



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI  
MEDICINĂ VETERINARĂ  
CLUJ – NAPOCA  
COALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE  
INGINERIE ȘI**



**Ing. Adrian MILĂN**

**TEZĂ DE DOCTORAT  
REZUMAT**

**CERCETĂRI PRIVIND CONȚINUTUL DE  
ZEARALENON ȘI DEOXINIVALENOL ÎN  
PRODUSELE DE PANIFICAȚIE DIN  
TRANSILVANIA**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC  
Prof.dr. Ioan OROIAN**

**Cluj – Napoca  
2015**

## CUPRINS

	Pag.
INTRODUCERE .....	II
CAPITOLUL I	
CONSIDERA II GENERALE PRIVIND MICOTOXNELE .....	II
CAPITOLUL II	
METODE DE DETERMINARE A MICOTOXINELOR .....	III
CAPITOLUL III	
SCOPUL I OBIECTIVELE CERCET RII .....	IV
CAPITOLUL IV	
MATERIAL I METOD .....	V
CAPITOLUL V	
REZULTATE I DISCU II .....	V
5.1. Determinarea zearalenonei .....	V
5.2. Determinarea zearalenonei .....	XII
CAPITOLUL VI	
CONCLUZII .....	XX
BIBLIOGRAFIE .....	XXI

## INTRODUCERE

Micotoxinele sunt metaboliți toxici secundari produși de fungi (mucegaiuri). Aceste toxine fungice sunt foarte variate din punct de vedere chimic (apartin unor familii chimice diferite), cu mase moleculare ce variază de la aproximativ 200 la 500 g/mol. Există sute de micotoxine cunoscute, dar puține au fost cercetate, și doar pentru câteva există metode adecvate de analiză.

## CAPITOLUL I

### CONSIDERAȚII GENERALE PRIVIND MICOTOXINELE

Dintotdeauna consumatorul a fost preocupat ca alimentele puse la dispoziția lui să fie sigure din punct de vedere igienico-sanitar, și nu îi provoace îmbolnăviri.

Astăzi, această cerință a devenit tot mai insistentă, întrucât consumul de alimente pregătite pe scară industrială a crescut foarte mult și deoarece, tot mai des, consumatorul află că alimentele sunt cauza multor îmbolnăviri, uneori a unor decese, consumatorul este aadar vizat și nu în toate cazurile, alimentele consumate sunt de o calitate igienico-sanitară corespunzătoare.

Contaminarea produselor cu mucegaiuri, ridică aspecte importante legate de pierderea inocuității alimentului.

Atenția deosebită acordată mucegaiurilor este datorată caracteristicilor anumitor specii de fungi de a elabora și elibera în aliment metaboliți secundari numiți micotoxine, care au o structură chimică mai mult sau mai puțin cunoscută, dar și capacitatea dovedită de a modifica structuri normale biologice.

Micotoxinele, ca metaboli ai anumitor tipuri de mucegaiuri au astfel efecte nocive atât asupra sănătății omului, cât și asupra animalului care consumă alimente contaminate cu acestea.

Evoluția tehnicilor de recoltare și transformare a produselor agricole, transportul alimentelor pe distanțe lungi și prezentarea consumatorilor prin stocarea prelungită constituie condiții care dacă sunt realizate necorespunzător, devin favorabile dezvoltării microorganismelor nedorite și în particular, a mucegaiurilor.

Micotoxinele sunt metaboli ai mucegaiurilor cu o structură chimică mai mult sau mai puțin cunoscută care au capacitatea de a modifica structuri biologice anormale, cu efecte degradante atât la om, cât și la animale.

Aceste toxine pot fi conținute în sporii de mucegai sau de cele mai multe ori eliminate în substratul de creștere (aliment).

Micotoxinele sunt substanțe chimice produse de anumite specii de mucegaiuri: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium*, etc. Ele pot fi puse în evidență în sporii acestora sau în substratul pe care cresc fungii.

## CAPITOLUL II

### METODE DE DETERMINARE A MICOTOXINELOR

De la descoperirea micotoxinelor, au fost dezvoltate mai multe metodologii pentru determinarea lor. Metodele utilizate în mod curent se bazează în principal pe cromatografie în strat subțire, de gaz-cromatografie, sau pe cromatografia lichidă de înaltă performanță cromatografie (Gilbert, 2002). În ultimii ani, cromatografia de lichide de înaltă performanță cuplată cu spectrometria de masă a devenit tot mai utilizată, ca urmare a tendinței de determinare simultană a diferitelor clase de micotoxine.

Alte opțiuni importante, în analiza micotoxinelor sunt cele reprezentate de utilizarea imunosenzorilor, care oferă o alternativă rentabilă la utilizarea unor tehnici imunochimice

(Krska și colab, 2008). De asemenea, au fost dezvoltate matrici pe bază de biosenzori, care sunt utilizate pentru analiza nivelurilor de expresie ale genelor, ceea ce implică biosinteza unora dintre cele mai importante micotoxine (Schmidt-Heydt și Geisen, 2007).

### **CAPITOLUL III**

#### **SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII**

Scopul prezentei teze de doctorat este cel de a determina conținutul de zearalenon și deoxinivalenol în produsele de panificație, reprezentate de pâine albă, pâine neagră și pâine intermediară, produse și/sau comercializate în Cluj-Napoca.

În vederea evidențierii particularităților specifice implementării politicilor fitosanitare comunitare în legislația românească, obiectivele tezei de doctorat sunt orientate spre următoarele aspecte:

- Identificarea zearalenonei din produsele de panificație produse și comercializate în județul Cluj.
- Identificarea deoxinivalenolului (DON) din produsele de panificație produse și comercializate în județul Cluj.
- Implementarea metodologiilor de identificare a zearalenonei și deoxinivalenolului (DON) din produsele de panificație.

Pentru realizarea obiectivelor propuse s-a elaborat planul experimental al cercetării luându-se în considerare metodologia specifică acestui demers, care face recurs la instrumentele specifice cromatografiei de lichide de înalt performanță (HPLC), dar se fundamentează pe un important suport gnostic pragmatic referitor la portofoliul metodologiilor cromatografice, în ansamblul lor și instrumentelor de utilizare a acestora.

## **CAPITOLUL IV**

### **MATERIAL ȘI METODĂ**

Determinările au fost efectuate în perioada ianuarie 2013- ianuarie 2015, din probe ce constau în produse de panificație, respectiv pâine albă, pâine integrală și pâine neagră, procurate din comerț, în municipiul Cluj – Napoca.

Principiul de determinare cantitativă prin HPLC a zearalenonei cu detector de fluorescență include după prelevarea probei, anterior etapei de cuantificare propriu-zise, o serie de operații de pregătire a acesteia.

Pentru separare s-a optat pentru utilizarea a două tipuri de coloane, pe de o parte, coloane de imunoafinitate, care leagă micotoxina, la trecerea acesteia prin coloana, de anticorpul specific aflat în umplutura coloanei, iar pe de altă parte, coloane multifuncționale, Mycosep® 225 și coloana Multisep® 216, care lasă trece micotoxina prin coloana, în timp ce compușii de interferență sunt reținuți în umplutura coloanei.

## **CAPITOLUL V**

### **REZULTATE ȘI DISCUȚII**

#### **5.1.DETERMINAREA ZEARALENONEI**

Este bine cunoscut faptul că zearalenona (ZON) are efecte importante asupra sistemului reproductiv la animalele de rentă și dintre acestea cu precădere la porcine, datorită interacțiunii dintre micotoxine și receptorii estrogenilor (Zinedine et al., 2007). Potențialul cancerigen al zearalenonei la subiecții umani a fost supus unui lung șir de teste,

în ultimele decenii, fiind evaluat de c tre Agenția Internațională pentru Cercetare în Domeniul Cancerului (IARC).

Acesta a fost evaluat ca având un slab potențial carcinogen pentru persoanele mature, fiind încadrat în Grupa 3 de toxicitate ([www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)). Studii efectuate în Puerto Rico în perioada 1978 – 1981 ([http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf)), îns , demonstrează faptul că zearalenona aflat în concentrații ce depășesc limitele maxime admise (50 µg/kg) în alimentația copiilor mici, poate constitui cauza inducerii pubertății precoce la aceștia.

Studii efectuate la nivel mondial au determinat Comitetul științific pentru alimentație să publice într-un raport provizoriu conform căruia un aport mediu zilnic de zearalenon cu o concentrație maximă tolerabilă de 0,2 pg/kg greutate corporală /zi nu este considerat un risc în cazul copiilor ([http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa\\_archive\\_en.asp](http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa_archive_en.asp)).

Conform datelor existente la nivel global, Comitetul de cooperare științifică pe probleme referitoare la produsele alimentare (SCOOP) raportează faptul că aportul alimentar de zearalenon în alimentele evaluate de populația din statele membre ale UE, între care pâinea reprezintă componenta principală, nu depășește doza zilnică maximă admisă (<http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>).

Astfel, este demn de menționat faptul că, la ora actuală, limitele legislative modificate, conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005, sunt:

- 100 µg/kg pentru cerealele brute, altele decât porumbul.
- 75 µg/kg pentru făina de cereale, cu excepția făinii de mlaie.
- 50 µg/kg pentru pâine, produse de patiserie, biscuiți.
- 50 µg/kg pentru alte gustări pe bază de cereale și cereale pentru micul dejun.
- 20 µg/kg pentru alte preparate pe bază de cereale și produse alimentare pentru copii, destinate sugarilor și copiilor de vârstă mică.

Acestea fiind aspectele legislative care se impun respectate în producția și comercializarea produselor de panificație, în vederea sporirii siguranței și securității alimentare, se impune dezvoltarea metodologiilor de testare a respectării acestor limite.

Așa cum s-a procedat și în studiul de față, extracția zearalenonei se realizează cu mai multe amestecuri de solvenți, cum sunt acetatul de etil, metanolul, cloroformul, acetonitrilul și apa.

Probele supuse analizei au fost testate în vederea stabilirii omogenității acestora. Toate probele testate s-au dovedit a fi toate omogene, a a cum demonstrează și valorile coeficienților de variabilitate - CV (Tabelele 2, 3 și 4).

Tabelul 2

## Omogenitatea probelor de pâine alb

Nivelul ZON	n	Limita de conținut/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Conținutul mediu ZON content	CV/ (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	40	32,20	3,50
Mediu	20	75	65,18	4,20
Mare	16	390	315,67	3,02

Tabelul 3

## Omogenitatea probelor de pâine intermediară

Nivelul ZON	n	Limita de conținut/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Conținutul mediu ZON content	CV/ (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	40	35,98	4,44
Mediu	20	75	70,12	4,15
Mare	16	390	381,43	6,18

În vederea stabilirii celei mai bune soluții de sistem de solvenți, s-a testat stabilitatea coloanei de imunoafinitate selectată, respectiv Easi-Extract®, prin cuantificarea ratei de recuperare (%), în condițiile utilizării a diferite proporții din diferiți solvenți în amestec cu apă (Tabelul 5). Testarea coloanei de imunoafinitate s-a realizat prin utilizarea a 33 probe. O parte alicot de 40 ml extract din fiecare probă se aplică pe coloana de imunoafinitate, după care sunt urmați pașii specifici purificării și eluării.



Tabelul 4

## Omogenitatea probelor de pâine neagr

Nivelul ZON	n	Limita de con inut/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Con inutul mediu ZON	CV/ (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	40	25,11	4,12
Mediu	20	75	47,19	3,99
Mare	16	390	255,16	2,18

Se constat faptul c cele mai mari rate de recuperare (97%-108%) se înregistreaz în condi iile utiliz rii sistemului binar metanol – ap , în diverse proporții (2% - 20%).

Cel mai slab rezultat, respectiv cea mai mic rat de recuperare (%) se înregistreaz în condi iile utiliz rii amestecului binar 4% acetone -ap , când rata de recuperare a fost doar 82% (Tabelul 5).

Tabelul 5

Stabilitatea coloanei de imunoafinitate în condi iile utiliz rii a diferite proporții de metanol, acetone , metanol-acetonitril

Sistemul solvent-ap	Recuperarea
Metanol-ap , 4%	99
Metanol-ap , 8%	105
Metanol-ap , 12%	97
Metanol-ap , 16%	106
Metanol-ap , 25%	108
Acetone -ap , 4%	82
Acetone -ap , 8%	90
Acetone -ap , 12%	97

Tabelu 5 - continuare

Stabilitatea coloanei de imunoafinitate în condițiile utilizării a diferite proporții de metanol, aceton, metanol-acetonitril

Sistemul solvent-ap	Recuperarea
Aceton -ap, 16%	90
Aceton -ap, 25%	96
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 4%	100
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 8%	101
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 12%	95
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 16%	98
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 25%	99

În cazul nostru au fost comparate performanțele utilizării a două amestecuri de astfel de solvenți de spălare. Unul a conținut 15% metanol în soluție tampon fosfat salin, PBS, iar al doilea, 15% metanol în apă. Câte o probă din extractele de zearalenon din cele trei tipuri de probe constând în produse de panificație, respectiv, pâine albă, pâine intermediară și pâine neagră au fost supuse spălării pe coloana de imunoafinitate cu cele două amestecuri amintite (Tabelul 7). Nu au fost înregistrate diferențe semnificative asigurate statistic la pragul de semnificație 5% între conținuturile de zearalenon rezultate (Tabelul 7).

Tabelul 7

Comparație între două metodologii de spălare

Proba/	Soluția de spălare/	n	Conținutul mediu ZON/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	CV (%)
Pâine alb	15% metanol în PBS	5	323,20	4,1
	15% metanol în apă	5	318,12	4,4
Pâine intermediar /	15% metanol în PBS	5	321,12	3,2
	15% metanol în apă	5	319,16	4,8
Pâine neagră	15% metanol în PBS	5	326,25	5,9
	15% metanol în apă	5	339,15	2,8

Analiza rezultatelor cuantificării produselor de panificație reprezentate de pâinea albă a demonstrat faptul că doar în trei dintre zonele de proveniență, respectiv Alba Iulia, Năsăud și Miercurea-Ciuc au fost obținute medii ale concentrației zearalenonei situate sub limita admisă de 50 mg/kg, respectiv 25 μg/kg, 15 μg/kg și 10 μg/kg (Tabelul 9). Pentru cea mai mare parte dintre zonele analizate probele de pâine albă au prezentat o concentrație moderată de zearalenon. Doar în probele de pâine provenite din Brașov, concentrația zearalenonei a fost una mare, egală, în medie cu 395 μg/kg (Tabelul 9).

Tabelul 9

Conținutul mediu de zearalenon în probele de pâine albă, μg/kg

No. probei	Proveniența	Concentrația μg/kg	Încercarea		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limită (μg/kg)			40	75	390
Valoarea limită admisă conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			50		
1	Alba Iulia,	25			
2	Bistrița	69			
3	Năsăud	15			
4	Brașov	395			
5	Cluj-Napoca	125			
6	Sfântu Gheorghe	60			
7	Miercurea-Ciuc	10			
8	Baia-Mare	85			
9	Târgu Mureș	202			
10	Satu-Mare	55			
11	Zalău	89			

În ceea ce privește pâinea intermediară au demonstrat faptul că în patru dintre zonele de proveniență, respectiv Alba Iulia, Năsăud, Miercurea-Ciuc și Zalău au fost obținute

medii ale concentrației zearalenonei situate sub limita admisă de 50 mg/kg, respectiv 14 μg/kg, 18 μg/kg, 12 μg/kg și 21 μg/kg (Tabelul 10). În acest caz, pentru cea mai mare parte dintre zonele analizate probele de pâine intermediară au prezentat o concentrație moderată de zearalenon. Doar în probele de pâine provenite din Brașov și Târgu Mureș, concentrațiile zearalenonei au fost mari, egale, în medie cu 450 μg/kg și respectiv 399 μg/kg (Tabelul 10).

Tabelul 10

Conținutul mediu de zearalenon în probele de pâine intermediară, μg/kg

No. probei	Proveniența	Concentrația μg/kg	Încercarea		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limită (μg/kg)			40	75	390
Valoarea limită admisă conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			50		
1	Alba Iulia,	14			
2	Bistrița	55			
3	Năsăud	18			
4	Brașov	450			
5	Cluj-Napoca	111			
6	Sfântu Gheorghe	88			
7	Miercurea-Ciuc	12			
8	Baia-Mare	78			
9	Târgu Mureș	399			
10	Satu-Mare	89			
11	Zalău	21			

Pâinea neagră nu a avut în niciuna dintre zonele analizate un conținut în zearalenon care o situează în categoria concentrațiilor mari (Tabelul 11). Concentrațiile ale zearalenonei situate sub limita maximă admisă de regulamentele comunitare în vigoare de 50 mg/kg, și situat în categoria concentrațiilor mici, respectiv 40 μg/kg, se înregistrează pentru pâinea

neagr în majoritatea zonelor studiate, Alba Iulia, N s ud, Sfântu Gheorghe, Miercurea-Ciuc, Satu-Mare și Zal u, respectiv 9  $\mu\text{g/kg}$ , 11  $\mu\text{g/kg}$ , 15  $\mu\text{g/kg}$ , 6  $\mu\text{g/kg}$ , 24  $\mu\text{g/kg}$  și 31  $\mu\text{g/kg}$  (Tabelul 11).

Tabelul 11

Conținutul mediu de zearalenon în probele de pâine neagr ,  $\mu\text{g/kg}$

No. probei	Provenien a	Concentra ia $\mu\text{g/kg}$	Înc rc tura		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limit ( $\mu\text{g/kg}$ )			40	75	390
Valoarea limit admis conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			50		
1	Alba Iulia,	9			
2	Bistri a	66			
3	N s ud	11			
4	Bra ov	480			
5	Cluj-Napoca	125			
6	Sfântu Gheorghe	15			
7	Miercurea-Ciuc	6			
8	Baia-Mare	85			
9	Târgu Mure	105			
10	Satu-Mare	24			
11	Zal u	31			

Pentru restul probelor de pâine neagr s-a raportat o concentra ie moderat de zearalenon , cu excep ia Bra ovului, pentru care s-au înregistrat concentra ii mari, cu media de 480  $\mu\text{g/kg}$  (Tabelul 11).

## 5.2.DETERMINAREA DEOXINIVALENOLULUI (DON)

Pentru deoxinivalenol, la ora actual , limitele legislative modificate, conform Regulamentul (CE) nr. 856/2005 (152), sunt:

- 1250 µg/kg pentru cerealele brute, altele decât grâul dur, ov zul i porumbul.
- 1750 µg/kg pentru grâul dur brut i ov zul brut.
- 750 µg/kg pentru f ina de cereale, inclusiv f ina de m lai, crupe de porumb i gri de porumb.
- 500 µg/kg pentru pâine, produse de patiserie, biscuiți, gust ri pe baz de cereale i cereale pentru micul dejun.
- 750 µg/kg pentru paste.
- 200 µg/kg pentru alte preparate pe baz de cereale i produse alimentare pentru copii, destinate sugarilor i copiilor de vârst mic .

Metoda aleas pentru determinarea DON const , de obicei, din cromatografia de lichide de înalt performan (HPLC) cuplat cu detecție în ultra-violet (UV) (50) i a fost deja aplicat la diferite matrici, inându-se cont de faptul c un pas critic este reprezentat de determinarea nivelurilor sc zute. Mai multe metode au fost deja evaluate pentru determinarea DON. Probele supuse analizei au fost testate în vederea stabilirii omogenit ții acestora. Toate probele testate s-au dovedit a fi toate omogene, a a cum demonstreaz i valorile coeficien ilor de variabilitate - CV (Tabelele 15, 16 i 17).

Tabelul 15

### Omogenitatea probelor de pâine alb

Nivelul DON	n	Limita de con inut/ (µg/kg)	Con inutul mediu DON/	CV (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	400	325	4,14
Mediu	20	750	710	2,19
Mare	16	3500	3412	5,12

Tabelul 16

## Omogenitatea probelor de pâine intermediar

Nivelul DON	n	Limita de con inut/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Con inutul mediu DON/	CV (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	400	345	3,18
Mediu	20	750	518	4,88
Mare	16	3500	3214	4,26

Tabelul/Table 16

## Omogenitatea probelor de pâine neagr

Nivelul DON	n	Limita de con inut/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Con inutul mediu DON/	CV (%)
Blanc	22	0	-	-
Mic	30	400	301	4,98
Mediu	20	750	678	3,90
Mare	16	3500	2900	3,11

Cel mai slab rezultat, respectiv cea mai mic rată de recuperare (%) se înregistrează în condițiile utilizării amestecului binar 4% aceton -ap, când rata de recuperare a fost doar 80% (Tabelul 17).

Tabelul 17

## Stabilitatea coloanei de imunoafinitate în condițiile utilizării a diferite proporții de metanol, aceton, metanol-acetonitril

Sistemul solvent-ap	Recuperarea(%)
Metanol-ap, 4%	99
Metanol-ap, 8%	101
Metanol-ap, 12%	95
Metanol-ap, 16%	102
Metanol-ap, 25%	105

Tabelul 17 - continuare

Stabilitatea coloanei de imunoafinitate în condițiile utilizării a diferite proporții de metanol, aceton, metanol-acetonitril

Sistemul solvent-ap	Recuperarea (%)
Aceton -ap, 4%	80
Aceton -ap, 8%	90
Aceton -ap, 12%	97
Aceton -ap, 16%	90
Aceton -ap, 25%	96
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 8%	101
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 12%	95
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 16%	98
Metanol-acetonitrile (50+50, v/v)-ap, 25%	99

În cazul nostru au fost comparate performanțele utilizării a două amestecuri de astfel de solvenți de spălare. Unul a conținut 15% metanol în soluție tampon fosfat salin, PBS, iar al doilea, 15% metanol în apă. Câte o probă din extractele de deoxinivalenol din cele trei tipuri de probe constând în produse de panificație, respectiv, pâine albă, pâine intermediară și pâine neagră au fost supuse spălării pe coloana de imunoafinitate cu cele două amestecuri amintite (Tabelul 19).

Tabelul 19

Compararea între două metodologii de spălare

Proba	Soluția de spălare	n	Conținutul mediu DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	CV (%)
Pâine albă	15% metanol în PBS	5	3200	3,17
	15% metanol în apă	5	3122	5,12
Pâine intermediară	15% metanol în PBS	5	2256	9,44
	15% metanol în apă	5	2954	12,11
Pâine neagră /	15% metanol în PBS	5	2813	4,12
	15% metanol în apă	5	3217	2,03



Astfel, rezultat oportunitatea utilizării metodologiei conform careia se utilizează o spălare cu un prim solvent de spălare în volum de 5 ml (15% metanol în soluție tampon fosfat salin, PBS) și ulterior o a doua spălare cu 15 ml de apă.

În vederea identificării celor mai adecvate operațiuni de extracție, pentru cazul particular al determinării deoxinivalenolului, toate probele au fost măcinate la granulă prestabilită prin moara centrifugală de mare viteză (model Retsch ZM100) cu ochiurile sitei de 0,5 mm. S-a optat pentru 15 minute agitare, urmat de 15 minute de sonicare, iar în cealaltă variantă, 1 oră agitare (Tabelul 20).

Tabelul 20

Comparație între două metodologii de extracție

Proba	Soluția de spălare/	n	Conținutul mediu DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	CV (%)
Pâine albă /	15% min. agitare+15 min sonicare	5	900	10,12
	1 oră agitare	5	910	11,2
Pâine intermediară /	15% min. agitare+15 min sonicare	5	885	17,15
	1 oră agitare	5	870	9,14
Pâine neagră /	15% min. agitare+15 min sonicare	5	916	18,32
	1 oră agitare	5	918	16,12

Analiza rezultatelor cuantificării produselor de panificație reprezentate de pâinea albă a demonstrat faptul că doar în trei dintre zonele de proveniență, respectiv Alba Iulia, Năsăud și Miercurea-Ciuc au fost obținute medii ale concentrației deoxinivalenolului situate sub limita admisă de 500 mg/kg, respectiv 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 140  $\mu\text{g}/\text{kg}$  și 102  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 21). Pentru cea mai mare parte dintre zonele analizate probele de pâine albă au prezentat o concentrație moderată de deoxinivalenol. Doar în probele de pâine provenite

din Bra ov, concentra ia deoxinivalenolului a fost una mare, egal , în medie cu 3100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 21).

Tabelul 21

Con inutul mediu de deoxinivalenol în probele de pâine alb ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$

No. probei	Provenien a	Concentra ia	Înc rc tura		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			400	750	3500
Valoarea limit admis conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			500		
1	Alba Iulia,	300			
2	Bistri a	680			
3	N s ud	140			
4	Bra ov	3100			
5	Cluj-Napoca	450			
6	Sfântu Gheorghe	620			
7	Miercurea-Ciuc	102			
8	Baia-Mare	744			
9	Târgu Mure	432			
10	Satu-Mare	355			
11	Zal u	399			

În ceea ce prive te pâinea intermediar au demonstrat faptul c în patru dintre zonele de provenien , respectiv Alba Iulia, N s ud, Miercurea-Ciuc i Zal u au fost ob inute medii ale concentra iei deoxinivalenolului situate sub limita admis de 500  $\text{mg}/\text{kg}$ , respectiv 130  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 170  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 131  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i 298  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 22). i în acest caz, pentru cea mai mare parte dintre zonele analizate probele de pâine intermediar au prezentat o concentra iei moderat de deoxinivalenol. Doar în probele de pâine provenite din Bra ov i Târgu Mure , concentra iile deoxinivalenolului au fost mari, egale, în medie cu 2900  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i respectiv 3130  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 22).

Tabelul 22

Coninutul mediu de deoxinivalenol în probele de pâine intermediar ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$

No. probei	Provenien a	Concentra ia $\mu\text{g}/\text{kg}$	Înc rc tura		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limit /Threshold values ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			400	750	3500
Valoarea limit admis conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			500		
1	Alba Iulia,	130			
2	Bistri a	415			
3	N s ud	170			
4	Bra ov	2900			
5	Cluj-Napoca	451			
6	Sfântu Gheorghe	527			
7	Miercurea-Ciuc	131			
8	Baia-Mare	633			
9	Târgu Mure	3130			
10	Satu-Mare	690			
11	Zal u	298			

Pâinea neagr nu a avut în niciuna dintre zonele analizate un coninut în deoxinivalenol care o situeaz în categoria concentrațiilor mari (Tabelul 23).

Concentra ii ale deoxinivalenolului situate sub limita maxim admis de regulamentele comunitare în vigoare de  $500 \text{ mg}/\text{kg}$ , i situat în categoria concentrațiilor mici, respectiv  $400 \mu\text{g}/\text{kg}$ , se înregistreaz pentru pâinea neagr în majoritatea zonelor studiate, Alba Iulia, N s ud, Sfântu Gheorghe, Miercurea-Ciuc, Satu-Mare i Zal u, respectiv  $80 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  i  $19 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 23).

Tabelul/Table 23

Coninutul mediu de deoxinivalenol în probele de pâine neagr ,  $\mu\text{g}/\text{kg}$

No. probei	Provenien a	Concentra ia $\mu\text{g}/\text{kg}$	Înc rc tura		
			Mic	Moderat	Mare
Valori limit ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			400	750	3500
Valoarea limit admis conform Regulamentului (CE) nr. 856/2005			500		
1	Alba Iulia,	80			
2	Bistri a	618			
3	N s ud	60			
4	Bra ov	3400			
5	Cluj-Napoca	558			
6	Sfântu Gheorghe	40			
7	Miercurea-Ciuc	25			
8	Baia-Mare	540			
9	Târgu Mure	620			
10	Satu-Mare	20			
11	Zal u	19			

Pentru restul probelor de pâine neagr s-a raportat o concentra ie moderat de deoxinivalenol, cu excep ia Bra ovului, pentru care s-au înregistrat concentra ii mari, cu media de  $3400 \mu\text{g}/\text{kg}$  (Tabelul 23).

## CAPITOLUL VII

### CONCLUZII

Cercetările întreprinse în cadrul prezentei teze de doctorat referitoare la determinarea conținutului de zearalenon și deoxinivalenol în produsele de panificație, reprezentate de pâine albă, pâine neagră și pâine intermediară, produs și/sau comercializat în Transilvania, au condus la o serie de concluzii:

- Micotoxinele sunt substanțe chimice produse de anumite specii de mușcări: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichothecium*, etc. Ele pot fi puse în evidență și în sporiile acestora sau în substratul pe care cresc fungii. Există o varietate foarte mare de micotoxine, dar nu toate sunt importante din punctul de vedere al siguranței alimentare umane. Micotoxinele cele mai importante, cu riscuri semnificative pentru siguranța alimentară umană sunt: aflatoxinele, fumonisinele, ochratoxinele, patulina, trichotecina și ergotoxina.
- În detecția zearalenonei și a deoxinivalenolului se utilizează în mod curent cromatografia de lichide de înalt performanță, HPLC și/sau cromatografia de lichide de înalt performanță, cuplată cu spectrometria de masă (HPLC-MS). În cazul ambelor micotoxine se utilizează, în vederea detecției, coloanele de imunoafinitate, însă zearalenona necesită un detector de fluorescență (HPLC-FD), în timp ce în cazul deoxinivalenolului detecția se realizează cu ajutorul unui detector în ultraviolet (HPLC- PDA).
- Reprezentarea grafică a celor două replicare pentru fiecare dintre probele analizate evidențiază particularități specifice, care confirmă adecvarea metodologiei practicate în studiul de față pentru determinarea conținutului de zearalenon în probele de pâine albă, intermediară și neagră slab, moderat și puternic contaminate cu zearalenon.

- La fel ca și în cazul studiului conținutului zearalenonei în probele de panificație analizate, și în cazul deoxinivalenolului, reprezentarea grafică a celor două replicare pentru fiecare dintre probele analizate, evidențiază particularități specifice, care confirmă adecvarea metodologiei practicate în studiul de față pentru determinarea conținutului în deoxinivalenol în probele de pâine albă, intermediară și neagră slab, moderat și puternic contaminate cu micotoxine.

## BIBLIOGRAFIE

1. Alm H., Brussow K.P., Torner H., Vanselow J., Tomek W., Danicke S., Tiemann U. – *Influence of Fusarium – toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilts oocytes* – Reproductive toxicology, 2006, 22, 44-50.
2. Bancroft J.D., Gamble M. – *Theory and practice of histological techniques, sixth edition* – Churchill Livingstone Elsevier, 2008, ISBN: 978-0-443-10279-0.
3. Bennett J.W., Klich M. – *Mycotoxins* – Clinical Microbiology Reviews, 2003, vol. 16, no. 3, p. 497-516.
4. Milăn A., I. Oroian, Testing Zearalenone determination techniques in bread products, *ProEnvironment* 8(23):402-406, 2015.
5. Milăn A., Oroian, Testing Deoxynivalenole (DON) determination techniques in bread products, *ProEnvironment* 8(23):407-410, 2015.
6. Pfohl-Leskowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E. – *Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A* – Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis, 1993, 289:265-273.
7. Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L. – *Ochratoxin A : a review* - Pure and Applied Chemistry, 1992, 64: 1029-1046.
8. Polan C.E., Hayes J.R., Campbell T.C. – *Aflatoxins* – J. Agric. Food. Chem., 1974, 22(4):635.

9. Popa R., Lupescu C., Popovici A., Mili N., Ciupescu L., Ciupescu V. - *Factors of food contamination*, Revista Română de Medicină Veterinară, 2012, vol 22, nr. 3, pag. 23-30.
10. Pfohl-Leszkowicz A., Grosse Y., Kane A., Creppy E.E. – *Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A* – Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis, 1993, 289:265-273.
11. Pohland A.E., Nesheim S., Friedman L. – *Ochratoxin A : a review* - Pure and Applied Chemistry, 1992, 64: 1029-1046.
12. Polan C.E., Hayes J.R., Campbel T.C. – *Aflatoxins* – J. Agric. Food. Chem., 1974, 22(4):635.
13. Popa R., Lupescu C., Popovici A., Mili N., Ciupescu L., Ciupescu V. - *Factors of food contamination*, Revista Română de Medicină Veterinară, 2012, vol 22, nr. 3, pag. 23-30.