ii) the main fungi and groups of mycotoxins that contaminate cereals and derived products; iii) description of the current state of research on fungal and mycotoxicological contamination of grains and derived products; iv) Factors influencing the development of fungi and mycotoxins on grains and derived products in grain storage and processing units.

The second chapter presents: Strategies and methods for preventing and combating fungal and mycotoxin infestation of grains and derived products in warehouses and grain processing units, being structured in 2 subchapters that present: i) classic prevention and combating methods of fungal and mycotoxin infestation of cereals and derived products, ii) innovative methods of preventing and combating fungal and mycotoxin infestation of cereals and derived products based on natural preparations.

## **PART II. Own research**

This part of the doctoral thesis includes the own research carried out and presents the results obtained, being structured in 4 chapters. Each chapter includes the purpose of the study, introductory elements in the topic addressed, materials and methods, results and discussions and the partial conclusions formulated.

The purpose of the research carried out in Chapter 3, entitled: "**CONTRIBUTIONS REGARDING THE USE OF ESSENTIAL OILS IN THE CONTROL OF FUNGI AND MYCOTOXIN CONTAMINATION OF CEREALS AND PRODUCTS DERIVED FROM STORES AND MILLING UNITS**" was to study the possibility of using essential oils (garden thyme, oregano, coriander, dill and fennel) as antifungal and antimycotoxicogenic agents on wheat seeds. For this purpose, the fungal and

mycotoxin load (DON and fumonisins) of 4 cereal samples from local producers in the western part of the country were analyzed in the first phase. Samples with high contamination were subjected to the antifungal treatment applied by spraying with EO and then the content of fungi and mycotoxins at different intervals after applying the treatment, as well as the effects on wheat germination, were analyzed.

Infestation of cereal grains by fungi is a serious problem worldwide, a phenomenon that reduces the yield, quality and nutritional value of cereals and develops the production of mycotoxins that are harmful to both humans and animals. Prevention of pathogen contamination through the use of essential oils is considered a viable non-polluting strategy to reduce the risks associated with mycotoxin contamination of processed food and feed. The high volatility, the absence of toxicity and especially their antimicrobial effects recommend the use of natural preparations based on EO in organic agriculture, horticulture and the food industry.

The results obtained in this study led to the following conclusions:

- The initial content of analyzed mycotoxins (DON, FUMO, ZEA) in wheat samples from organic and conventional culture is positive for all analyzed samples, but does not exceed the maximum limit allowed for any of the analyzed samples, respectively for any mycotoxin studied;
- The DON and FUMO content values are higher in the case of the samples from organic agriculture compared to the samples cultivated in an industrial system, while the value recorded for ZEA was higher in the case of the samples from the conventional culture.
- The higher values in the case of DON and FUMO from the organic culture are associated with the higher *Fusarium* load in the samples from the organic culture.
- Our results highlight the antifungal potential of EOs, especially those from the Lamiaceae family (garden thyme and oregano), and the antifungal effects against DON shown by EOs from the Umbeliferae family (dill and coriander).
- The germination capacity of wheat is not affected by OE treatment, which recommends them as potential natural antifungal and antimycotoxigenic agents with applicability in agriculture and the protection of cereals and plant raw materials used in the food industry.
- The results obtained showed that the seed colonization index (SCI) after one week of treatment is higher than the control in the case of wheat seed fumigation with oregano and fennel essential oil and lower than the control in the case of coriander essential oil, thyme and dill. The predominant fungal species in this phase are: *Fusarium*, *Cladosporium* and *Rhizopus*. Two weeks after treatment, it is observed that treatment with essential oils provides fungal protection. SCI is maximal in the control case, and the potential to inhibit micellar colonization increases in the order: fennel < dill = oregano < coriander < thyme. With the exception of dill oil, which did not reduce *Fusarium* contamination, the other essential oils provided a significant reduction in the number of seeds contaminated with this type of fungus
- Regarding the antimycotoxigenic effect, the DON level decreases following the treatment with essential oils, in all experimental variants tested, the decrease being more pronounced after 14 days from the application of the treatment, compared to 7 days.

In Chapter 4 are presented: **“CONTRIBUTIONS REGARDING THE ANTIFUNGAL AND ANTIMYCOTOXIGEN POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS USED IN THE FORM OF VAPORS, IN A CONTROLLED ATMOSPHERE FOR THE PROTECTION OF WHEAT, DERIVED PRODUCTS AND BAKERY PRODUCTS”**.

Considering the previous results obtained and presented in chapter 4 regarding the antifungal and antimycotoxigenic effect of the three EOs: thyme (TEO), oregano (OEO) and coriander (CEO) applied by spraying to wheat seeds, the present study aims to clarify some aspects to ensure the sustainable use of OE: (i) whether treatment with essential oils in the form of vapors can provide better antifungal and antimycotoxigenic protection to wheat seeds during storage; (ii) whether there is a phytotoxic effect of essential oil vapors on the germination of wheat seeds in the modified atmosphere; (iii) whether EO provides antimycotoxigenic effect in wheat; (iv) whether EO treatment influences, from a sensory point of view, bakery products obtained from EO-exposed wheat.

The results obtained in this study led to the following conclusions:

- The possibility of using essential oil of thyme, oregano and coriander to control storage fungi and prevent the occurrence of DON mycotoxins has been demonstrated for two concentrations calculated by volume of air, 0.2 and 0.4%, respectively.
- The fungicidal effect of OE vapor was obtained after 7 days for field fungi (eg Drechslera), while for Fusarium, the antifungal effect was proven after 14 days of OE fumigation.
- Seed germination was inhibited after 7 days of exposure; in the order, oregano > thymus > coriander, the effect of OE vapors acting cumulatively over time and both radicle emission and seedling length were affected.
- There were no perceptible sensory differences between the two applied concentrations regarding the sensory evaluation of bread obtained from seeds exposed for 28 days to EO vapors. In terms of general acceptability, the first place is the version of bread from seeds fumigated with TEO, followed by CEO and OEO.
- Vapor-phase TEO, OEO and CEO essential oils can be a sustainable alternative to preserving wheat seeds for baking, ensuring safety and protection against mycotoxin-producing fungi. Due to the negative effects on germination, their application is not recommended if the destination of the seeds is to obtain a field crop.

The purpose of the study carried out in Chapter 5 and entitled "**CONTRIBUTIONS REGARDING THE USE OF GRAPE GRAPES AS AN ANTIFUNGAL AND ANTIMICOTOXIGEN AGENT IN WHEAT FOR FOOD CONSUMPTION**" was to test and analyze the antifungal and anti-toxic effects of treatments with natural extracts based on pomegranate of grapes. This research aims to provide a natural solution for the prevention, control or reduction of fungal contamination in the agricultural sector, the food industry and in grain storage, milling and processing subunits, but also to encourage sustainable food systems, oriented towards innovative strategies for the utilization of by-products and waste from manufacturing processes, resulting in large amounts of waste from the fruit processing industry globally.

The results obtained regarding the possibility of reducing the fungal and mycotoxin contamination of the wheat intended for baking by the use of pomace led to the following conclusions:

- According to the data obtained, in order to ensure optimal antifungal control of wheat in warehouses, it is recommended to use a GPE 10% treatment, which significantly reduces the contamination of wheat with Fusarium, the effect being reported only after 14 days of administration.
- The results showed a different effect of grape pomace extracts on the development of fungi and molds depending on the strain and treatment time. Regarding the antifungal effect against Fusarium developed on wheat seed, the results indicated that the administration of lower concentrations (5-6.5%) leads to the inhibitory effect even after 7 days of treatment and increases over time.
- Regarding the antimycotoxigenic effect, the DON level decreases after treatment with grape pomace extracts in all experimental variants tested, with a greater decrease after 7 days compared to 14 days after treatment, depending on the concentration.
- Due to its high bioactivity and lack of toxicity, grape pomace can be used as a natural antifungal and antifungal agent in the protection of cereals in the context of the circular economy.
- Regarding the antimycotoxigenic effect of GPE, the level of DON decreases with the concentration of GPE in all experimental variants tested, with a greater decrease after 7 days compared to 14 days after treatment.
- Due to the high bio-active potential and the absence of toxicity, grape pomace can be used as a natural antifungal and antimycotoxigenic agent in the protection of cereals in the context of the circular economy as an alternative to synthetic products.
- The resulting data leave the possibility of implementing these strategies based on natural products, safe for the environment, biodegradable and low toxicity, in the prevention and

control or reduction of fungal contamination, in the agricultural sector, in the food industry and in subunits. grain storage, milling and processing.

The fourth study presented in chapter 6, refers to: **CONTRIBUTIONS REGARDING THE OBTAINING OF SOME NATURAL PREPARATIONS BASED ON ESSENTIAL OILS AS ANTIFUNGAL AND ANTIMYCOTOXIGEN AGENTS FOR BREAD WHEAT**" and aims to study the antifungal and antimycotoxigenic effect against the development of deoxynivalenol (DON ) of binary and tertiary essential oils (EO) of *Thymus vulgaris*, *Oreganum sativum* and *Coriandrum sativum*, as well as emulsions obtained based on essential oils on wheat grains intended for the bakery industry. The chemical composition of the essential oils, the physical characteristics of the emulsions and the influence of the treatment on the proximate composition of the wheat seeds were also studied.

Based on our previous results that demonstrated the antifungal and antimycotoxigenic potential of coriander, thyme and oregano EOs, in this study we evaluated, on the one hand, the synergistic/antagonistic effects obtained by combining the previously analyzed EOs, on the other hand, to natural emulsions based on binary and tertiary mixtures of EO are obtained, which we can test from the point of view of antifungal and antimycotoxigenic effects.

Although the antifungal and antibacterial potential of EO has been demonstrated, currently there are few studies on the synergism or antagonism exerted by the joint use of EO.

Thus, in this study, natural preparations based on a binary/tertiary mixture of EO with an antifungal and antimycotoxigenic role were proposed, aiming through this alternative approach to ensure food safety and significantly reduce the side effects of mycotoxins on human health.

In this sense, the objectives of this study refer to: i) obtaining binary and tertiary mixtures based on coriander, thyme and oregano; ii) chemical characterization of the mixtures by GC-MS; iii) obtaining and characterizing natural emulsions based on EO; iv) evaluation of the antifungal and antimycotoxigenic potential of EO mixtures and natural emulsions on wheat grains intended for baking; v) to study the influence of fungal/mycotoxin contamination on the physico-chemical properties of wheat flour.

The conclusions resulting from this study are:

- The results obtained in this study show the possibility of using binary/tertiary EO mixtures and emulsions based on oregano, coriander and thyme EO as healthy and environmentally friendly alternatives in the wheat processing industry to synthetic fungicides.
- Natural preparations obtained in the form of oil-in-water emulsions (O/W) stabilized using a natural product (lecithin) as an emulsifier, represent stable systems with reduced dispersion capacity, able to be used in grain warehouses and bakeries as antifungal agents and antimycotoxigenic.
- The chemical composition revealed that thymol and o-cymene were the major components in thyme binary EO, respectively linalool in coriander binary EO and carvacrol and o-cymene in oregano binary EO.
- The results showed that, based on the zeta potential, the tertiary system ensures the maximum stability of the emulsion, while the binary emulsions and in particular the emulsion based on thyme and oregano is the less stable system.

From the point of view of the antifungal potential, the results showed that the storage of wheat seeds in an atmosphere enriched with essential oil vapors has a direct effect on the mycobiota of the seeds, a fact observed especially after 28 days by determining the total fungal frequency index in the seeds .

• Regarding the antifungal and antimycotoxigenic effect, the results showed that the highest inhibition potential, both in terms of fungi and DON, was observed for the binary mixture based on thyme and oregano, the effect being maximum on fungi at the use of the binary mixture of EOs, respectively on DON in the case of the binary emulsion based on the same EOs. The proximate composition of DON-contaminated wheat seeds showed an increase in protein and mineral content after OE treatment and changes in the color of wheat seeds.

• Obtaining some natural binary/tertiary emulsion type preparations that have been characterized in terms of stability, by determining the zeta potential, indicating that ternary systems are more stable compared to binary ones and it is recommended to use 3-component mixtures in the preparation stable emulsions intended for phytopharmaceutical products from ecological agriculture;

• All binary/tertiary combinations have inhibitory potential against fungal growth, but the duration of action differs depending on the type of essential oil and strains.

The antimycotoxigenic effect against DON was recorded for all binary/tertiary combinations studied.

- The antifungal and antimycotoxigenic effect was maximum when the mixture based on thyme and oregano was applied to wheat seeds, with the mention that com

binary OE bination was more active against fungi, while binary emulsion was more active against DON development. This highlights the fact that the excipients added in the preparation of the emulsion (in our case lecithin) can improve the antimycotoxigenic effects of the essential oils.

- The maximum effect on *Fusarium*, the main pathogen in wheat culture, was obtained by exposure to the TO binary mixture and a greater efficiency was observed in the case of the oil mixture treatment compared to the emulsions, a fact explained by the prolonged exposure of the spores/hyphae to the vapor of essential oils, which over time affects their viability.

- It should be noted that the tertiary combination, both in the form of EO and emulsion, does not lead to a maximum antifungal and antimycotoxigenic effect, indicating that there are antagonistic effects between the three oils that influence the potential of action against fungi and DON . development.

- DON inhibition varied in the case of binary OE mixtures in the order: TC> TOC> OC> TO, while in emulsions the order of inhibition was: TOE> TCE> TOCE> OCE. It should be noted that formulas that include thyme in the composition show the maximum inhibition rate

- The use of binary and tertiary mixtures as an antifungal agent on baking wheat seeds influences the physico-chemical parameters of the seeds.

- Control of temperature and humidity up to the safe storage phase was a key point for mitigating the concentration of mycotoxins in cereal grains

- By applying the treatments, the protein values are stimulated, especially in the case of emulsions, the increase in the protein content of the wheat seeds being associated with the greater accumulation of DON.

- The content of mineral substances of wheat increases by applying treatments, both with OE and with emulsions, the maximum value being recorded for the tertiary emulsion (TOCE).

- The color of the wheat is affected by the treatment with essential oils and emulsions and depends on the nature of the oil and the excipients used in the preparation of the emulsions, with significant differences compared to the control being observed after exposure to EO and binary/tertiary emulsions, which can influence the sensory properties of the flour obtained after treatment.

- The analysis of the correlations between the parameters showed a very significant positive correlation between the major chemical compounds of the essential oils (o-Cymen,  $\beta$ -Linalool, Thymol and Carvacrol) and the degree of inhibition of DON. The main chemical compounds of the EO analyzed, according to the GC-MS profile, were: Correlation analysis showed a very high positive correlation between these compounds and DON inhibition

- Regarding the sensory analysis of the bread samples obtained from wheat treated with binary and tertiary mixtures, consumers appreciated the taste and smell conferred by thyme the least, while the products treated with oregano and coriander, both in the form of binary mixtures of essential oils and emulsions were the most appreciated.

### **Part III. General conclusions and recommendations**

Through the general conclusions and recommendations formulated, the doctoral thesis contributes to the development of scientific knowledge in the field of fungal development control and the development of mycotoxins in cereals and derived products. The impact of the doctoral thesis is reflected at the scientific, applied, social and ecological level.

Scientific contributions refer to:

- Obtaining innovative solutions for fungal and antimycotoxigenic protection of cereals and derived products by combining essential oils and natural extracts from plants, which wish to be patented;
- Contributions regarding the correlations between the chemical composition of essential oils and the antifugic and antimycotoxic effects OF genes exercised by them;
- In vitro and in vivo study of the impact of constituent plant matrices and natural preparations on fungal development and mycotoxin development;

- The study of the synergistic/antagonistic effects generated on fungal and mycotoxin production by the association of active plant principles;
- Study of the influence of fungal and mycotoxin contamination on the main qualitative and baking indices of products derived from cereals;
- Highlighting the importance of thermal treatments applied in the bakery industry as methods of preventing and reducing fungal contamination of floury foods;
- Contributions regarding the impact of treatment with essential oils and natural preparations on the sensory properties of bakery products.

From an applied point of view, the doctoral thesis offers practical, natural solutions applicable in grain warehouses and milling and bakery units in order to prevent and reduce fungal contamination. Recommendations are also proposed regarding the judicious management of fungal and preventive control in grain warehouses, milling and bakery units.

The results obtained confirm that the practice of organic agriculture leads to an increase in the fungal load and the risk of contamination with mycotoxins, compared to conventional agriculture, especially the incident of deoxynivalenol and fumonisins as a result of the high incident of the development of *Fusarium* species in the field on the wheat crop .

Based on the results obtained, the possibility of using binary/tertiary mixtures of essential oils of oregano, coriander and thyme as healthy and environmentally friendly alternatives to synthetic fungal and mycotoxic control products in grain warehouses and the bakery industry is highlighted.

It is recommended to use the essential oils of thyme, oregano and coriander applied in the vapor phase in order to preserve the wheat seeds intended for baking, thus ensuring maximum protection against fungi producing mycotoxins.

The obtained results confirm the fact that the application of treatments based on essential oils in the protection of baker's wheat does not have a significant negative impact on the sensory properties of the bread and it is recommended to use them in a binary mixture of essential oil of coriander and oregano.

The comparative analysis of essential oils from the Lamiaceae family (oregano, thyme) and those from the Umbeliferae family (dill, fennel and coriander) indicates that the antifungal effect is more pronounced when applying treatments from the first family of plants, respectively the antimycotoxicogenic effect, against DON, is more pronounced in the case of the use of umbelliferous plants.

The doctoral thesis proposes innovative solutions for obtaining stable emulsion-type natural preparations using lecithin as an emulsifying agent in a binary/tertiary mixture with essential oils, solutions that can be transferred to the economic environment in order to be prepared on a pilot and macro scale and subsequently marketed.

The impact of the doctoral thesis is also reflected at the social and ecological level through the solutions formulated in the prevention and reduction of the contamination of cereal products and floury foods and the promotion of healthy nutrition, thus supporting the consumer and contributing to increasing the quality of life.

Also, the doctoral thesis proposes solutions for the prevention and reduction of physical and/or natural contamination based on plant extracts and essential oils having a positive impact on the environment.

Last but not least, through the use of gooseberry, a by-product of winemaking, in the technology of obtaining natural preparations, the doctoral thesis is part of the current trends of promoting the circular and sustainable economy.

#### **Part IV. Elements of originality and prospects for further research**

Over the years, innovative scientific research efforts have been devoted to the search for new antifungal materials from natural sources for food preservation and finding alternative solutions to synthetic chemical preparations. In this sense, the doctoral thesis comes to complete the research carried out in this field and to offer innovative protection solutions with applications in the food industry.

**The elements of originality** of the doctoral thesis refer to the following aspects, which increase the scientific value of the studies carried out:

- Obtaining and characterization *in vitro* and *in vivo* of some natural preparations based on essential oils in binary and tertiary systems with antifungal and antimycotoxicogenic effects;
- Optimizing the methods of application of antifungal protection solutions by comparing the effects obtained in the case of applying the treatment by sprinkling with essential oils, respectively fumigation;
- Evaluation of the antifungal and antimycotoxicogenic synergistic potential obtained by combining essential oils in combinations and binary/tertiary emulsions;
- Study of the influence of contamination with *Fusarium* sp. or DON on the nutritional composition of wheat;
- Analysis of the correlation between the chemical composition of the essential oils and the degree of inhibition of the development of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat intended for baking;
- Research on the zeta potential of binary and tertiary natural preparations and the creation of stable systems with reduced dispersion capacity, able to be used in grain warehouses and bakeries as antifungal and antimycotoxicogenic agents.

In order to continue the scientific efforts carried out within this doctoral thesis, the following **perspectives for the continuation of the research** are proposed:

- The study of other essential oils and plant extracts from the point of view of antifungal and antimycotoxicogenic effects;
- The application of the natural binary and tertiary preparations obtained and characterized in this study in the protection and preservation of other food products, especially in the inhibition of the biofilm created in meat and dairy products;
- Finding new technological solutions for the application of essential oils in the food industry that favor the bioavailability of biologically active compounds and the study of the factors that influence their transfer in food products;
- Expanding research on the antimicrobial potential of essential oils and natural preparations by testing other fungal or bacterial strains;
- Deepening the research in the direction of evaluating the impact that essential oils have on the biologically active and nutritional compounds of food products;
- Evaluation of the possibility of technological transfer to economic agents in the milling and baking industry of the binary/tertiary formulas of natural protective products with a view to industrial scale production and commercialization;
- Dissemination of the results obtained to specialists in the food industry in the form of a set of measures regarding the prevention and methods of reducing contamination applicable in warehouses and milling and bakery units.