

Impactul micotoxinelor asupra lantului alimentar.
Metode moderne de analiza si control al continutului de
fungi si micotoxine din produsele alimentare

Dr. Ing. Alina Alexandra DOBRE
INCDBA - IBA



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

Micotoxinele:

- ✓ produși secundari de metabolism elaborati de fungi filamentosi toxigeni printr-o serie de reactii catalizate de enzime in conditii specifice:
 - capacitatea genetica
 - substratul
 - umiditatea
 - pH-ul substratului
 - temperatura
 - aeratia
 - luminozitatea
 - microorganismele concurente
 - perioada de timp de la contaminare, etc
- ✓ se gasesc în sporii si talul micetilor sau ca produși de secretie ai acestora în substraturile unde se dezvoltă
- ✓ exista cca 300 – 400 micotoxine ce apartin la 24 de grupe chimice de toxine care pot apărea in conditii diferite in productiile agricole si in diferitele alimente obtinute din acestea
- ✓ cele trei genuri de fungi producatori de micotoxine, importante din punct de vedere economic, sunt *Aspergillus*, *Penicillium* si *Fusarium*





I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ **Factori ce favorizeaza patrunderea micotoxinelor in lantul alimentar**

CAMP

Factori biologici

Plante susceptibile la fungi toxigeni
(*Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*)

Factori de mediu

Temperatura
Umiditate
Insecte
Pasari
Rozatoare

Recoltare

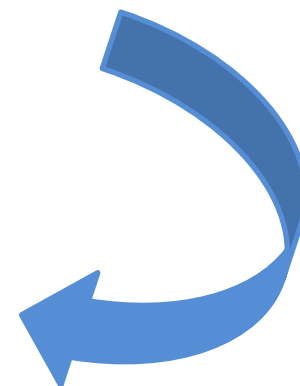
Metode de recoltare
Perioada de recoltare

Conditii de depozitare

Temperatura
Umiditate
Contaminari anterioare
(*Aspergillus*, *Penicillium*)



OM



ANIMALE

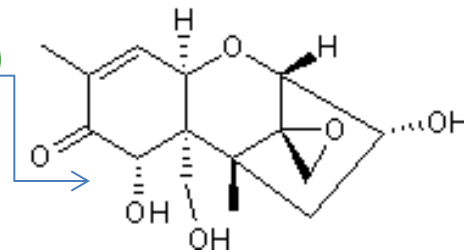
Distributie

I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Principalele micotoxine

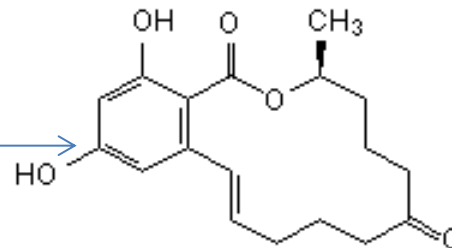
- Deoxinivalenol (DON)**

Fusarium sp.



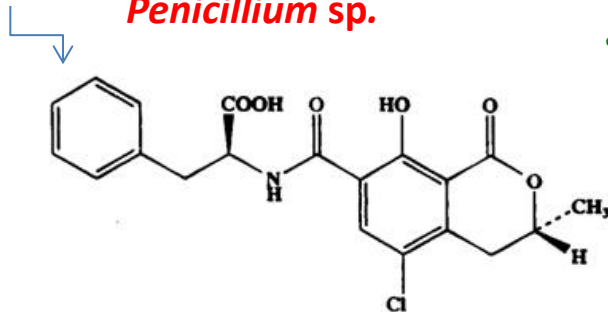
- Zearalenona (ZEA)**

Fusarium sp., Gibberella sp.



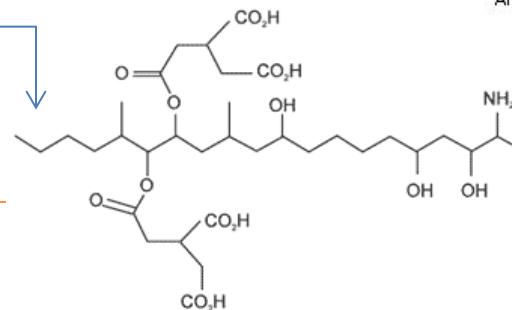
- Ochratoxina A (OTA)**

Penicillium sp.



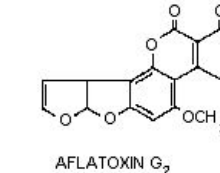
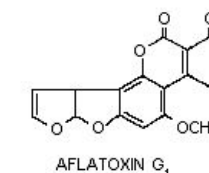
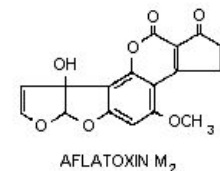
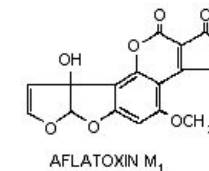
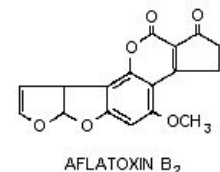
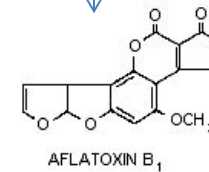
- Fumonizina (FUM)**

Fusarium sp.



- Aflatoxine totale (AFLA)**





Aspergillus sp.





I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Plantele si riscul micotoxicologic

Planta	Lant alimentar	Toxina	Specia fungica
Grau 	Alimente/furaje	Deoxinivalenol Zearalenona Ocratoxina A	<i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicilium</i> sp.
Porumb 	Alimente/furaje	Fumonizina Aflatoxine	<i>Fusarium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.
Struguri 	Alimente	Ochratoxina A	<i>Aspergillus</i> sp.
Nuci si fructe uscate 	Alimente	Aflatoxine	<i>Aspergillus</i> sp.

I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ *Ochratoxina A.*

Penicillium verrucosum

- Culturi cerealiere

Aspergillus ochraceus

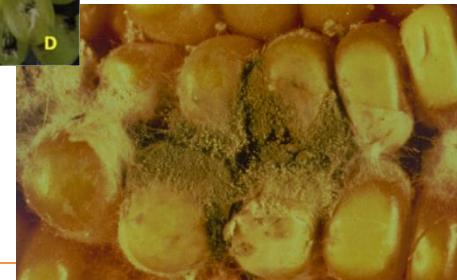
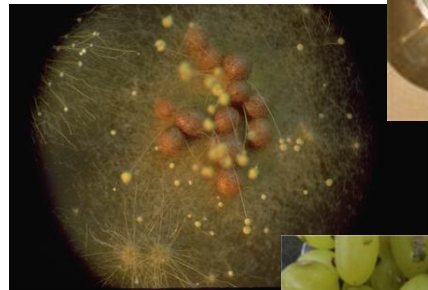
Alimente depozitate,
produse uscate, cafea

Aspergillus carbonarius

Struguri, fruste uscate,
cafea

Aspergillus niger

Struguri, fructe uscate,
cafea, fasole





I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Ochratoxina A. – EFECTE TOXICE - Ochratoxicoza

Animale

- ✓ Efectul primar al OTA la toate animalele de ferma consta in nefrotoxicitate;
- ✓ La pasari si porci, tubii proximali sunt in primul rand afectati, iar rinichiul este palid si marit in volum;
- ✓ Nefropatia porcina micotoxica;
- ✓ Efect teratogenic, carcinogenic, imunosupresiv;

Oameni

- ✓ Este suspectata în etiologia **nefropatiei umane** si a **tumorilor aparatului urinar**;
- ✓ Multe studii au aratat implicarea ochratoxinei A in aparitia maladiei „Nefropatia Endemica Balcanica” care a fost depistata in anumite regiuni din Bulgaria, Croatia, Serbia si Romania;
- ✓ Boala se caracterizeaza prin afectarea bilaterala a rinichilor, o rata crescuta a mortalitatii datorita uremiei;
- ✓ Inducerea cancerului la oameni a fost confirmata si de Agenția Internationala de Cercetari asupra Cancerului (IARC)



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ *Ochratoxina A. – Aspecte legislative*

Limite maxime admise Uniunea Europeana

✓ Regulamentul european (CE) Nr 1881/2006 din 19 decembrie 2006

Ochratoxina A	Nivel maxim admis µg/kg
Cereale neprelucrate	5,0
Toate produsele derivate din cereale neprelucrate, cerealele destinate consumului uman direct	3,0
Cafea boabe prajita si cafea prajita macinata	5,0
Stafide (currants si sultanine)	10,0



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Aflatoxine (B₁, B₂, G₁, G₂, M₁)

- ✓ *A. flavus*,
- ✓ *A. parasiticus*,
- ✓ *A. nomius*,
- ✓ *A. Pseudotamarii*,
- ✓ *A. niger*.

Există patru aflatoxine majore B₁, B₂, G₁, G₂ (cu incidenta crescuta in alimente si nutret) si doi produsi de metabolism (M₁ si M₂). Aflatoxina M₁ a fost izolata pentru prima data din lapte.

In general fungii din genul *Aspergillus* sunt nelipsiti de pe toate cerealele si furajele, datorita abilitatii lor de a invada substraturile solide

Sunt prezente in special in zonele tropicale si subtropicale

Contaminarea subtratelor incepe in camp

Contaminarea poate aparea si dupa recoltare, daca cerealele nu au fost corect uscate



Principalele specii producatoare de aflatoxine:



Aspergillus parasiticus

Aspergillus nomius

Aspergillus flavus



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Aflatoxine – Conditii care conduc la acumulare

1. Conditii de mediu

- Temperatura ridicata
- Stres hidric

Pentru producerea aflatoxinelor, temperaturile ridicate sunt mai importante decat umiditatea sau precipitatile din acea perioada

2. Sistemul de cultivare

- Monocultura
- Utilizarea hibrizilor susceptibili
- Densitate mare la semanat
- Soluri nisipoase (cu continut ridicat de nisip)
- Semanat intarziat
- Controlul buruienilor nepotrivit

3. Perioada de recoltare

Contaminarea este cumulativa, iar intarzierile la recoltare pot influenta negativ problema contaminarii

- Maturarea semintelor este in jurul 30-32% umiditate
- Recoltarea la 26-28% umiditate reduce denaturarea boabelor (graunte)
- Boabele contaminate reprezinta principala contributie la contaminarea cu aflatoxine la depozitare



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Aflatoxine – Efecte toxice - Aflatoxicozele

➤ Animale

- toxigene, carcinogene (cele mai puternice carcinogene naturale cunoscute), mutagene si teratogene;
- aflatoxicoza bovina acuta (anorexia, letargia, ascita, icterul si diareea cu sange);
- avort, hepatoencefalopatia si fotosensibilitate;
- imunosupresia, infertilitatea, precum si interactiuni nutritionale;
- performante scazute (sporul in greutate, productia de lapte) reprezinta unul dintre indicatorii cei mai sensibili ai aflatoxicozei
- Aflatoxicoza este carcinogenica si teratogena pentru fetusii mamiferelor

➤ Oameni

- Aflatoxicoza este o afectiune intalnita cel mai des in regiunile mai putin dezvoltate, unde contaminarea alimentelor cu aflatoxina este greu de depistat
- Ficatul este organul afectat in cea mai mare masura de aflatoxina, dar aceasta se acumuleaza si in plamanii, rinichii, creierul si inima persoanelor care sufera de aflatoxicoza.
- Toxina cauzeaza necroza tesuturilor si ciroza ficatului.
- Consumul unor cantitati mai mici de aflatoxina, dar timp mai indelungat, produce intoxicatia cronica, manifestata prin anemie, icter si, uneori, dezvoltarea carcinomului hepatocelular.



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

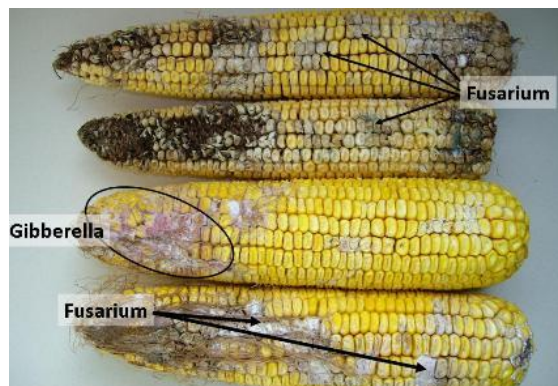
➤ Aflatoxine – Aspecte legislative – Regulamentul european (CE) nr. 1881/2006

Aflatoxine	Nivel maxim admis $\mu\text{g/kg}$		
	B1	totale	M1
Alune de pamant (arahide) si alte seminte si fructe oleaginoase	8,0	15,0	-
Alune de pamant procesate	2,0	4,0	-
Fructe uscate	5,0	10,0	-
Cereale si derivate	2,0	4,0	
Porumb și orez	5,0	10,0	
Lapte brut, lapte tratat termic și lapte destinat fabricarii de lactate	-	-	0,05
Condimente	5,0	10,0	

I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ *Zearalenona*

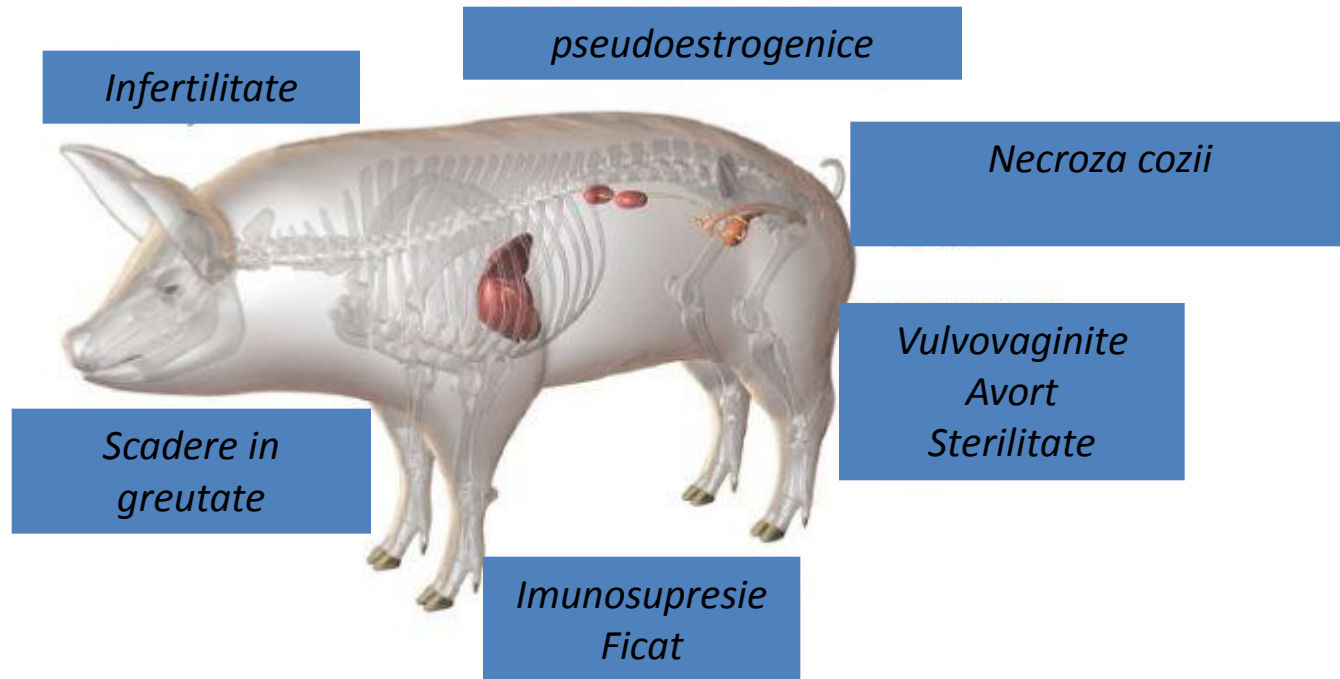
- *F. gramineum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. Avenacum* – infecteaza cerealele inainte de recoltare, perioada in floritului, dar contaminarea poate aparea si la depozitare in conditii de umiditate > 22%.
- Toxina este un compus stabil atat pe durata depozitarii, macinarii, procesarii cat si prepararii alimentelor. Nu se degradeaza la temperaturi ridicate.
- Deoarece sporii de *Fusarium* sunt omniprezenti, cerealele (grau, orez, porumb, orz, ovaz) sunt susceptibile la contaminarea cu ZEN (zone cu climat temperat sau cald).
- *Fusarium graminearum* si *Fusarium culmorum* care provoaca putregaiul tulpinilor si stiuletilor de porumb
- Poate să apară simultan cu unele toxine trichotecene (DON)





I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Zearalenona - Toxicitate



- Intoxicarea are loc la o concentratie intre 50 si 200 $\mu\text{g/kg}$ furaj administrat (5-20 ppm)



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Zearalenona – legislatie

Zearalenona	Nivel maxim admis $\mu\text{g/kg}$
Cereale neprocesate exceptand porumbul	100
Porumb neprocesat	350
Cereale prelucrate	75
Porumb procesat	100
Paine si alte preparate	50
Alimente pe baza de porumb pentru copii	20
Ulei de porumb rafinat	400



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Deoxinivalenol (DON sau vomitoxina)

Fusarium graminearum – si alte specii de Fusarium

- DON este cel mai cunoscut si frecvent contaminant al cerealelor si produselor cerealiere. Prezenta in cereale si furaje reprezinta mai mult de 90% din totalul probelor si este un indicator potential al contaminarii cu alte micotoxine
- Aceasta a fost detectata in hrisca, floricele de porumb, sorg, triticales, si alte produse alimentare, inclusiv faina, paine, cereale pentru micul dejun, fidea, alimente pentru sugari
- La animale DON afecteaza sistemul imun si modifica multi parametri sanguini, in plus este un important iritant gastrointestinal. Nu exista indicii in privinta unor proprietati carcinogene sau mutagene.
- In concentratii mici in hrana, DON reduce cresterea, consumul de hrana, în timp ce dozele acute induc varsaturi (emeza).
- Efectele toxice majore produse de DON la mamifere produc: dermatonecroza, gastroenterita, refuzul hranei, coagulopatie si imunosupresie.
- DON nu constituie o amenintare importanta pentru sanatatea consumatorilor. Efecte: diaree, dureri abdominale, dureri de cap, ameteli, febra, greata, varsaturi.



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Deoxinivalenol (DON) – Aspecte legislative

Limite maxime admise Uniunea Europeana

✓ Regulamentul european (CE) Nr 1881/2006 din 19 decembrie 2006

DON	Nivel maxim admis µg/kg
Cereale neprocesate altele decat graul dur, ovazul si porumbul	1250
Graul dur si ovaz neprocesate	1750
Porumb neprelucrat	1750
Cereale destinate consumului uman direct	750
Paine (inclusiv produse de panificatie)	500



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ Fumonizina

- ✓ Au fost izolate din speciile *Fusarium*: *F. moniliforme sheldon (veticillioides)*, *F. proliferatum*, *F. nopiforme* si *F. Mygamar*
- ✓ Speciile *Fusarium* ataca mai ales porumbul, graul, orzul si orezul
- ✓ Fumonizine cu efect toxic asupra organismului uman sunt urmatoarele: FB1, FB2, FB3 si FB4
- ✓ Fumonizina B1 induce cancerul primar (carcinom esofagian - Africa de Sud (regiunea Transkei) si China) la om, iar la animalele domestice cauzeaza diferite boli specifice acestora (edem pulmonar la porcine, encefalomalacie la cabaline)
- ✓ Edemul pulmonar la suine apare la concentratii mari (175 ppm). Nivelurile de sub 12 ppm induc disfunctii hepatice.



I. STUDIUL PRINCIPALILOR FUNGI SI MICOTOXINE DIN LANTUL ALIMENTAR SI IMPACTUL LOR ASUPRA SANATATII CONSUMATORILOR

➤ *Fumonisina - legislatie*

Fumonisina	Nivel maxim admis $\mu\text{g/kg}$ (B1+b2)
Porumb neprocesat	4000
Porumb destinat consumului uman direct	1000
Cereale pentru micul dejun pe baza de porumb si snackuri pe bază de porumb	800
Produse alimentare pe baza de porumb procesat si alimente pentru copii destinate sugarilor si copiilor de vârstă mica	200



II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Cerinte:

- ✓ Indeplinire limite de reglementare internationale – permit determinarea micotoxinelor la un nivel mai mic decat limita legala
- ✓ Corespunzator pentru programe de monitorizare – controlul calitatii materiilor prime
- ✓ Metode standardizate conform organismelor de standardizare - AOAC (Asociatia Oficiala a Chimistilor Analisti), IUPAC (Uniunea Internațională de Chimie Pura si Aplicata) ISO (Organizatia Internationala de Standardizare), CEN (Comitetul European de Standardizare), si asociatiile nationale de standardizare

II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Procedura tipica de determinare a micotoxinelor in probe solide

1. Esantionare

2. Proba de laborator

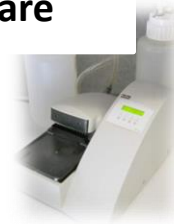
3. Macinare/omogenizare



4. Extractie



8. Spalare



7. Incubare

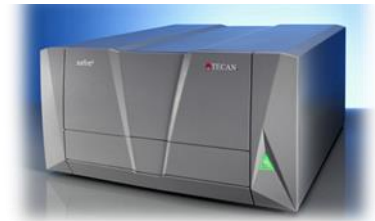
6. Pipetare



5. Filtrare

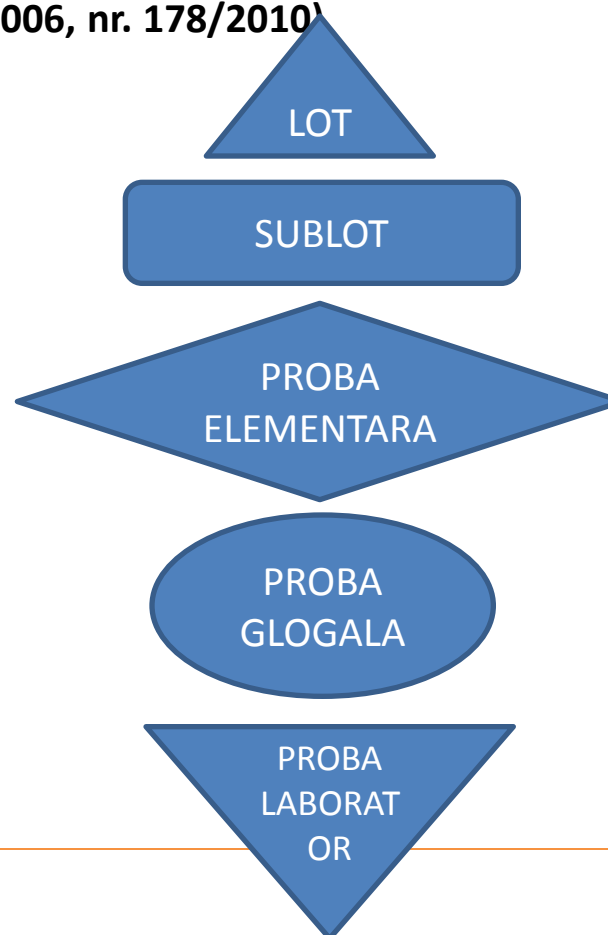


9. Detectie/determinare



II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Esantionarea probelor – probe reprezentative - Metodelor de prelevare a probelor pentru pentru controlul oficial al continutului de micotoxine din produsele alimentare (Regulamentul (CE) nr. 401/2006, nr. 178/2010)



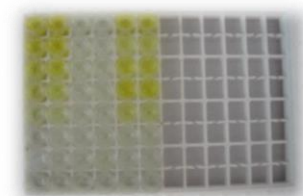
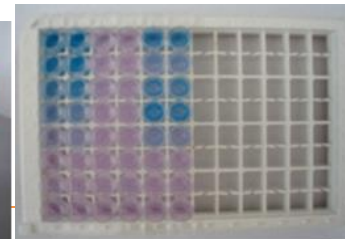


II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

ELISA – metoda imunoenzimatica de determinare a micotoxinelor

Principiul metodei ELISA se bazează pe reacția antigen - anticorp.

- Godeurile de microtitrare sunt acoperite cu anticorpi captura directionati impotriva anticorpilor anti-micotoxina.
- In fiecare godeu se adauga conjugatul enzimatic si anticorpul anti-micotoxina.
- Micotoxina libera si conjugatul enzimatic concureaza pentru situsurile de legare ale anticorpilor de acoperire ale godeurilor (metoda imunoenzimatica competitiva).
- Conjugatul enzimatic nelegat este indepartat in faza de spalare.
- Se adauga substratul/cromogen, observandu-se virarea culorii de la rosu la albastru.
- Adaugarea solutiei de stopare a reactiei determina modificarea culorii albastre in galben.
- Citirea probelor se realizează la 450 nm.
- Absorbanța este invers proporțională cu concentrația micotoxinei din proba.





II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

ELISA – metoda imunoenzimatica de determinare a micotoxinelor

Avantaje

Sensibilitate ridicata

Analiza simultana a unui nr mare de probe

Etapă de preparare a probei eeste simpla

Nu necesita specialisti

Folosita pentru etapa de screening

Dezavantaje

Usurinta in contaminarea probelor

Rezultate fals pozitive/negative

Sunt necesare analize de confirmare
(HPLC)



II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Cromatografie Lichida de inalta performanta - HPLC

- ✓ Este o metoda de referinta si poate realiza cuantificarea compusului de analizat aflat in cantitati foarte mici (ng)
- ✓ Ansamblul cromatografic HPLC este un sistem compus dintr-un modul de separare si unul de detectie
- ✓ HPLC separa un amestec de compusi prezenti într-un extract dintr-o probă prin afinitatea relativa a acestora pentru o coloana stationara si un solvent mobil
- ✓ Compușii eluati din coloană trec printr-un detector (fluorescenta sau ultraviolete), iar detectorul determina cantitatea compusilor specifici prezenti in proba analizata

Avantaje

Sensibilitate ridicata
Selectivitate ridicata
Repetabilitate ridicata
Analiza rapida

Dezavantaje

Costisitor
Necesita specialisti



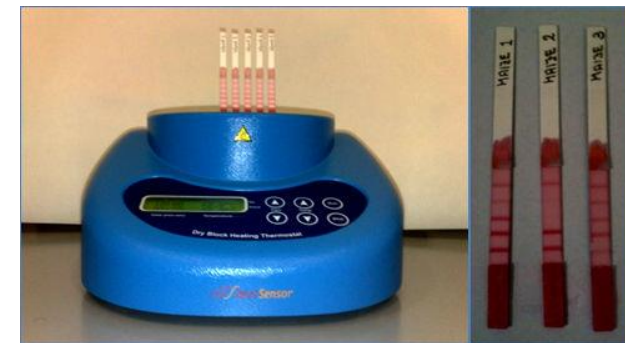
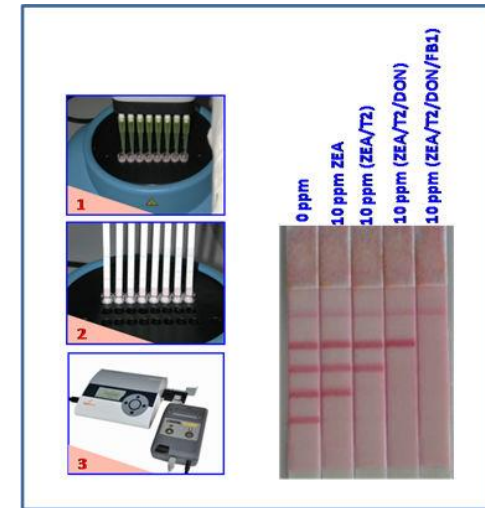
II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Alte metode conventionale:

- ✓ Cromatografie in strat subtire (TLC)
- ✓ Cromatografie de gaze (GC)
- ✓ Immunocromatografie cu flux lateral
- ✓ Cromatografie de gaze cuplata cu spectrofotometru de masa (GC - MS)

Metode rapide de screening:

- ✓ Teste de imunoabsorbtie enzimatica (ELISAs) – test de culoare
- ✓ Teste Dipstick -





II. Metode moderne de analiza si control al continutului de fungi si micotoxine din produsele alimentare

Modalitati de prevenire a contaminarii cu micotoxine

- ✓ Cultivarea cerealelor si a celorlalte plante tolerante la infestatia fungica
- ✓ Inhibarea cresterii si dezvoltarii mucegaiurilor- Metodele de recoltare, stocare si procesare pot fi instrumentele de prevenire a cresterii si dezvoltarii mucegaiurilor.
- ✓ Controlul infestatiei cu micotoxine înainte de recoltarea cerealelor implica practici agronomice ce reduc acumularea micotoxinelor pe camp. Acestea includ: irigatii corespunzatoare, utilizarea hibrizilor rezistenti sau adaptati, cultivarea corespunzatoare si fertilizarea.
- ✓ Prevenirii formarii acestora



Proiecte de cercetare

- ✓ Plan sectorial ADER 2020 - ADER 8.1.1./2011 **Evaluarea riscului privind contaminarea cu micotoxine a produțiilor anuale de grâu din România**
- ✓ Parteneriate in domenii prioritare - Contract nr. 5.1.1/2008 **Sistem integrat pentru reducerea contaminarii cu fungi si micotoxine in industria panificatiei, in scopul cresterii sigurantei alimentare**