

MIJLOACE DE INVESTIGARE PRIVIND PREZENȚA REZIDUURILOR DE PESTICIDE ȘI OCHRATOXINA A PE STRUGURI ȘI ÎN VIN

REZUMAT

Lucrarea de doctorat este prezentată pe parcursul a 134 de pagini și este structurată pe cinci capitole, astfel:

Capitolul 1: Generalități privind proprietățile, sursele de apariție, metodele de investigare și limitele maxime admise pentru pesticide și OTA

Capitolul 2: Stadiul actual al cercetărilor privind prezența pesticidelor și ochratoxinei A în struguri și vin

Capitolul 3: Scopul cercetării, obiectivele urmărite, materialele și metodele folosite

Capitolul 4: Rezultate obținute

Capitolul 5: Concluzii generale

Bibliografie: în care sunt citate 142 de lucrări științifice apărute în ultimul deceniu referitor la tema luată în studiu.

Scopul cercetării

Consumatorii pun mare accent pe calitatea alimentelor și deci prezența contaminanților (micotoxine sau pesticide) trebuie tratată cu deosebită atenție. Guvernul României a introdus limite maxime admise stabilite în conformitate cu legislația din UE pentru aceste reziduuri și vrea să se asigure că industria vinului poate dezvolta strategii de management care să minimizeze prezența acestor contaminanți în vinul românesc. Având la bază principiul « prevenirea este mai

bună decât tratarea », protejarea consumatorului împotriva efectelor toxice ale acestor contaminanți, impune încurajarea acțiunilor preventive, cum ar fi o bună practică agricolă, stocarea în condiții corespunzătoare, respectarea termenelor impuse de tratamente, etc.

Prezentul studiu are drept scop evidențierea mijloacelor de investigare privind prezența reziduurilor de pesticide și ochratoxina A pe struguri și în vin, adaptarea acestora la condițiile concrete din laborator, astfel încât să se obțină o bună recuperare a reziduurilor, o bună repetabilitate și reproductibilitate a rezultatelor obținute.

Obiectivele urmărite

Datorită faptului că ochratoxina A și pesticidele au fost detectate în cereale, lapte, cafea, cacao, sânge uman, iar în ultimii ani și în vin, precum și a efectului nefrototoxic, hepatotoxic, teratogen, imunotoxic, posibil cancerigen, ne-am propus următoarele obiective :

- 1) identificarea de mucegaiuri ochratoxigene pe struguri ;
- 2) validarea metodelor utilizate pentru cuantificarea ochratoxinei A ;
- 3) investigarea și cuantificarea ochratoxinei A în vinurile albe și roșii ;
- 4) validarea rezultatelor obținute la determinarea reziduurilor de pesticide ;
- 5) determinarea gradului de contaminare cu pesticide al strugurilor din Oltenia.

Rezultate

În anul 2005, din apa de spălare a strugurilor luați în studiu au fost izolate mai multe tulpini de mucegaiuri care aparțin speciilor: *Penicillium verucosum*; *Aspergillus niger* și *Aspergillus ochraceus* - specii cu potențial ochratoxigen.

Pentru cuantificarea reziduurilor de OTA din vin am folosit inițial metoda ELISA și pentru verificarea rezultatelor, tehnica HPLC. Pentru determinări ELISA

am folosit kituri R-biopharm RIDASCREEN® și un cititor STAT FAX 2100. Pentru determinări HPLC am folosit un lichid cromatograf de lichide de înaltă performanță, Perkin Elmer Series 200 cu detector de fluorescență.

Au fost analizate un număr de 105 probe de vin din care 44 probe vin îmbuteliat din Oltenia, 48 probe de vin fortificate cu etalon de OTA și 8 probe vin din import. În fiecare an am analizat și probe de struguri mucegăiți din care s-au analizat microbiologic mucegaiurile după care probele au fost omogenizate, extras suc și analizat pentru detectarea OTA. Probele au fost extrase în soluție tampon PBS și purificate pe coloane de imunoafinitate, iar după spălare cu soluție tampon PBS, OTA a fost eluată cu metanol. Extractul metanolic a fost evaporat la sec pe baie de apă și reziduul s-a reluat cu soluție de bicarbonat de sodiu pentru tehnica ELISA iar pentru HPLC s-a folosit extractul de metanol. Rezultatele obținute au fost prelucrate automat cu softurile celor două aparate. Au fost trasate curbe de calibrare la fiecare set de probe, s-au făcut studii de recuperare, repetabilitate și reproductibilitate a rezultatelor obținute. S-au calculat limitele de detecție și de cuantificare ale metodelor. Recuperarea s-a încadrat între 82 și 95%, coeficientul de variație la repetabilitate fiind de 7,2% și la reproductibilitate de 7,65%.

Pentru probele analizate pe parcursul celor trei ani nu s-au determinat valori peste limita admisă pentru OTA în vin, exista câteva probe cu valori detectabile (11,36%) în anul 2005, care pot fi explicate pe baza condițiilor meteorologice nefavorabile sectorului viticol din acel an. Valoarea detectabilă cea mai mare a fost de 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, care este mult sub valoarea maximă admisă (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Restul probelor analizate (88,64%) au concentrația de OTA nedetectabilă. Rezultatele obținute pot fi explicate printr-o bună practică a vinificației și a condițiilor climatice favorabile zonelor viticole studiate.

Pentru analiza reziduurilor de pesticide am folosit metoda gaz cromatografică, etaloane de pesticide Riedel de Haën și două cromatografe de gaze: Konik HRGC 4000B și Varian CP 3800 cu autosampler.

Au fost analizate un număr de 80 probe de struguri din care 31 probe struguri din Oltenia, 49 probe de struguri fortificate cu β HCH, γ HCH și DDE, substanțe standard Riedel de Haën. Probele au fost extrase cu acetonitril, apoi reextrase din acetonitril cu eter de petrol și purificate pe coloane de florisil. După reținerea pesticidelor pe coloană, au fost eluate cu amestec eter de petrol, eter etilic. Extractul eteric a fost concentrat prin evaporare și injectat în gaz cromatograf.

Pentru validarea metodei s-au folosit probe de struguri care au fost analizate și la care nu s-au detectat reziduuri de pesticide. Probele s-au fortificat cu soluții etalon la nivel de 0,05; 0,1 și 0,15 mg/kg. Procentul de recuperare a fost cuprins între 78 și 89% , coeficientul de variație (Cv %) între 2,7 - 8,5% și limita de cuantificare (LOQ) între 0,01 și 0,02 mg/kg. Incertitudinea de măsurare variază funcție de fiecare component și este mai mică de 15%.

Pentru verificarea rezultatelor obținute am utilizat o metodă multireziduală olandeză și un gaz cromatograf Varian, de generație nouă. Metodele folosite la investigarea reziduurilor de pesticide din struguri oferă rezultate repetabile și reproductibile.

Faptul că nu au fost detectate reziduuri de pesticide în probele analizate, denotă o bună practică a tratamentelor fitosanitare, respectarea termenelor de așteptare și folosirea pesticidelor sub stricta supraveghere a specialiștilor.

Deși mobilitatea pesticidelor de a trece de pe struguri în vin este în general redusă datorită procesului de vinificație, în special fermentația alcoolică reduce masiv nivelul de pesticide, există riscul ca o mică parte din acestea să treacă în vin și pot fi sursă de toxicitate pentru consumatori. Folosirea rațională a pesticidelor minimizează riscul contaminării cu ochratoxina A.

Din punct de vedere oenologic, cel mai important rezultat al acestui studiu este acela că vinurile românești din Oltenia sunt în conformitate cu reglementările UE din punct de vedere al reziduurilor de pesticide și ochratoxina A .

În urma cercetărilor efectuate am ajuns la următoarele **concluzii**:

► Legislația UE implementată și în țara noastră, care stabilește nivelele maxime de toxine pe struguri și în vin, a avut ca scop găsirea unei soluții pentru minimizarea expunerii consumatorilor la aceste toxine.

► Cea mai mare cantitate de OTA se reduce în timpul procesului de presare a strugurilor și continuă în timpul procesului de separare a fazelor solid - lichid. Tratatamentul cu enzime pectolitice pentru mustul alb, bentonită pentru finisarea de sucuri albe, fermentarea mustului roșu și recuperarea de suc prin centrifugare continuă contribuie și ele la acest proces de reducere.

► Îndepărtarea OTA în timpul vinificării se face în primul rând prin adsorbția pe solide și proteine și mai puțin prin degradare. În particular legarea OTA de celulele de drojdii în timpul fermentării pare să joace un rol important în reducerea OTA, lucru care nu este posibil la producerea sucului de struguri, aceasta reiese și din faptul că cel mai adesea sucul este mai contaminat decât vinul. Această capacitate adsorbțivă a drojdiilor trebuie să fie exploatată pentru legarea OTA din sucurile sintetice și comerciale.

► În timpul finisării post-fermentare, proprietățile adsorbitive ale drojdiilor fac posibilă adsorbția OTA din vinurile roșii. A fost luată în calcul tendința cărbunelui de a îndepărta pigmenții din vin, o nouă tehnică ce exploatează proprietățile de legare a OTA de cărbunele activ.

► De la prima raportare de OTA în vin (Majerus, 1996 și Zimmerlli, 1996) au fost făcute multe progrese în termeni de identificare a surselor de contaminare, condițiilor asociate cu dezvoltarea putregaiului *Aspergillus* și producerea toxinei și

de legare a OTA de solide în timpul vinificării. Strategiile aplicate pentru vii și vin sunt legate de reducerea incidenței speciilor toxigene de *Aspergillus*, stabilirea regiunilor în care există risc crescut de contaminare a strugurilor cu OTA și controlul putregaiurilor prin utilizarea de fungicide.

▶ În prezent există multiple metode pentru determinarea OTA din vin înainte de punerea lui pe piață. Două dintre acestea au fost dezvoltate și în acest studiu: tehnica imunoenzimatică și tehnica HPLC.

▶ O privire generală asupra producției de vinuri din lume demonstrează că în ultimii ani OTA este rareori prezentă în concentrații peste 2 μg/kg, limită introdusă de UE în 2005 care poate restricționa comerțul internațional cu vin.

▶ În prezent, sunt cunoscute peste 300 de produse comerciale, care au la bază 50 de produse active, folosite în combaterea agenților fitopatogeni la vița de vie. Gama fungicidelor utilizate în viticultură este foarte vastă. Diversitatea și eficacitatea fungicidelor existente, asigură o bună prevenire și combatere a principalelor maladii care afectează vița de vie.

▶ Insecticidele folosite la tratamente în plantațiile viticole sunt de contact, de ingestie și sistemice, care aparțin următoarelor grupe chimice: organofosforice, carbamați, piretroizi de sinteză, biologice, inhibitori ai metamorfozei artropodelor, amestecuri.

▶ Importanța aplicării profilactice de pesticide minimizează pagubele produse strugurilor, dar apare riscul ca în cazul nerespectării modului de aplicare să rămână reziduuri de pesticide pe struguri.

▶ Reziduurile de pesticide ajunse în vin produc importante consecințe negative cum ar fi scăderea calității vinului, încetinirea fermentației și probleme în fermentația malolactică. Creșterea interesului pentru studiul pesticidelor în struguri este justificată din punct de vedere oenologic prin aceea că pesticidele pot interfera cu microflora fermentativă folosită la producerea vinului. Deși mobilitatea pesticidelor de a trece de pe struguri în vin este în general redusă

datorită procesului de vinificație, în special fermentația alcoolică reduce masiv nivelul de pesticide, există riscul ca o mică parte din acestea să treacă în vin și pot fi sursă de toxicitate pentru consumatori.

► Din prezentul studiu putem trage concluzia că zonele viticole din Oltenia nu prezintă risc crescut de contaminare cu ochratoxina A. Așezarea geografică, condițiile climatice din acesta zonă, tratamentele fitosanitare aplicate corect și respectarea termenelor de așteptare fac din strugurii și vinul oltenesc două produse sigure pentru sănătatea consumatorilor. Se impune totuși o supraveghere continuă pentru minimizarea riscului de contaminare a strugurilor și vinului cu reziduuri de ochratoxina A sau de pesticide, prin analize periodice ale solului, strugurilor și vinului.