

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΞΗΡΟΥΣ  
ΚΑΡΠΟΥΣ ΚΑΙ ΜΠΑΧΑΡΙΚΑ»**



**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΣΑΡΔΙΝΗ ΜΑΡΙΝΑ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2012**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΞΗΡΟΥΣ  
ΚΑΡΠΟΥΣ ΚΑΙ ΜΠΑΧΑΡΙΚΑ»**



**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ: ΣΑΡΔΙΝΗ ΜΑΡΙΝΑ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2012**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Οι μυκοτοξίνες γενικά	8
A.1.1 Λίγα λόγια για τις μυκοτοξίνες	8
A.1.2 Επιπτώσεις στα ζώα και στους ανθρώπους	11
A.1.3 Οικονομικές Επιπτώσεις	14
A.2 Αφλατοξίνες	15
A.2.1 Ιστορική Αναδρομή	15
A.2.2 Παθογόνα αίτια	16
A.2.3 Επιπτώσεις των αφλατοξινών στα ζώα και στους ανθρώπους. Το φαινόμενο της αφλατοξίκωσης	16
A.2.4 Παρουσία των αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα	18
A. 2.5 Χημικές - Φυσικές Ιδιότητες Αφλατοξινών	19
A. 2.5.1 Χημικές ιδιότητες	19
A. 2.5.2 Φυσικές ιδιότητες	21
A. 2.5.3 Χημικές αντιδράσεις	23
A. 2.6 Νομοθεσία Αφλατοξινών	24
A. 2.6.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	24
A. 2.6.2 Παγκόσμια Νομοθεσία	27
A. 3 Οι Ασπέργιλοι	29
A. 3.1 Γενικά στοιχεία	29
A. 3.2 Βιομηχανική χρήση ασπεργίλλων	29

A. 3.3 Η ομάδα <i>A. Flavus</i> – Τα είδη <i>A.flavus</i> και <i>A. Parasiticus</i>	30
A. 3.4 Σημασία της ομάδας του <i>A.flavus</i>	31
A. 3.5 Οικολογία του <i>A.flavus</i>	31
A. 3.6 Ο <i>A.flavus</i> ως φυτοπαθογόνο	32
A. 4 Παραγωγή της αφλατοξίνης	33
A. 4.1 Βιοσύνθεση της αφλατοξίνης	33
A. 4.1.1 Μονοπάτια και Ένζυμα στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης	33
A. 4. 2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης	34
A .4. 2.1 Παράγοντες θρέψης	34
A. 4.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες	35
A.4.2.3 Παράγοντες ανάπτυξης	37
A.4.2.4 Παράγοντες stress και αντιοξειδωτικά	37
<b>B. ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ- ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
B.1 Ξηροί καρποί-ορισμός- κατάταξη	38
B. 1.1 Ξηροί καρποί –Μαγειρικές και άλλες χρήσεις	39
B. 2 Τα κελυφωτά φιστίκια	40
B. 3 Τα αμύγδαλα	41
B. 4 Τα φουντούκια	42
B.5 Τα αράπικα φιστίκια	42
<b>Γ. ΜΠΑΧΑΡΙΚΑ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	
Γ.1 Ορισμός – Προέλευση - Ιστορικά στοιχεία	44
Γ.1.1 Η Παγκόσμια Παραγωγή Μπαχαρικών	45

Γ.1.2 Ο λειτουργικός ρόλος των μπαχαρικών	46
Γ.2 Το Πιπέρι	47
Γ.3 Η Κανέλα	48
Γ.4 Το Μοσχοκάρυδο	49
Γ.5 Το Γαρύφαλλο	49
<b>Δ. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ</b>	
Δ.1 Προσδιορισμός των αφλατοξινών	50
Δ.1.1 Δειγματοληψία	52
Δ.1.2 Προετοιμασία δείγματος	52
Δ.1.3 Εκχύλιση	52
Δ.1.4 Καθαρισμός	54
Δ.2 Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών	56
Δ.2.1. Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας TLC	56
Δ.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Επίδοσης - HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	56
Δ.3.1 Οργανολογία HPLC	
Δ.4 Παραγωγοποίηση	59
Δ.5. Ανιχνευτές	60
Δ.6 Φασματογράφος Μάζας	62
<b>Ε. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	
Ε.1. Πλεονεκτήματα της Υγρής Χρωματογραφίας - Φασματομετρίας Μάζας	64
<b>Βιβλιογραφία</b>	68

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

*Θέλω να ευχαριστήσω πρώτα από όλους τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την υπομονή τους και την επιμονή που έδειξαν τόσα χρόνια για να τα καταφέρω και χάρη σε αυτούς τα κατάφερα.*

*Τέλος, πολλά ευχαριστώ οφείλω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Ιωάννη Σαρηγιάννη, διότι εκτός από την επιστημονική του καθοδήγηση, υποστήριξε κάθε προσπάθεια, ενθάρρυνε οποιαδήποτε πρωτοβουλία με εμπιστοσύνη και σεβασμό στο πρόσωπό μου.*

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα βιβλιογραφική εργασία ασχολείται με τις τεχνικές ανίχνευσης των αφλατοξινών σε ξηρούς καρπούς και μπαχαρικά. Σκοπός της εργασίας είναι η επισκόπηση των τεχνικών ανίχνευσης των μυκοτοξινών, ιδιαίτερα των αφλατοξινών οι οποίες και αποτελούν μερικές από τις επικίνδυνες για τον άνθρωπο μυκοτοξίνες. Στην παρούσα εργασία επίσης αναφέρονται συνοπτικά μερικές πληροφορίες για το είδος των ξηρών καρπών και τα μπαχαρικά.

Τέλος, στα τελευταία κεφάλαια αναφέρονται οι διάφορες τεχνικές με τις οποίες ανιχνεύονται οι αφλατοξίνες στα προϊόντα, οι διεργασίες που απαιτούνται (δειγματοληψία, καθαρισμός), καθώς και τα όρια ανίχνευσης των τεχνικών αυτών.



## **A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **A.1 Οι μυκοτοξίνες γενικά**

#### **A.1.1 Λίγα λόγια για τις μυκοτοξίνες**

Τα τρόφιμα αποτελούν οικοσύστημα ανάπτυξης πολλών μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, κλπ), παθογόνων για τον άνθρωπο. Οι μύκητες παράγουν υπό ορισμένες συνθήκες δευτερογενείς μεταβολίτες οι οποίοι ονομάζονται μυκοτοξίνες. Οι μυκοτοξίνες είναι οργανικές ενώσεις, φυσικά προϊόντα, χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες συνήθως παράγονται όταν σταματήσει η πρωτογενής ανάπτυξη των μυκήτων, συνήθως δε σχηματίζονται στα τελευταία στάδια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης τους [1-6].

Οι μυκοτοξίνες προσβάλλουν τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα όπως δημητριακά (σιτάρι, κριθάρι, σίκαλη, καλαμπόκι, βρώμη), ξηρούς καρπούς (φιστίκια, αμύγδαλα, φουντούκια), όσπρια (φασόλια), σόργο, σύκα, μπαχαρικά. Η κατανάλωση μολυσμένης ζωοτροφής οδηγεί στην επιμόλυνση των προϊόντων ζωϊκής προελεύσης όπως το κρέας, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα προκαλώντας μεγάλες οικονομικές απώλειες και δυσμενείς επιπτώσεις στα ζώα και στους ανθρώπους. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 400 μυκοτοξίνες στην φύση, αλλά μόνο μερικές από αυτές παρουσιάζουν ιδιαίτερη τοξική δράση στον άνθρωπο και τα ζώα. Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες παράγονται από τα είδη *Penicilium*, *Aspergillus*, *Fusarium* [1-6]. Αυτά τα είδη μυκήτων είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση και προσβάλλουν σχεδόν όλα τα αγροτικά προϊόντα.

Οι μυκοτοξίνες μπορούν να αναπτυχθούν σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας είτε στον αγρό είτε στη μετασυσλεκτική διαχείριση αυτών. Επιπλέον, η προσβολή του ξενιστή (π.χ ξηροί καρποί, σιτηρά) από έντομα, η χαμηλή γονιμότητα εδάφους ή υψηλή πυκνότητα εσοδείας και η παρουσία άλλων ειδών μυκήτων μπορεί να οδηγήσει σε μη αποδεκτά επίπεδα μυκοτοξινών. Οι κλιματολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και κυρίως κατά την ανθοφορία



επηρεάζουν σημαντικά την παραγωγή μυκοτοξινών. Αν και όλοι οι παράγοντες που συντελούν στη δημιουργία μυκοτοξινών δεν είναι εντελώς γνωστοί εντούτοις ορθές πρακτικές κατά την καλλιέργεια, συγκομιδή και την αποθήκευση μειώνουν τους συντελεστές επικινδυνότητας και συμβάλλουν στην ελάττωση των επιπέδων μυκοτοξινών [1-3].

**Πίνακας 1.1** Οι σημαντικότερες μυκοτοξίνες

Μύκητες	Είδη μυκήτων	Μυκοτοξίνες	Αν και
<i>Aspergillus</i>	<i>A.flavus</i> <i>A.parasiticus</i> <i>A.nomius</i>	Αφλατοξίνες	η
	<i>A.ochraceus</i>	Ωχροτοξίνες	πρόλη
	<i>A.flavus</i> <i>A.versicolor</i>	Κυκλοπινιζιακό οξύ	ψη της
<i>Fusarium</i>	<i>F.moliniforme</i> <i>F.proliferatum</i>	Φουμονισίνες	επιμόλ
	<i>F.culmorum</i> <i>F.sporotrichiodes</i>	Τριχοθισίνες	υνσης
	<i>F.graminearum</i> <i>F.culmorum</i> <i>F.sporotrichiodes</i>	Ζεαραλενόνη	στους
<i>Penicillium</i>	<i>P.expansum</i>	Πατουλίνη	αγρούς
	<i>P.verricosum</i> <i>P.virridicatum</i>	Ωχροτοξίνη	από
	<i>P.citrinum</i> <i>P.verricosum</i>	Κιτρίνη	μυκοτο

ξίνες  
αποτελ  
εί  
προτερ  
αιότητα των  
βιομηχ

ανιών τροφίμων, η μόλυνση των τροφίμων με μυκοτοξίνες είναι αναπόφευκτη κάτω από ορισμένες

περιβαλλοντικές συνθήκες. Η παραγωγή μυκοτοξίνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, πχ την ενεργότητα του νερού ( $a_w$ ) του αποθηκευμένου προϊόντος, τη θερμοκρασία, την σύνθεση του αέρα, την παρουσία χημικών συντηρητικών και τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις [3]. Μία ολιστική προσέγγιση για τον έλεγχο των παραγόντων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλέστερα τελικά προϊόντα για τον καταναλωτή [8,9].

Αναλυτικότερα, οι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών από τους μύκητες είναι:

- Θερμοκρασία (7,5-40°C)
- Υγρασία (σχετική υγρασία >80%)
- Φως (αυξημένη παραγωγή απουσία φωτός)
- pH (ιδανικό 4-4,6)
- Υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης) [9].

Οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες, οι φουμονισίνες και οι τριχοθισίνες [1-4].

### A.1.2 Επιπτώσεις στα ζώα και στους ανθρώπους

Οι μυκοτοξίνες ανιχνεύονται συχνά σε τρόφιμα και ζωοτροφές σε όλο το κόσμο [10]. Η παρουσία των «αόρατων» μυκοτοξινών είναι ανεπιθύμητη στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές διότι μπορεί να προκαλέσουν πολύ σοβαρά προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων και ζώων [10]. Οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ο σημαντικότερος μη-μολυσματικός, χρόνιος παράγοντας διατροφικού κινδύνου, υψηλότερος από τα συνθετικά χημικά, τις φυτικές τοξίνες, τα πρόσθετα και τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων [10,11]. Το τοξικό σύνδρομο που προκύπτει από την πρόσληψη μυκοτοξινών καλείται **μυκοτοξίκωση** [1-8]. Οι μυκοτοξικώσεις χαρακτηρίζονται από τις τοξικές επιδράσεις τους σε όργανα όπως, το ήπαρ, τα νεφρά, τους πνεύμονες και συστήματα όπως το νευρικό, ενδοκρινικό και το ανοσολογικό [1-6].

Στην περίπτωση των ζώων, η έκθεση σε μυκοτοξίνες γίνεται μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων ζωοτροφών με μυκοτοξίνες, ενώ στην περίπτωση των ανθρώπων, η έκθεση μπορεί να είναι είτε άμεση, λόγω της κατανάλωσης μολυσμένου γεωργικού προϊόντος είτε έμμεση, λόγω της κατανάλωσης μολυσμένων ζωικών προϊόντων (κρέας, γάλα) [5].

Ο εργοτισμός ή αρρώστια του ιερού πυρός είναι η αρχαιότερη μυκοτοξίκωση που έχει αναφερθεί στα ιστορικά κείμενα. Η ασθένεια αυτή ήταν γνωστή και ως «φωτιά του Αγίου Αντωνίου» λόγω της αίσθησης καψίματος που αντιμετώπιζαν τα θύματα, πολλοί από τους οποίους επισκέπτονταν το ιερό του Αγίου Αντωνίου στη Γαλλία με την ελπίδα ότι θα θεραπευτούν. Αργότερα, οι επιστήμονες απέδωσαν τον εργοτισμό σε ψωμί από σίκαλη της οποίας οι σπόροι είχαν μολυνθεί με αλκαλοειδή Ergot (από τον μύκητα *Claviceps purpurea*) [2-5].

Τυπικότερο όμως παράδειγμα μυκοτοξικώσεως είναι η τροφική τοξική αλευκία (Alimentary Toxic Aleukia) που είχε την αρχή της σε κατανάλωση από τον άνθρωπο και τα παράγωγα ζώα μουχλιασμένων σπόρων δημητριακών. Εμφανίστηκε κατά καιρούς με επιδημική μορφή και

συγκεκριμένα για πρώτη φορά στην Ρωσία το 1932 και προξένησε θανάτους-περίπου το 62% των θυμάτων- και στη συνέχεια μεταξύ 1942 και 1947 [4,5,8]. Η ασθένεια αυτή προκαλούσε πυρετό, αιμορραγία από το δέρμα, τη μύτη, το λαιμό και τα ούλα καθώς και καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος [5]. Τελικά διαπίστωθηκε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν φάει ψωμί από σπόρους σιταριού και κριθαριού που έμειναν σε αθέριστα στάχυα όλο το χειμώνα κάτω από το χιόνι. Στους σπόρους είχε αναπτυχθεί ο μύκητας *Fusarium Sporotrichioides* και είχε επιμολύνει με τη μυκοτοξίνη που ονομάστηκε τριχοθισίνη και συγκεκριμένα με την T-2 τοξίνη [2-5].

Στον επόμενο πίνακα καταγράφονται οι τοξικές επιδράσεις των μυκοτοξινών καθώς και τα προϊόντα τα οποία προσβάλλουν.

**Πίνακας 1.2.** Οι σημαντικότερες επιδράσεις των μυκοτοξινών στον άνθρωπο και τα ζώα

Μυκοτοξίνες	Πιθανές επιδράσεις στα ζώα και στους ανθρώπους	Τρόφιμα τα οποία προσβάλλουν
Αφλατοξίνες	Τοξικότητα, καρκίνο του ήπατος, καρκινογένεσεις, εγκεφαλοπάθειες, νεκρώσεις οργάνων, τοξαιμία	Σιτηρά, καλαμπόκι, δημητριακά, γαλακτοκομικά, ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά
Ωχρατοξίνες	Νεφροτοξικότητα, Ηπατοτοξικότητα, καρκινογόνος δράση, ανοσοκαταστολή	Κρασί, σταφίδες, κάφες, δημητριακά (σιτάρι, καλαμπόκι, βρώμη)
Φουμονισίνες	Εκφυλισμός νευρικών κυττάρων, τερατογενέσεις, πνευμονικό οίδημα, ανοσοκαταστολή	Καλαμπόκι, σόργος, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι
Τριχοθισίνες	Ανοσοκαταστολή στον άνθρωπο και τα ζώα, διαταραχές πεπτικού συστήματος, οιστρογονική δράση, πρόκληση νευρικών διαταραχών	Καλαμπόκι, σόργος, ρύζι, σιτάρι, κριθάρι

Αν και η μελέτη όλων των τοξικών ουσιών στα τρόφιμα έχει αυξηθεί λόγω νομοθετικών απαιτήσεων, στις αφλατοξίνες δίδεται ιδιαίτερη προσοχή λόγω ό,τι θεωρούνται ιδιαίτερος τοξικός για τον άνθρωπο και τα ζώα διότι συνδέονται με το καρκίνο του ήπατος και διάφορα τοξικά σύνδρομα στα ζώα [8]. Η ομάδα των αφλατοξινών περιλαμβάνει διάφορες ενώσεις η παρουσία των οποίων στα τρόφιμα και η τοξικότητα τους ποικίλουν. Πολλές μελέτες δείχνουν πως οι αφλατοξίνες παρουσιάζουν μεταλλαξιόγono, καρκινογόno και τερατογόno δράση σε ένα μεγάλο πλήθος οργανισμών [8]. Τοξικολογικές μελέτες σε πτηνά, ποντίκια και σε άλλα σπονδυλωτά αποδεικνύουν την ευαισθησία τους στις αφλατοξίνες [10]. Οι ενώσεις που απομονώνονται συχνότερα είναι οι B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> [3,5]. Απο τις παραπάνω, η αφλατοξίνη B<sub>1</sub> είναι η περισσότερο τοξική. Η Διεθνής Υπηρεσία για την Έρευνα του Καρκίνου (IARC) έχει κατατάξει την Αφλατοξίνη B<sub>1</sub> στο κατάλογο

των πιθανών καρκινογόνων ουσιών για τον άνθρωπο [2-5]. Η ασθένεια γνωστή ως –Ινδική παιδική κίρρωση-(cirrhosis of Indian childhood) οφείλεται εν μέρει σε μόλυνση από αφλατοξίνες. Επιπλέον, το σύνδρομο Reye (Reye's syndrome) με συμπτώματα εγκεφαλοπάθειας και εκφυλισμού των λιπών στα σπλάχνα των παιδιών έχει συσχετιστεί με την τοξικότητα των αφλατοξινών [5]. Αν και δεν έχει διερευνηθεί πλήρως η ευαισθησία των ανθρώπων στις αφλατοξίνες, διάφορες επιδημιολογικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στην Αφρική και στην Ασία περιοχές όπου πολλά περιστατικά με καρκίνο του ήπατος έχουν καταγραφεί φανερώνουν συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του καρκίνου και της υπαρξής αφλατοξίνης στην διατροφή του ανθρώπου [1,8].

### **A.1.3 Οικονομικές Επιπτώσεις**

Η μόλυνση των γεωργικών προϊόντων με μυκοτοξίνες είναι ένα διαρκές πρόβλημα σε πολλές παραγωγικές χώρες του κόσμου με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Η μόλυνση από μυκοτοξίνες προκαλεί απώλειες σε όλα τα επίπεδα παραγωγής τροφίμων και ζωοτροφών. Έχει υπολογιστεί ότι το 25% των καλλιεργειών παγκοσμίως έχουν μολυνθεί με μυκοτοξίνες σύμφωνα με τον FAO – Παγκόσμιο Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας [1-6]. Τρόφιμα στα οποία ανιχνεύονται μυκοτοξίνες σε όρια πάνω από αυτά που έχει θεσπίσει η νομοθεσία κατάσχονται και καταστρέφονται. Αυτό οδηγεί σε οικονομική ζημιά πολλών δισεκατομμυρίων δολλαρίων σε παγκόσμιο επίπεδο. Σχεδόν το 40% της συνολικής συγκομιδής στην Αμερική το 1990 αποσύρθηκε από την αγορά λόγω μόλυνσης από μυκοτοξίνες. Αν και η πρόληψη από μυκοτοξίνες, στα γεωργικά προϊόντα, στα γαλακτοκομικά και τα προϊόντα κρέατος είναι ο κύριος στόχος των τροφίμων και των γεωργικών βιομηχανιών σε ολόκληρο τον κόσμο η μόλυνση με μυκοτοξίνες είναι αναπόφευκτη.



Η επιμόλυνση γεωργικών προϊόντων και τροφίμων από τις αφλατοξίνες είναι επίσης ιδιαίτερα σημαντική. Η λίστα των γεωργικών προϊόντων πρωτογενούς παραγωγής τα οποία μπορεί να μολυνθούν από αφλατοξίνες περιλαμβάνει: σιτηρά (αραβόσιτο, σόργο, ρύζι, σιτάρι, κεχρί, βρώμη, κριθάρι), ελαιούχους σπόρους (αραχίδα, σόγια, ηλιόσπορο, βαμβάκι), μπαχαρικά (πιπέρι, τζίντζερ, τσίλι, κορίανδρο κ. α ), ξηρούς καρπούς (φιστίκια, αμύγδαλα, φουντούκια) και γάλα. Η μόλυνση ιδιαίτερος των σιτηρών εκτός ότι θέτει σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών απειλεί επίσης και το διεθνές εμπόριο.

## **A.2 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ**

### **A.2.1 Ιστορική Αναδρομή**

Οι αφλατοξίνες ανακαλύφθηκαν την δεκαετία του 1960 στη Μεγάλη Βρετανία όταν πάνω από 100000 γαλοπούλες (ασθένεια X) πέθαναν λόγω αφλατοξίκωσης [2,5,8]. Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες, οι οποίες είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Aspergillus Flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται κατά την διάρκεια της αποθήκευσής του. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μια σειρά φθοριζόντων ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στην συνέχεια μετονομάστηκαν σε αφλατοξίνες [2,4,5].

Στην Ινδία, το 1974, καταγράφηκε η πιο σοβαρή έξαρση ηπατίτιδας στους ανθρώπους λόγω αφλατοξίκωσης (οξεία τοξικότητα από αφλατοξίνες). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η αφλατοξίκωση προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού από αφλατοξίνες και οι 108 από τους 397 ασθενείς πέθαναν. Πρόσφατα, στην Κένυα το 2005, το πρόβλημα της αφλατοξίνης επανεμφανίστηκε οδηγώντας τουλάχιστον 125 ανθρώπους στο θάνατο από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένο με αφλατοξίνη [12].

### A.2.2 Παθογόνα αίτια

Οι αφλατοξίνες είναι μυκοτοξίνες οι οποίες παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων όπως ο *Aspergillus flavus* και ο *Aspergillus parasiticus* ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού [1-5]. Επίσης διάφορα άλλα είδη όπως οι *A. nomius*, *A. Peudotamarii* [2], *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* έχει αποδειχθεί ότι παράγουν αφλατοξίνες [8,10,22]. Επειδή οι τέσσερις βασικές αφλατοξίνες ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) απομονώθηκαν αρχικά από καλλιέργειες του *A. flavus*, τα πρώτα γράμματα του μύκητα ('A' και 'Fla') χρησιμοποιήθηκαν για την ονομασία των τοξινών [5]. Άλλες τέσσερις αφλατοξίνες οι  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $B_{2a}$  και  $G_{2a}$ , που παράγονται σε μικρότερες ποσότητες απομονώθηκαν στην πορεία από καλλιέργειες των *A. flavus* και *A. Parasiticus* [1A]. Ο *A. flavus* παράγει τις  $B_1$  και  $B_2$ , καθώς και κάποιες συγγενείς ενώσεις όπως η  $M_1$ , ενώ ο *A. parasiticus* παράγει τις  $G_1$  και  $G_2$  καθώς και τις  $B_1$  και  $B_2$  [2, 5, 1A].

### A.2.3 Επιπτώσεις των αφλατοξινών στα ζώα και στους ανθρώπους. Το φαινόμενο της αφλατοξίκωσης.

Η αφλατοξίκωση είναι το αποτέλεσμα μόλυνσης από κατάποση μεσαίας ως υψηλής δόσης αφλατοξίνης μέσω της τροφής [1, 2,5,1A]. Ως σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί δύο περιπτώσεις αφλατοξίκωσης. Στην πρώτη περίπτωση γίνεται λόγος για οξείας μορφής ενδοτοξίκωση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα απ' ευθείας βλάβη του ήπατος με επακόλουθη ασθένεια ή θάνατο, ενώ στην δεύτερη περίπτωση γίνεται λόγος για χρόνια έκθεση με εκδήλωση χαρακτηριστικών συμπτωμάτων. Ανάλογα με τα επίπεδα και την διάρκεια της έκθεσης στις αφλατοξίνες παρατηρούνται οι εξής συνέπειες στην υγεία:

α) οι υψηλές δόσεις έχουν ως αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών οξείας μορφής και θάνατο, συνήθως λόγω κίρρωσης του ήπατος [1A]

β) η χρόνια έκθεση οδηγεί κατά κύριο λόγο στην υποβάθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, επιφέρει ανορεξία και μειώνει την αναπαραγωγικότητα [1Α]

γ) κάθε είδους έκθεση δρα αθροιστικά σχετικά με τον κίνδυνο για την εκδήλωση του καρκίνου [1Α,5]

- **Οξεία τοξικότητα**

Η οξεία τοξικότητα προκαλείται από την απορρόφηση μέτριας έως μεγάλης ποσότητας αφλατοξινών. Ως φαινόμενο παρατηρείται τόσο στα ζώα όσο και στον άνθρωπο. Το ήπαρ αποτελεί το βασικό όργανο στόχο. Έχουν παρατηρηθεί επίσης επιπτώσεις στους πνεύμονες, στο μυοκάρδιο, στα νεφρά και στον εγκέφαλο. Τυπικά συμπτώματα αφλατοξίκωσης είναι ο πολλαπλασιασμός του χοληφόρου σωλήνα, η κεντρολοβιώδης νέκρωση, η λιπώδης διήθηση του ήπατος, οι γενικότερες ηπατικές αλλοιώσεις και τα ηπατώματα [14]. Σε περιπτώσεις οξείας τοξικότητας στον άνθρωπο έχουν βρεθεί υψηλές ποσότητες αφλατοξινών ύστερα από αυτοψία στο συκώτι, στους πνεύμονες, στον εγκέφαλο και στα νεφρά.

- **Χρόνια τοξικότητα**

Η χρόνια τοξικότητα οφείλεται σε μακράς διάρκειας έκθεση σε χαμηλές έως μέτριου μεγέθους ποσότητες αφλατοξινών [5]. Τα ζώα εξαιτίας της μικρής διάρκειας ζωής τους δεν παρουσιάζουν χρόνια τοξικότητα. Η χρόνια τοξικότητα στον άνθρωπο εκδηλώνεται με το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, την ανοσοκαταστολή, την ηπατίτιδα και άλλες ήπιες, αργής εξέλιξης καταστάσεις.

#### **A.2.4 Παρουσία των αφλατοξινών στα γεωργικά προϊόντα και τρόφιμα**

Οι αφλατοξίνες προσβάλλουν τα περισσότερα γεωργικά προϊόντα, αλλά κυρίως απαντώνται στα σιτηρά, στους ξηρούς καρπούς (φιστίκια, αμύγδαλα, φουντούκια, καρύδια), στα μπαχαρικά

(πιπέρι, τσίλι, κορίανδρο, τζίντζερ, κουρκούμι κ.α), ελαιούχους σπόρους (αραχίδα, βαμβάκι) και περιστασιακά στο γάλα [1A, 2, 3, 13]

Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής τους από τους συγκεκριμένους μύκητες (*Aspergillus spp*), η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η παρουσία των μυκήτων δεν σημειοδοτεί κατ' ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης και οι συνθήκες για την παραγωγή αφλατοξίνης είναι πιο οριακές απ' αυτές για την ανάπτυξη του μύκητα και συνδέονται με παράγοντες που προκαλούν stress (ξηρασία, μειωμένη γονιμότητα, ανταγωνισμός με ζιζάνια) [2, 13]. Όλες οι παραγωγές χώρες δένδρωδών καλλιεργειών (ξηροί καρποί) και μπαχαρικών αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο μόλυνσης με αφλατοξίνες.

Οι αφλατοξίνες απαντώνται συνήθως σε χώρες όπου επικρατούν εύκρατα, υποτροπικά και τροπικά κλίματα. Τα τελευταία χρόνια όμως, έχουν εντοπιστεί αφλατοξίνες σε ξηρούς καρπούς και μπαχαρικά από όλες τις γνωστές παραγωγές χώρες του κόσμου ανεξαρτήτως εδαφοκλιματικών συνθηκών. Η σημερινή κατάσταση σχετικά με την μόλυνση των ξηρών καρπών και μπαχαρικών από αφλατοξίνες μπορεί να παρακολουθείται κάθε εβδομάδα στην ιστοσελίδα του Συστήματος Έγκαιρης Προειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές –RASSF[3A].

Σύμφωνα με το RASSF, το έτος 2009 υπάρχουν περίπου 638 κοινοποιήσεις σχετικά με την μόλυνση με αφλατοξίνες. Από αυτές τις κοινοποιήσεις, οι 136 ήταν για τα κελυφωτά φιστίκια από Ιράν (57 δείγματα), η Τουρκία με (35 δείγματα) και τις Η.Π.Α (32 δείγματα). Για τα φουντούκια υπήρχαν περίπου 63 δείγματα και όλα σχεδόν από Τουρκία, επίσης υπήρχαν και 55 κοινοποιήσεις σχετικά με τα αμύγδαλα, κυρίως από Η.Π.Α (46 δείγματα) και μερικά δείγματα από Αυστραλία.

Στην κατηγορία των μπαχαρικών, υπήρχαν περίπου 41 κοινοποιήσεις όπου αφορούσαν το τσίλι (18 δείγματα), την πάπρικα (4 δείγματα), το μοσχοκάρυδο (3 δείγματα) και το τζίντζερ (2

δείγματα). Αυτές οι κοινοποιήσεις αφορούσαν τις χώρες προέλευσης όπως Αιθιοπία, Ισπανία, το Πακιστάν και την Ινδία [12].

Το 2010 υπάρχουν 649 ειδοποιήσεις σχετικά με την μόλυνση με αφλατοξίνες. Από αυτές 260 ήταν για αράπικα φυστίκια και 168 για τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς. 75 κοινοποιήσεις υπήρχαν για επιμολυσμένα αράπικα φυστίκια από την Κίνα, 56 ειδοποιήσεις για κελυφωτά φυστίκια από το Ιράν, 32 ειδοποιήσεις για κελυφωτά φυστίκια από την Τουρκία και 23 ειδοποιήσεις για αμύγδαλα από τις ΗΠΑ. 18 ειδοποιήσεις για φουντούκια από την Τουρκία, 4 ειδοποιήσεις για αράπικα φυστίκια από την Αίγυπτο. Το πρόβλημα συνεχίζει να έχει ενδιαφέρον στους ξηρούς καρπούς και τα μπαχαρικά. Μέχρι και σήμερα δειγματοληπτικοί ελέγχοι σε ξηρούς καρπούς και μπαχαρικά αποδεικνύουν ότι το πρόβλημα εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα. Στις αναπτυσσόμενες χώρες, η παρουσία αφλατοξινών παραμένει μεγάλο οικονομικό και εμπορικό πρόβλημα, το οποίο προκύπτει από την αδυναμία διάθεσης των προσβεβλημένων προϊόντων τόσο στην τοπική αγορά όσο και στην διεθνή [7].

## **A. 2.5. Χημικές - Φυσικές Ιδιότητες Αφλατοξινών**

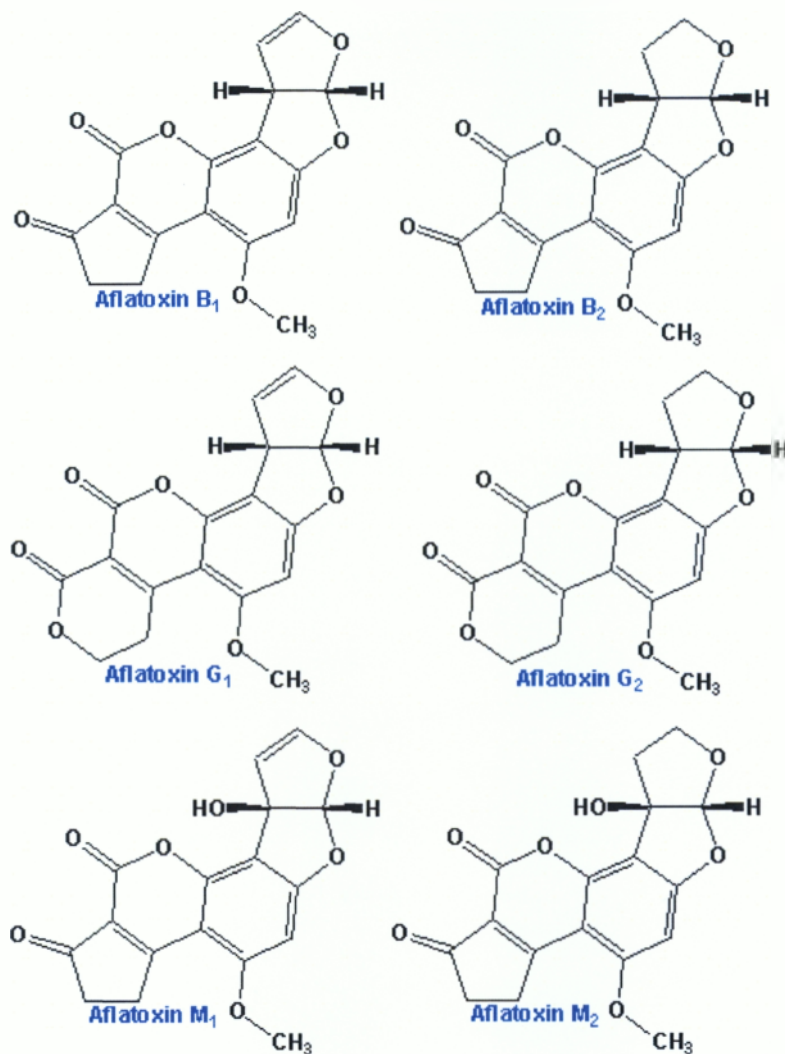
### **A. 2.5.1 Χημικές ιδιότητες**

Οι αφλατοξίνες είναι μια ομάδα οξυγονούχων ετεροκυκλικών ενώσεων, χαμηλού μοριακού βάρους, οι οποίες παράγονται ως προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων μυκήτων του *A.flavus* και του *A.parasiticus*, οι οποίοι αναπτύσσονται σε διάφορα τρόφιμα μεταξύ αυτών τα μπαχαρικά και οι ξηροί καρποί. Από χημικής άποψης είναι παράγωγα δι-φουρανο-κουμαρίνης και χαρακτηρίζονται από δι-υδροφουρανικά ή τετρα-υδροφουρανικά τμήματα συγχωνευμένα σε ένα υποκατεστημένο τμήμα κουμαρίνης [2, 5, 13, 1A]. Μέχρι στιγμής έχουν ανακαλυφθεί τουλάχιστον 16 (αλλού αναφέρεται 17) ενώσεις αφλατοξινών οι οποίες σχετίζονται δομικά [13].

Οι ενώσεις που απομονώνονται συχνότερα είναι οι B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> και οι υδροξυλιωμένοι μεταβολίτες τους M<sub>1</sub> και M<sub>2</sub> στο γάλα και στα γαλακτομικά προϊόντα (τυρί, γιαούρτι). Μεταξύ αυτών, οι G αφλατοξίνες διαφέρουν χημικά από τις B αφλατοξίνες λόγω της παρουσίας ενός 3-γαλακτονικού δακτύλιου αντί ενός κυκλοπεντενονικού δακτύλιου [1A, 5, 2, 13]. Επίσης, στις αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> υπάρχει ένας 8,9 διπλός δεσμός στον τερματικό φουρανικό δακτύλιο, ο οποίος δεν υπάρχει στις B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub>. Όμως η μικρή αυτή διαφορά στην χημική τους δομή σχετίζεται με μία πολύ σημαντική αλλαγή στην δράση τους: οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> είναι καρκινογόνες και θεωρούνται πολύ πιο τοξικές από τις B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub> οι οποίες αποτελούν τα δι-υδροπαράγωγα τους [1A,5, 3, 13].

Από χημικής άποψης, οι υψηλώς συζευγμένες και σταθερές ρίζες στη δομή των αφλατοξινών προσδίδουν τη χαρακτηριστική χημική τους ιδιότητα να φθορίζουν στο υπεριώδες (UV). Αυτές οι τοξίνες φθορίζουν είτε μπλέ (Blue) είτε πράσινο (Green) χρώμα υπο την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και αυτό το χαρακτηριστικό διακρίνει τις B από τις G αφλατοξίνες. Επιπλέον, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μικρές διαφοροποιήσεις στην δομή τους, οι οποίες διαχωρίζουν τα διάφορα είδη των αφλατοξινών έχουν δραστική επίδραση στις αναφερόμενες ιδιότητες φθορισμού: τα B<sub>2</sub> και τα G<sub>2</sub> παράγωγα φθορίζουν πολύ πιο ισχυρά απ' ό,τι τα ακόρεστα ομόλογα τους B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub>. Οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> εκπέμπουν φθορισμό στα 425 nm (μπλέ) ενώ οι αφλατοξίνες G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> εκπέμπουν φθορισμό στα 450nm (πράσινο) [1A]





Εικόνα 2.5.1 Χημικοί τύποι Αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>

#### A. 2.5.2 Φυσικές ιδιότητες.

Οι αφλατοξίνες είναι κρυσταλλικές ουσίες, ελεύθερα διαλυτές σε ελαφρά πολικούς ή μέτρια πολικούς διαλύτες όπως το χλωροφόρμιο, η μεθανόλη και το διμέθυλοσουλφοξείδιο καθώς επίσης στην ακετόνη και το ακετονιτρίλιο, ενώ στο νερό διαλύονται μέχρι 10-20 mg/L. Αντίθετα είναι αδιάλυτες σε μη-πολικούς διαλύτες. Αυτή η χαρακτηριστική τους φυσική ιδιότητα παίζει

σημαντικό ρόλο στη διαδικασία εκχύλισης του δείγματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της αφλατοξίνης [5].

Η πιο συχνά απαντώμενη αφλατοξίνη, η B<sub>1</sub>, έχει λευκό έως κίτρινο χρώμα, είναι κρυσταλλική και άοσμη. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των αφλατοξινών [1Α]

**Πίνακας 2.5.2** Φυσικές και Χημικές ιδιότητες Αφλατοξινών

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ				ΥV ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ	
Αφλατοξίνη	ΜΤ	ΜΒ	ΣΤ (°C)	265nm	360-362nm
B <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	313	268- 269	12,400	21,800
B <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315	286-289	12,100	24,000
G <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	329	244-246	9,600	17,700
G <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331	237-240	8,200	17,100
M <sub>1</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	329	299	14,150	21,250
M <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331	293	12,100	22,900

Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερές σε απουσία φωτός και κυρίως υπεριώδους ακτινοβολίας ακόμα και σε θερμοκρασίες πάνω από 100 °C. Ένα διάλυμα που προετοιμάζεται με χλωροφόρμιο ή

βενζόλιο είναι σταθερό για χρόνια, εφ' όσον διατηρηθεί στο σκοτάδι και σε χαμηλές θερμοκρασίες [2, 5].

### A. 2.5.3 Χημικές αντιδράσεις.

Η συμπεριφορά των αφλατοξινών υπο την επίδραση διαφόρων φυσικών συνθηκών και χημικών αντιδραστηρίων έχει μελετηθεί εκτεταμένα εξ αιτίας της πιθανής εφαρμογής τέτοιων μεθόδων στην αποτοξίνωση προϊόντων, που έχουν μολυνθεί. Παρακάτω παρατίθεται συνοπτικά η συμπεριφορά των αφλατοξινών στην εφαρμογή θερμότητας, αλκαλίων, οξέων και οξειδωτικών αντιδραστηρίων [1A]

- Θερμότητα

Οι αφλατοξίνες σε ξηρή μορφή παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα στην θέρμανση έως το σημείο τήξεως. Ωστόσο, παρουσία υγρασίας και σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρείται καταστροφή τους ύστερα από κάποιο διάστημα.

- Αλκάλια

Σε αλκαλικά διαλύματα πραγματοποιείται υδρόλυση του τμήματος της λακτόνης. Η υδρόλυση εμφανίζεται ως αντιστρεπτή, αφού έχει αποδειχθεί ότι συντελείται επανακυκλοποίηση κατόπιν οξίνισης. Σε υψηλότερες θερμοκρασίες (100 °C) το άνοιγμα του δακτυλίου ακολουθείται από αποκαρβοξυλίωση και η αντίδραση μπορεί να προχωρήσει περαιτέρω προκαλώντας απώλεια της μεθόξυ ομάδας από τον αρωματικό δακτύλιο. Παρόμοια σειρά αντιδράσεων θεωρείται ότι πραγματοποιείται και με την αμμώνια και διάφορες αμίνες [1A]

- Οξέα

Παρουσία ανόργανων οξέων, οι AFB<sub>1</sub> και AFG<sub>1</sub> μετατρέπονται στις AFB<sub>2A</sub> και AFG<sub>2A</sub> εξ αιτίας της υπό οξέως καταλυόμενης προσθήκης νερού στο διπλό δεσμό του φουρανικού δακτυλίου.

Παρουσία οξικού ανυδρίτη και υδροχλωρικού οξέος η αντίδραση προχωρεί περαιτέρω δίνοντας αιθόξυ παράγωγα [1A]

- Οξειδωτικά αντιδραστήρια

Πολλά οξειδωτικά αντιδραστήρια όπως το υποχλωριώδες νάτριο, το υπερμαγγανικό κάλιο, το χλώριο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το όζον και το υπερβορικό νάτριο αντιδρούν με τις αφλατοξίνες μεταβάλλοντας κατά κάποιο τρόπο το μόριο τους όπως αποδεικνύεται από την απώλεια του φθορισμού. Ο μηχανισμός αυτών των αντιδράσεων δεν έχει πλήρως καθοριστεί και τα προϊόντα της αντίδρασης παραμένουν στις περισσότερες περιπτώσεις μη ταυτοποιημένα [1A]

- Αναγωγή

Η υδρογόνωση της AFB<sub>1</sub> και AFG<sub>1</sub> οδηγεί στην αφλατοξίνη B<sub>2</sub> και G<sub>2</sub>, αντίστοιχα. Περαιτέρω αναγωγή της AFB<sub>1</sub> από 3 μόρια H<sub>2</sub> οδηγεί στην τετρα-υδροξυ-αφλατοξίνη. Με ισχυρότερα αναγωγικά μέσα, όπως το τετραϋδροβορικό νάτριο (NaBH<sub>4</sub>) ανάγεται η κετονική ομάδα (-CO-) του κυκλοπεντενικού δακτυλίου των αφλατοξινών B<sub>1</sub> και B<sub>2</sub> (προς -CH<sub>2</sub>) παρέχοντας τις αφλατοξίνες RB<sub>1</sub> και RB<sub>2</sub> [1A]

## A. 2.6. Νομοθεσία Αφλατοξινών

### A. 2.6.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις αφλατοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006) [15]. Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus spp* και κατά συνέπεια δεν είναι δυνατό να απαλειφθούν πλήρως οι αφλατοξίνες από τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Συνιστάται επομένως να περιορίζεται η παρουσία

τους στο κατώτατο εφικτό επίπεδο [15]. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο, για λόγους ασφαλείας και δημόσιας υγείας, να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B<sub>1</sub>. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη M<sub>1</sub> θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση ή λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη B<sub>1</sub>, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητα της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά [15]. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπόψη και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη.

Η θέσπιση των μεγίστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μεγίστων συγκεντρώσεων απαιτείται συνυπολογισμός και εκτίμηση πολλών παραγόντων όπως τα τοξικολογικά δεδομένα, ο μεταβολισμός αυτών των ουσιών, η οξεία και χρόνια τοξικότητα. Παράλληλα πρέπει να υπάρχει σύνδεση των παραπάνω με την παρουσία των τοξινών στα τρόφιμα και την ποσότητα στην οποία εκτίθενται οι καταναλωτές. Σήμερα δεν είναι γνωστό κάποιο όριο κάτω από το οποίο να μην παρατηρούνται αρνητικές επιδράσεις στην υγεία του καταναλωτή από τις αφλατοξίνες, συνεπώς δεν μπορεί να οριστεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη [15].

Τα μέγιστα όρια ορίζονται μετά από αποφάσεις πολλών επιστημονικών οργανισμών, αρχών και άλλων σωμάτων, τα οποία συνεκτιμούν τοξικολογικές εκτιμήσεις και την έκθεση των καταναλωτών στις αφλατοξίνες. Μερικοί από τους διεθνείς οργανισμούς που εισηγούνται και λαμβάνουν αποφάσεις σχετικά με τους κινδύνους των αφλατοξινών είναι:

- Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Programm on Chemical Safety - IPCS, [www.who.int/pcs/](http://www.who.int/pcs/) )
- Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer –IARC, [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr) )
- Κοινή FAO/WHO Επιτροπή για τα Πρόσθετα και τους Επιμολυντές των Τροφίμων (Joint FAO/WHO Committee on Food Additives and Contaminants- JECFA, [www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm](http://www.who.int/pcs/jecfa/jecfa.htm) ).

Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τους ξηρούς καρπούς που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 µg/kg (ppb) για την B<sub>1</sub> και 4,0 µg/kg (ppb) για το άθροισμα των B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>. Ενώ στα μπαχαρικά η μέγιστη τιμή είναι 5,0 µg/kg (ppb) για την B<sub>1</sub> και 10,0 µg/kg (ppb) για το άθροισμα των B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub> [15]. Για την αφλατοξίνη B<sub>1</sub> πάντα θεσπίζεται ξεχωριστό όριο λόγω της αυξημένης τοξικότητάς της [1A].

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία αναγνωρίζει ότι οι μέθοδοι διαλογής ή άλλες φυσικές διαδικασίες επιτρέπουν να μειωθεί η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες σε διάφορα τρόφιμα όπως: στα αράπικα φιστίκια, στους ξηρούς καρπούς με κέλυφος, στα ξηρά φρούτα και στον αραβόσιτο. Έτσι προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις στο εμπόριο, γίνονται αποδεκτές και υψηλότερες περιεκτικότητες από τις προαναφερόμενες σε αφλατοξίνες για τα εν λόγω προϊόντα, εφόσον αυτά δεν προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά τροφίμων [15]. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανόμενης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που αναφέρθηκαν τα όρια είναι τα εξής: για ξηρούς καρπούς με κέλυφος (κελυφωτά φιστίκια, αμύγδαλα, καρύδια) 5,0 µg/kg (ppb) για την B<sub>1</sub> και 10,0µg/kg (ppb) για το άθροισμα των αφλατοξινών. Ενώ για τα



αράπικα φιστίκια το όριο είναι 8,0 μg/kg (ppb) για την Β<sub>1</sub> και 15,0 μg/kg (ppb) για το σύνολο των αφλατοξινών. Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν αφλατοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση [15].

Σε περίπτωση μη συμμόρφωσης των τροφίμων με τα καθορισμένα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα αφλατοξίνης, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή νομοθεσία τα τρόφιμα αυτά θεωρούνται ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση και απαγορεύεται η χρήση τους ως συστατικά τροφίμων. Επιπλέον, απαγορεύεται να αναμειγνύονται με καθαρά από αφλατοξίνες τρόφιμα, αλλά και να υπόκεινται σε χημικές κατεργασίες για την απομάκρυνση τους [15].

#### **A. 2.6.2. Παγκόσμια Νομοθεσία.**

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία των αφλατοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών [1Α]. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους στα διάφορα τρόφιμα που εμπορεύονται σε όλο τον κόσμο. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις αφλατοξίνες υπάρχουν σε περίπου 100 χώρες παγκοσμίως [16]. Στις αναπτυγμένες χώρες του κόσμου, όπου η διάρκεια ζωής έχει αυξηθεί σε συνδυασμό με την βελτίωση της ποιότητας ζωής παρατηρείται μεγαλύτερη προσπάθεια όσον αφορά τον έλεγχο των αφλατοξινών. Αντίθετα στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναπτυσσόμενων χωρών, κύριο μέλημα αποτελεί η καταπολέμηση της φτώχειας και των ασθενειών με αποτέλεσμα να μην έχουν καθιερωθεί, ευρέως, κανονισμοί για τις μυκοτοξίνες γενικότερα ή να μην είναι το ίδιο αυστηροί [10].

**Πίνακας 2.6.2: Σύνοψη των υπάρχοντων κανονισμών στο τέλος του 2008 [16, 17]**

Περιοχή	Χώρες	Ποσοστό Πληθυσμού στην περιοχή (%)	Λεπτομερείς κανονισμοί
Αφρική	14	54	Μαρόκο
Ασία/ Ωκεανία	25	89	Κίνα και Ιράν (εναρμωσμένοι κανονισμοί για Αυστραλία και Ν. Ζηλανδία)
Ευρώπη	38	99	Τα κράτη μέλη είναι εναρμωσμένα.
Λατ. Αμερική	19	92	Ουρουγουάη
Β. Αμερική	2	100	Καναδάς και ΗΠΑ

Αν και η θέσπιση των ανώτερων ορίων είναι αποτέλεσμα συνεργασίας πολλών φορέων παρατηρούνται διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα διάφορα κράτη [16]. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι στις ΗΠΑ το μέγιστο επιτρεπτό όριο για τις αφλατοξίνες ανέρχεται στα 20 ppb για τρόφιμα ενώ στα κράτη της ΕΕ το αντίστοιχο όριο είναι στα 2ppb για την αφλατοξίνη AFB<sub>1</sub> και 4 ppb για το άθροισμα των αφλατοξινών (total AF). Παράλληλα ο αρμόδιος αμερικάνικος φορέας έχει θέσει ως όριο για την AFM<sub>1</sub> στο γάλα και τα συναφή προϊόντα την τιμή 0,5 μg/l, ενώ στην ΕΕ η αντίστοιχη τιμή είναι 0,05μg/L [17, 1Α]. Στην πράξη, τα διαφορετικά όρια, που έχουν θεσπιστεί

στις διάφορες χώρες του κόσμου προκαλούν ενδεχόμενα προβλήματα στο διεθνές εμπόριο, εις βάρος συνήθως των λιγότερο αναπτυγμένων χωρών.

## **A. 3. ΟΙ ΑΣΠΕΡΓΙΛΟΙ**

### **A. 3.1 Γενικά στοιχεία**

Λίγοι μύκητες είναι τόσο σημαντικοί όσο τα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι ασπέργιλλοι, ως μια ομάδα οργανισμών έχουν τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση στους ανθρώπους. Τα χαρακτηριστικά τους έχουν μεγάλο παθολογικό, γεωργικό, βιομηχανικό, φαρμακευτικό, επιστημονικό και καλλιεργητικό ενδιαφέρον. Ως έξοχοι παράγοντες βιοαποδόμησης, οι ασπέργιλλοι έχουν απομονωθεί από διάφορες πηγές όπως καύσιμα αεροσκαφών, Αιγυπτιακές μούμιες, υλικό φωλιάς, αλιγάτορα, ηλεκτρικές ασφάλειες, πλαστικά προϊόντα κ.α. Αυτή η μεγάλη και κοσμοπολίτικη ομάδα μυκήτων έχει ένα σημαντικό ρόλο στο οικοσύστημα, διότι εμπλέκεται στην αποδόμηση ενός μεγάλου εύρους φυσικών οργανικών υποστρωμάτων, ιδιαιτέρως φυτικών υλικών. Τα είδη των ασπέργιλλων έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται και να αναπαράγονται σε πολλές και διαφορετικές πηγές άνθρακα. Εμφανίζουν μια καταπληκτική θρεπτική ευελιξία. Η ποικιλομορφία των ενζύμων και των οργανικών οξέων που χρησιμοποιούν ως θρεπτικά συστατικά συμπληρώνεται από την μεταβολική τους ικανότητα να εκκρίνουν πολλούς χαμηλού μοριακού βάρους δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρείται ότι είναι σημαντικοί στα επικοινωνιακά σήματα του οικοσυστήματος [7].

### **A. 3.2. Βιομηχανική χρήση ασπεργίλλων**

Πολλές και διαφορετικές βιομηχανικές διεργασίες βασίζονται σε διάφορα είδη του γένους *Aspergillus*. Οι ασπέργιλλοι είναι σημαντικοί στην βιομηχανία οινοπνευματωδών, στη

φαρμακοβιομηχανία και στην ενζυμική βιομηχανία [1, 7]. Οι παλαιότερες διεργασίες σχετίζονται με παραδοσιακές ζυμώσεις τροφίμων στις Ασιατικές χώρες. Αυτά τα ζυμούμενα προϊόντα και ποτά περιλαμβάνουν μια πάστα σόγιας (miso), σάλτσα σόγιας (shoyu), το γνωστό sake (οίνος ρυζιού), τα shochu (οινοπνευματώδη ποτά και το ξύδι από ρύζι (yonezu). Η πιο διαδεδομένη διεργασία είναι τα koji: μίγμα από σιτάρι, ρύζι ή άλλα σιτηρά με ή χωρίς σόγια, όπου κατάλληλα είδη ασπέργιλλων αναπτύσσονται και εκκρίνουν ένζυμα τα οποία διασπούν τους υδατάνθρακες, τις πρωτεΐνες και άλλες οργανικές ενώσεις. Το αποτέλεσμα είναι ένα πιο εύγεστο προϊόν για ανθρώπινη κατανάλωση και διαθέσιμο για περαιτέρω ζύμωση από ζύμες και οξυγαλακτικά βακτήρια. Επιπλέον πολλά ένζυμα των ασπέργιλλων έχουν απομονωθεί και έχουν ευρεία βιομηχανική χρήση [22].

Μιά άλλη σημαντική χρήση των ασπέργιλλων στην βιομηχανία είναι η παραγωγή κιτρικού οξέος. Για δεκαετίες πλέον, το είδος *A.niger* θεωρείται το βιολογικό εργοστάσιο παραγωγής κιτρικού οξέος για μαζική παραγωγή και χρήση του στη βιομηχανία αναψυκτικών και ποτών [22].

### **A. 3.3 Η ομάδα *A. Flavus* – Τα είδη *A.flavus* και *A. Parasiticus*.**

Το γένος *Aspergillus* περιέχει περίπου πάνω από 100 είδη μυκήτων [1,18]. Τα πενήντα είδη από αυτά παράγουν μυκοτοξίνες και απαντώνται σε πάρα πολλά τρόφιμα (ξηρούς καρπούς, μπαχαρικά) [1,3,18]. Οι μυκοτοξίνες που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εκτός από τις αφλατοξίνες είναι και η ωχρατοξίνη Α (OTA), και το κυκλοπινιζιακό οξύ [1, 3, 18]. Οι μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* αποτελούν την αιτία παραγωγής αφλατοξίνης τόσο σε στάδια πριν την συγκομιδή όσο και μετασυλλεκτικά [10].

#### **A. 3.4. Σημασία της ομάδας του *A.flavus***

Τα είδη της ομάδας του *A.flavus* είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση. Απομομώνονται συχνά απο εδάφη, κυρίως των τροπικών και υποτροπικών περιοχων, από ζωοτροφές και φυτικά υλικά σε αποσύνθεση, σε αποθηκευμένους σπόρους και σιτηρά και από διάφορα άλλα προϊόντα (φρούτα, αποξηραμένους καρπούς κ.α. ). Συνεισφέρουν στις διεργασίες της αποσύνθεσης σε υψηλά επίπεδα υγρασίας, γι'αυτό και δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε σχέση με άλλα είδη μυκήτων που απαιτούν χαμηλότερα ποσοστά υγρασίας. Ορισμένα είδη είναι παθογόνα στον άνθρωπο, τα ζώα και τα έντομα [22]. Επίσης, χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την παραγωγή ενζύμων. Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών ουσιών από στελέχη του *A.flavus* μετά από παρατηρήσεις ότι ορισμένες ουσίες (ασπεργιλλικό οξύ, φλαβασίνη) εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση. Λόγω της ικανότητας αυτής της ομάδας των μυκήτων να παράγουν κογικό οξύ (kojic acid) μελέτες έχουν γίνει για τη χρήση τους σε διαδικασίες ζύμωσης και στην παρεμπόδιση της ενζυματικής αμαύρωσης διαφόρων τροφίμων [22]. Άλλες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για την χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή βιταμινων, παραγόντων ανάπτυξης και άλλων χημικών ουσιών [19].

#### **A. 3.5 Οικολογία του *A.flavus*.**

Ο *A.flavus* είναι ένα ανταγωνιστικό σαπρόφυτο, φυτοπαράσιτο και ζωοπαράσιτο. Συνεπώς η οικολογία του περιλαμβάνει όλες τις γνωστές τροφικές φάσεις του γένους *Aspergillus*. Οι δύο μύκητες *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι πολύ συγγενή είδη και αναπτύσσονται σε φυτικά υλικά τόσο πάνω όσο και μέσα στο έδαφος.

Ο *A.flavus* ανήκει στο υπο-γένος *Circumdati* στο τμήμα *Flavi*. Τα είδη αυτού του τμήματος που υπάρχουν και είναι περισσότερο συχνά στις υποτροπικές ζεστές κλιματικές περιχές με μια τάση να εμφανίζονται πιο συχνά σε περιοχές με υψηλή βροχόπτωση, θερμοκρασία και υγρασία. Ο

*A.flavus* συναντάται κυρίως σε θερμοκρασίες μεταξύ 26<sup>0</sup>C και 35<sup>0</sup>C. Απομονώνεται κυρίως από καλλιεργούμενα εδάφη, αλλά μπορεί να βρεθεί σε διάφορα υποστρώματα όπως δασικά εδάφη. Ο *A.flavus* καθώς και το συγγενές του είδος *A.parasiticus* είναι τα πιο συχνά απαντώμενα είδη παραγωγής αφλατοξίνων. Αν και τα δύο είδη μπορεί να βρεθούν σε σπόρους βαμβακιού, καλαμποκιού, φιστικιών και άλλων ξηρών καρπών, ο *A.flavus* είναι το πιο κυρίαρχο είδος. Ο *A.parasiticus* έχει μια ελαφρώς χαμηλότερη άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης και παραγωγής αφλατοξίνης, γεγονός το οποίο εξηγεί γιατί βρίσκεται περισσότερο στην αραχίδα (υπόγειος καρπός) απ'ότι σε υπέργειους καρπούς (πχ., ξηρούς καρπούς και μπαχαρικά). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ αυτά τα είδη μπορούν και αποικίζουν καρπούς, πιο συχνά σχετίζονται με το έδαφος όπου πρέπει να ανταγωνιστούν την μικροπανίδα και μικροχλωρίδα του εδάφους [20].

### **A. 3.6 Ο *A.flavus* ως φυτοπαθογόνο**

Ο *A.flavus* είναι ένα προαιρετικό παθογόνο των αναπτυσσόμενων καρπών, κυρίως του αραβόσιτου, του βαμβακιού, της αραχίδας, των ξηρών καρπών και των μπαχαρικών. Δεν είναι επιθετικό παθογόνο και η αποίκισή του συχνά απαιτεί το φυτό-ξενιστή να έχει κατεσταλμένη άμυνα, συνήθως λόγω ξηρασίας και θερμοκρασιακού stress. Αν και είναι προαιρετικό παθογόνο είναι πολύ καλά προσαρμοσμένο στην αποίκηση καρπών ενώ η παρουσία του είναι κυρίαρχη στην προσπάθεια προσβολής του καρπού από άλλους μύκητες. Αυτή η καλή προσαρμογή υποδηλώνει ότι ο *A.flavus* έχει μια μοναδική ομάδα γονιδίων απαραίτητη για την αποίκηση στους καρπούς, ή διαφορετικά, έχει ικανότητες ανταγωνιστικής υπεροχής. Μελέτες στην αραχίδα έδειξαν ότι ο *A.flavus* είναι ο κυρίαρχος μύκητας σε τραυματισμένους καρπούς αν και αντιπροσωπεύει μόλις το 1% της πανίδας του εδάφους.



Αρκεί μια μικρή αποικία *A.flavus* να βρεθεί σε θερμοκρασιακό και υγρασιακό stress για να παραχθεί αφλατοξίνη σε συγκεντρώσεις πάνω από αποδεκτό όριο [20]. Επιμόλυνση μπορεί να προκληθεί και σε μετασυλλεκτικό στάδιο αν οι καρποί ή οι ζωοτροφές δεν αποθηκευτούν σε κατάλληλο περιβάλλον [10]

## **A. 4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ**

### **A. 4.1 Βιοσύνθεση της αφλατοξίνης**

#### **A. 4.1.1 Μονοπάτια και Ένζυμα στη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης**

Το βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης είναι ένα από τα πιο ευρέως μελετημένα μονοπάτια του δευτερογενούς μεταβολισμού των μυκήτων. Μέσα στην τελευταία δεκαετία, έχουν διευκρινιστεί τα κύρια βιοχημικά μονοπάτια καθώς και η χημική δομή των ενδιάμεσων προϊόντων έχει ταυτοποιηθεί. Έχει αποδειχθεί ότι στη βιοσύνθεση περιλαμβάνονται 23 τουλάχιστον ενζυματικές αντιδράσεις, ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 15 δομικά προσδιορισμένες ενδιάμεσες ενώσεις.

Οι έρευνες δείχνουν ότι οι αφλατοξίνες συντίθεται από το μηλονυλ-συνένζυμο A (Malonyl CoA), αρχικά με το σχηματισμό του εξανοϋλ-συνενζύμου A (hexanoyl CoA) και στη συνέχεια με το σχηματισμό δεκακετιδίου ανθρακινόνης. Υπάρχουν δύο συνθάσες λιπαρών οξέων (FAS) και μία συνθάση πολυκετιδίου (PKS) οι οποίες εμπλέκονται στη σύνθεση του πολυκετιδίου από το ακετυλο-συνένζυμο A (acetyl-CoA). Το νορσολορινικό οξύ (norsolorinic acid –NOR) είναι το πρώτο σταθερό ενδιάμεσο που ταυτοποιήθηκε στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της αφλατοξίνης. Οι αφλατοξίνες σχηματίζονται μετά από μια σειρά καλά οργανωμένων οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων[10].

#### **A. 4. 2 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης.**

Πολλοί βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων θρεπτικών και περιβαντολογικών συνθηκών, είναι γνωστό ότι επιδρούν στην παραγωγή αφλατοξίνης από τοξικογόνα στελέχη των ασπεργίλλων. Μερικοί από αυτούς τους παράγοντες πιθανόν να επιδρούν στο γονίδιο ρύθμισης της αφλατοξίνης *aflR* ή να διαφοροποιούν την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αποκρίνονται σε εξωτερικά σήματα [10].

Η μόλυνση των καρπών με αφλατοξίνες είναι αποτέλεσμα της προσβολής της καλλιέργειας από τους συγκεκριμένους μύκητες, η οποία μπορεί να λάβει χώρα σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας (καλλιέργεια, συγκομιδή, επεξεργασία, αποθήκευση, διανομή). Η παρουσία των μυκήτων δεν σημαίνει κατ' ανάγκη και την ύπαρξη αφλατοξίνης. Γενικά, οι κλιματολογικές συνθήκες, το κατάλληλο υπόστρωμα, η προσβολή από έντομα και η ευαισθησία του φυτού σε μολύνσεις από μύκητες είναι οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η προσβολή από μύκητες και η παραγωγή αφλατοξίνης πριν τη συλλογή. Μετά την συλλογή και κατά την διάρκεια της μεταφοράς, της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, η ανάπτυξη τοξικογόνων μυκήτων και η ενδεχόμενη παραγωγή μυκοτοξίνης επηρεάζονται από πλήθος παραγόντων μεταξύ των οποίων η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), το επίπεδο υγρασίας, η θερμοκρασία, ο χρόνος, το μέγεθος της ζημιάς που έχουν υποστεί οι καλλιέργειες, οι προσβολές από έντομα και άλλους μικροοργανισμούς και διάφοροι χημικοί παράγοντες όπως ο αερισμός (επίπεδα  $O_2$  και  $CO_2$ ), το pH [9, 10].

##### **A.4. 2. 1 Παράγοντες θρέψης.**

Θρεπτικοί παράγοντες όπως ο άνθρακας, το άζωτο, τα αμινοξέα, τα λιπίδια και τα ιχνοστοιχεία έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης. Η σχέση μεταξύ της πηγής άνθρακα και

του σχηματισμού της αφλατοξίνης έχει αποδειχθεί επαρκώς. Απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη, η μαλτόζη ή η λακτόζη υποστηρίζουν το σχηματισμό της αφλατοξίνης. Παρ'όλα αυτά, ο μηχανισμός της ύπαρξης της πηγής άνθρακα στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της αφλατοξίνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Η πηγή αζώτου επιδρά στο σχηματισμό της αφλατοξίνης πολλαπλώς. Η παραγωγή αφλατοξίνης είναι διαφορετική εάν στο υπόστρωμα υπάρχει νιτρώδες ή νιτρικό άλας. Τα αμινοξέα έχουν αντίστροφη επίδραση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η τρυπτοφάνη παρεμποδίζει το σχηματισμό αφλατοξίνης στον *A.flavus*. Τα ιχνοστοιχεία (μεταλλικά ιόντα) έχουν επίσης αναφερθεί ότι επιδρούν στην έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν τη βιοσύνθεση αφλατοξίνης. Τα λιπίδια έχουν πολύ μεγάλη επίδραση στο σχηματισμό αφλατοξίνης, όχι μόνο ως πηγή θρεπτικών συστατικών αλλά και ως υπόστρωμα μεταβολισμού των αρχικών μονάδων του ακυλο-συνένζυμου Α (acyl-CoA) και ως μόρια εκπομπής σημάτων [10].

#### **A. 4.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.**

Οι εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού ( $a_w$ ), παράγοντες stress όπως η ξηρασία και άλλοι έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την παραγωγή αφλατοξίνης [10] καθώς και τους πληθυσμούς των αφλατοξικογόνων μυκήτων [21]. Η μόλυνση με αφλατοξίνες ποικίλει και εξαρτάται από τις καιρικές συνθήκες που επικρατούν την καλλιεργητική περίοδο [21]. Σε μελέτη για την αραχίδα στην Αυστραλία αναφέρεται αύξηση της μόλυνσης με αφλατοξίνες μετά από ξηρασία, ενώ αντίθετα μείωση μετά από επαρκείς βροχοπτώσεις [21]. Πριν τη συγκομιδή, ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την μόλυνση με αφλατοξίνες είναι οι ακανόνιστες ή ανεπαρκείς βροχοπτώσεις, ιδιαίτερα στα εδάφη που έχουν μειωμένη υδατοϊκανότητα [21]. Αντίστοιχες παρατηρήσεις έγιναν και στις ΗΠΑ, όπου υψηλές θερμοκρασίες

σε συνδυασμό με την ξηρασία είναι οι κυριότεροι παράγοντες παραγωγής αφλατοξίνης [21]. Πρόσφατες μελέτες θεωρούν ότι η μεταγραφή του γονιδίου *aflR* ανταποκρίνεται σε μία G-πρωτεϊνική διαταξη εκπομπής σήματος, η οποία ελέγχεται από μία πρωτεϊνική κινάση A, ώστε το μονοπάτι εκπομπής σημάτων πιθανόν να ανταποκρίνεται στις περιβαλλοντικές επιδράσεις οι οποίες επηρεάζουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης [10].

Η παραγωγή της αφλατοξίνης έχει ένα πιο περιορισμένο εύρος συνθηκών θερμοκρασίας και ενεργότητας νερού απ'ότι η ανάπτυξη του μύκητα. Οι άριστες συνθήκες ανάπτυξης των *A.flavus* και *A.parasiticus* είναι θερμοκρασία 36°C και ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) >0,95, ενώ σε θερμοκρασία κάτω από 8°C και  $a_w$  <0,77 οι μύκητες δεν αναπτύσσονται [4]. Η μέγιστη παραγωγή αφλατοξίνης παρατηρείται σε θερμοκρασία 33°C (από 28-35°C) ή και ενεργότητα νερού πάνω από 0,95, ενώ σε ενεργότητα νερού κάτω από 0,83 δεν παράγεται αφλατοξίνη [10]. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται πάνω από 36°C, ο μύκητας σταματά να παράγει αφλατοξίνη αν και τα γονίδια που ελέγχουν τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης εκφράζονται. Οι ερευνητές κάνουν την υπόθεση ότι η υψηλή θερμοκρασία πιθανόν αποσταθεροποιεί την ενεργοποιό πρωτεΐνη AflR [10].

Η παραγωγή αφλατοξίνης συσχετίζεται στενά με τις αλλαγές του pH. Η βιοσύνθεση αφλατοξίνης στον *A.flavus* πραγματοποιείται σε όξινα υποστρώματα, αλλά παρεμποδίζεται σε αλκαλικά [10]. Η παρουσία μιας περιοχής (PacC) κοντά στο γονίδιο *aflR* πιθανόν να παίζει κάποιο ρόλο στην επίδραση που έχει το pH στην παραγωγή της αφλατοξίνης, καθώς και άλλες περιοχές στα γονίδια *aflR-aflJ* δίνουν πιθανόν τις αποδείξεις ότι η έκφραση των γονιδίων ρυθμίζεται από περιβαλλοντικά σήματα όπως το pH και τα νιτρικά άλατα [10].

#### **A.4.2.3 Παράγοντες ανάπτυξης.**

Ο δευτερογενής μεταβολισμός σχετίζεται με τις διεργασίες ανάπτυξης των μυκήτων όπως η δημιουργία και ο σχηματισμός σκληρώτιων. Έχει παρατηρηθεί ότι οι συνθήκες περιβάλλοντος που απαιτούνται για το δευτερογενή μεταβολισμό και την παραγωγή σπορίων είναι παρόμοιες. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η παραγωγή σπορίων και ο σχηματισμός προϊόντων δευτερογενούς μεταβολισμού πραγματοποιούνται στο ίδιο περίπου χρονικό διάστημα. Είδη ανεπαρκή στην παραγωγή σπορίων δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν αφλατοξίνες. Στον *A.parasiticus* συγκεκριμένες ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν την σπορογένεση έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζουν και την παραγωγή αφλατοξίνης. Χημικές ουσίες, οι οποίες παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση πολυαμίνης στα είδη *A.parasiticus* και *A.nidulans* παρεμποδίζουν τόσο την παραγωγή σπορίων όσο και την βιοσύνθεση αφλατοξίνης/στεριγματοκυστίνης (ST). Μια βασική ένδειξη για το παραπάνω είναι ένα πρόσφατο εύρημα ότι η ρύθμιση της σπορογένεσης και της παραγωγής στεριγματοκυστίνης (ST) ελέγχεται από ένα G-πρωτεϊνικό μονοπάτι στον *A.nidulans* [10].

#### **A. 4.2.4 Παράγοντες stress και αντιοξειδωτικά**

Σε μελέτες στη Νότια Αφρική σε αραχίδα έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του θερμοκρασιακού stress (περίοδοι ξηρασίας) και αυξημένη παραγωγή αφλατοξινών. Στην αραχίδα αναφέρεται ότι οποιαδήποτε ζημία στους καρπούς (ψίχα και κέλυφος) αυξάνει την πιθανότητα ύπαρξης του *A.flavus* και της μόλυνσης από αφλατοξίνη ανεξαρτήτως συνθηκών ανάπτυξης της καλλιέργειας. Η πιθανότητα γίνεται πιο ισχυρή όταν υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες (π.χ ξηρασία). Είναι γνωστό ότι το οξειδωτικό στρες προκαλεί την βιοσύνθεση της αφλατοξίνης. Σε μελέτες έχει αποδειχθεί ότι εφαρμογή με tert-βουτυλ υδροπεροξειδίου στον *A.flavus* προκάλεσε σημαντική αύξηση στην παραγωγή αφλατοξίνης. Το ίδιο αποτέλεσμα υπήρξε και με τον

*A. parasiticus*. Αντίθετα, οι υδρολυόμενες ταννίνες παρεμποδίζουν σε μεγάλο βαθμό τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης με πιο αποτελεσματικό το γαλλικό οξύ. Το γαλλικό οξύ μειώνει την έκφραση των γονιδίων που ελέγχουν την βιοσύνθεση αφλατοξίνης, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στο γονίδιο *aflR*. Η προσθήκη φαινολικών ή άλλων αντιοξειδωτικών όπως το ασκορβικό οξύ στον *A. flavus* παρεμποδίζει σημαντικά την παραγωγή αφλατοξίνης χωρίς να επιδρά ιδιαίτερα στην ανάπτυξη του μύκητα. Ένα άλλο αντιοξειδωτικό που παρεμποδίζει την παραγωγή αφλατοξίνης είναι το καφεϊκό οξύ [10, 21].

## **B. ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ- ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **B.1. Ξηροί καρποί-ορισμός- κατάταξη**

Στη βοτανική ορολογία γνήσιος καρπός θεωρείται ό,τι είναι οι ώριμες εξαλλοιωμένες και μεγενθυμένες ωοθήκες. Είναι όμως δυνατόν στο σχηματισμό του καρπού να συμμετέχουν και άλλα μέρη του άνθους. Οι καρποί είναι βοηθητικές κατασκευές της εγγενούς αναπαραγωγής των ανθοφύτων που προστατεύουν τα σπέρματα, υποβοηθούν την διασπορά τους και σε πολλές περιπτώσεις ρυθμίζουν το χρόνο βλαστήσεώς τους. Η μεγάλη μορφολογική σταθερότητα που διαθέτουν αποτελεί ουσιαστικό κριτήριο για την ταξινόμηση και τον προσδιορισμό των διαφόρων φυτικών ειδών [23]. Η μορφολογία των καρπών έχει σχέση με τις δομές της ωοθήκης και του άνθους. Από τα τοιχώματα της ωοθήκης (καρπόφυλλα) δημιουργείται το περίβλημα του καρπού, το περικάρπιο, το οποίο συχνά διακρίνεται σε δύο ή τρία στρώματα με διαφορετικούς ιστούς, το εξωκάρπιο, μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο. Το εξωκάρπιο μπορεί να αποτελείται μόνο από την επιδερμίδα ή από πολύστρωμο υμένιο [23]. Το πάχος των στρωμάτων αυτών αποτελεί στοιχείο για να καταταγεί ένας καρπός στους σαρκώδες ή στους ξηρούς. Στους σαρκώδεις, το περικάρπιο είναι



μαλακό και αποτελείται από εύγεστες και θρεπτικές ουσίες [23]. Οι χυμάδες ή και σαρκώδεις καρποί διακρίνονται σε πολύχωρους και σε μονόχωρους. Στους πολύχωρους ανήκουν οι ράγες όπου έχουν περικάρπιο σαρκώδες ή με δερματώδες περίβλημα (σταφύλια). Στους μονόχωρους καρπούς ανήκουν οι δρύπες όπου έχουν ενδοκάρπιο λιθώδες, που περιβάλλει το μοναδικό σπέρμα (ελιές, καρύδια, φιστίκια, αμύγδαλα) [23].

Πολύ πιο σύνθετη είναι η διαίρεση των ξηρών καρπών, οι οποίοι έχουν περικάρπιο σκληροεγχυματικό [23]. Οι ξηροί καρποί διαιρούνται σε πολύχωρους διαρρηκτούς και σε μονόχωρους διαρρηκτούς. Οι πολύχωροι διαρρηκτοί είναι η κάψα, που είναι ο τυπικός καρπός της παπαρούνας, ο θύλακος που είναι το γλυκάνισο, ο λοβός ή όσπριο, τυπικός καρπός των φασολιών και των υπόλοιπων ψυχανθών [23].

Στους μονόχωρους κι αδιάρρηκτους ανήκουν το καρύδι, το φουντούκι που λέγεται και καρύα και η καρύοψη που είναι ο καρπός των αγρωστώδων [23]. Η διαφορετική ονομασία των ξηρών καρπών είναι τα ακρόδρυα όπου σύμφωνα με αυτή - ακρόδρυα ονομάζονται οι καρποί που όταν ωριμάσουν αποκτούν ξυλώδες σκληρό περίβλημα – [4A].

### **B. 1.1 Ξηροί καρποί –Μαγειρικές και άλλες χρήσεις**

Στην καθημερινή ζωή ο ξηρός καρπός έχει μία ευρύτερη έννοια περιλαμβάνοντας και καρπούς που στα στενά πλαίσια της βοτανικής δεν θεωρούνται ξηροί καρποί. Στη μαγειρική κάθε μεγάλη, ελαιώδης ψίχα που περιβάλλεται από σκληρό κέλυφος μπορεί να θεωρηθεί ξηρός καρπός. Ένας μεγάλος αριθμός ξηρών καρπών καταναλώνεται ως τρόφιμο από τον άνθρωπο είτε ωμός ως snack, είτε επεξεργασμένος (αλατισμένος, ψημένος), ενώ οι ξηροί καρποί χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μαγειρική. Τέλος το έλαιο των ξηρών καρπων μπορεί να απομονωθεί από αυτούς και να χρησιμοποιηθεί ως εδωδιμο έλαιο ή να βρει εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών.



Η ετήσια κατανάλωση ξηρών καρπών στην χώρα μας, ανέρχεται σε 65.000 τόνους. Από αυτή την ποσότητα το 20-25% των πωλήσεων γίνεται το μήνα Δεκέμβριο. Από τα είδη που προτιμάνε οι καταναλωτές, τα κελυφωτά φιστίκια (τύπου Αιγίνης) βρίσκονται στην πρώτη θέση, αφού τα προτιμάει το 30% της αγοράς, ενώ ακολουθούν τα αμύγδαλα και τα φουντούκια με ποσοστό 20% το καθένα στην προτίμηση των καταναλωτών [5Α]. Από τις αρχές της δεκαετίας του '90 σημειώνουν άνοδο οι συσκευασμένοι καρποί, οι οποίοι κέρδισαν το 20%-25% της συνολικής κατανάλωσης. Η παρουσία των συσκευασμένων ευνόησαν την είσοδο των ξηρών καρπών στα super-markets και στ' άλλα σημεία λιανικής, γεγονός που βοήθησε επίσης στην συνολική διεύρυνση της αγοράς τους. Σημαντικό ποσοστό της συνολικής κατανάλωσης ξηρών καρπών, που αγγίζει το 25%-30%, απορροφά η βιομηχανία (ζαχαρώδη, σοκολάτες, παγωτά), ποσοστό που διαφοροποιείται ανάλογα με τον καρπό. Οι κυριότερες χώρες εισαγωγής εντοπίζονται στις εξωκοινοτικές αγορές και κυρίως στην Τουρκία, τις ΗΠΑ, το Ιράν και άλλες χώρες της Ασίας, αλλά και της Ανατολικής Ευρώπης. Από την κοινοτική αγορά ξεχωρίζουν η Γερμανία και η Ισπανία [6Α].

## **B. 2. Τα κελυφωτά φιστίκια**

Η φιστικιά αποτελεί μια μικρή καλλιέργεια για την Ελλάδα αν και η έκταση που καταλαμβάνει έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες [24]. Είναι ένα καρποφόρο δένδρο με μικρές απαιτήσεις ως προς το έδαφος και το κλίμα [24, 25]. Ο καρπός του το κελυφωτό φιστίκι, θεωρείται από τους πιο ευγεστούς ξηρούς καρπούς [24, 25]. Ίσως αυτοί είναι οι λόγοι για τους οποίους η καλλιέργεια του δένδρου έχει επεκταθεί παγκοσμίως και αποτελεί αντικείμενο διεθνούς ενδιαφέροντος. Η Ελλάδα σύμφωνα με τα στοιχεία του FAOSTAT κατα το έτος του 2005 είναι η έκτη χώρα παραγωγής κελυφωτών φιστικιών παγκοσμίως [7Α]. Αξίζει να αναφερθεί ό, τι ο μέσος όρος ποιότητας των

ελληνικών φιστικιών είναι πολύ ανώτερος των Ιρανικών που είναι ο κύριος εισαγωγέας κελυφωτών φιστικιών στην Ελλάδα [24].

Στην Ελλάδα φαίνεται πως η φιστικιά ήρθε γύρω στο 1860 και πρωτοκαλλιεργήθηκε στην Αττική [24,25]. Στην διάδοσή της συνέβαλαν οι γεωπόνοι Ορφανίδης (1869) και Γεννάδιος (1882), που δημιούργησαν τα πρώτα φυτώρια φιστικιάς στο Δημόσιο Δενδροκομείο, που βρίσκονταν στην περιοχή της τωρινής Γεωπονικής Σχολής Αθηνών. Αρχικά η καλλιέργεια της φιστικιάς περιορίστηκε στα παράλια της Αττικής και τη νήσο Αίγινα. Από το 1950 άρχισε να επεκτείνεται η καλλιέργεια της στη Βοιωτία, Κορινθία, Εύβοια και Φθιώτιδα και αργότερα από το 1968 στην κεντρική και βόρεια Ελλάδα (Θεσσαλία, Χαλκιδική, Ροδόπη), στην Κρήτη και στις Κυκλάδες [24,25]. Η φιστικιά καλλιεργείται για τους καρπούς της, που θεωρούνται ως το ευγεστότερο ακρόδρυο. Οι καρποί, όταν ακόμα είναι τρυφεροί, χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γλυκού του κουταλιού

### **B. 3. Τα αμύγδαλα**

Η αμυγδαλιά είναι από τα αρχαιότερα ακρόδρυα, που καλλιεργείται από τον άνθρωπο, αλλά οι ειδικές περιβαλλοντικές απαιτήσεις της έχουν περιορίσει την εμπορική της καλλιέργεια στις κατάλληλες γι' αυτήν περιοχές της υψηλίου. Δενδροκομικά κατατάσσεται στα ακρόδρυα, όπου το φαγώσιμο σπέρμα (ψίχα) αποτελεί το εμπορεύσιμο προϊόν[25]. Η αμυγδαλιά καλλιεργείται για τους καρπούς της, τα αμύγδαλα. Το αμύγδαλο (ψίχα) χρησιμοποιείται ως επιδόρπιο και στην ζαχαροπλαστική (αμυγδαλωτά, κουφέτα, αμυγδαλόγαλα). Το αμυγδαλόγαλο είναι αναψυκτικό ποτό γνωστό και ως σουμάδα. Επίσης τα αμύγδαλα χρησιμοποιούνται και για την παραγωγή αμυγδαλέλαιου που χρησιμοποιείται ευρέως στην φαρμακευτική (καλλυντικά κ. α). Τα υπολείμματα από την παραγωγή του αμυγδαλέλαιου είναι δηλητηριώδη και δεν πρέπει να

χρησιμοποιούνται για κτηνοτροφία [25]. Η αμυγδαλιά κατάγεται από τις ζεστές και ξηρού κλίματος περιοχές της μέσης ανατολής (Ιράν). Η αμυγδαλιά εξαπλώθηκε κατα μήκος των παράλιων της Μεσογείου, στην Βόρεια Αφρική και στην Νότια Ευρώπη από τους Αιγύπτιους, τους Έλληνες και τους Ρωμαίους [25]. Η αμυγδαλιά μεταφέρθηκε στις ΗΠΑ (Καλιφόρνια) τον 18<sup>ο</sup> αιώνα από Ισπανούς κληρικούς που υπηρετούσαν στην αποστολή της Σάντα Μάρμπαρα [25].

Στην Ελλάδα η αμυγδαλιά καλλιεργείται κυρίως στη Στερεά Ελλάδα και Εύβοια, Πελοπόννησο, Θεσσαλία, Μακεδονία, νησιά Αιγαίου και Κρήτη. Τα κυριότερα κέντρα στην Ελλάδα είναι οι νομοί Λαρίσης και Μαγνησίας[24,25].

#### **B. 4. Τα φουντούκια**

Τα φουντούκια είναι θρεπτικά, πλούσια σε πρωτεΐνες και ανόργανα στοιχεία[24]. Τρώγονται συνήθως ψημένα και είναι από τους πολύ καλούς ξηρούς καρπούς[24]. Χρησιμοποιούνται στην σοκολατοβιομηχανία, στην ζαχαροπλαστική και στην αρτοποιία όπου αλέθονται μαζί με το σιτάρι για την παραγωγή ψωμιού [24,25]. Η καλλιέργειά της φουντουκιάς ήταν γνωστή στην χώρα μας από αρχαιότατους ακόμα χρόνους [25]. Στην Ελλάδα η φουντουκιά καλλιεργείται κυρίως στη Μακεδονία [24].

#### **B.5 Τα αράπικα φιστίκια.**

Τα αράπικα φιστίκια προέρχονται από το καλλιεργούμενο φυτό την αραχίδα. Η αραχίδα (*Arachis hypogea L.*) κατατάσσεται στην οικογένεια *Leguminosae* και είναι ένα από τα σπουδαιότερα ελαιοπαραγωγικά φυτά [26]. Ο σπόρος της αραχίδας περιέχει περίπου 40-60% λάδι, ανάλογα με την ποικιλία και τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού και 20-30% πρωτεΐνες. Ο λοβός του φυτού δε φέρει ράχη και από αυτό το γεγονός προήλθε το όνομα του φυτού (α-ραχίδα) [26]. Μπορούμε να

διακρίνουμε 2 τύπους καλλιεργούμενης αραχίδας με πολύ καλή προσαρμογή σε περιοχές με ξηρό καλοκαίρι. Η διάκριση γίνεται με βάση τον τρόπο ανάπτυξης του φυτού (όρθια ή έρπουσα ανάπτυξη) και τον τρόπο με τον οποίο σχηματίζονται οι λοβοί (κοντά ή μακριά από την βάση των φυτών)[26]. Συγκεκριμένα:

1. **Runner type:** τα φυτά έχουν έρπουσα ανάπτυξη με τους βλαστούς να ακουμπούν στο έδαφος και τους λοβούς να σχηματίζονται λίγο απομακρυσμένα από τον κεντρικό βλαστό του φυτού.
2. **Branch type:** τα φυτά έχουν όρθια ανάπτυξη με τους βλαστούς να είναι συγκεντρωμένοι και όρθιοι. Οι λοβοί σχηματίζονται πολλοί μαζί, κοντά στον κεντρικό βλαστό του φυτού. Οι ποικιλίες που ανήκουν σε αυτό τον τύπο είναι πιο πρώιμες από τις έρπουσες ποικιλίες (runner type) και οι σπόροι τους έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λάδι από τις έρπουσες ποικιλίες[26].

Η αραχίδα κατάγεται από την Ν.Αμερική (Βραζιλία) [26]. Οι κυριότερες χώρες καλλιέργειας της αραχίδας είναι η Ινδία, η Κίνα, η Σενεγάλη, οι Η. Π. Α. και η Ινδονησία. Στην Ελλάδα οι κυριότερες περιοχές στις οποίες καλλιεργείται η αραχίδα βρίσκονται στην Ηλεία, στη Μεσσηνία και στις Σέρρες [26].

## **Γ. ΜΠΑΧΑΡΙΚΑ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **Γ.1. Ορισμός – Προέλευση - Ιστορικά στοιχεία**

Μπαχαρικό είναι το αποξηραμένο τμήμα ενός φυτού που περιέχει αρωματικές, πικάντικες και καυστικές ουσίες. Είναι γνωστό και με την ονομασία καρύκευμα. Τα μπαχαρικά μπορεί να είναι φύλλα, σπόρια, καρποί, ρίζες, βολβοί και φλοιοί. Περιλαμβάνονται στις αρτυματικές ύλες και σύμφωνα με τον Ελληνικό κώδικα τροφίμων και ποτών αυτές είναι εκείνες που έχουν έντονο άρωμα και γεύση και η προσθήκη τους στα τρόφιμα γίνεται για τους προσδώσουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά για να βελτιωθεί η γεύση τους [2<sup>Α</sup>]. Πολλά από τα μπαχαρικά έχουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες αντικαθιστώντας τα διάφορα συντηρητικά που σε πολλές περιπτώσεις βλάπτουν την υγεία του ανθρώπου [2<sup>Α</sup>].

Τα μπαχαρικά έχουν παίξει ένα δραματικό ρόλο στον πολιτισμό και στην ιστορία των εθνών [27]. Το εμπόριο των μπαχαρικών είναι από τα αρχαιότερα και είχαν αναπτυχθεί ειδικές εμπορικές οδοί για την μεταφορά τους από την Ασία στην Ευρώπη [2<sup>Α</sup>, 27]. Τα μπαχαρικά χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή ελαίων, φαρμάκων, αφροδισιακών και διάφορων τελετουργιών [2<sup>Α</sup>, 27]. Αρχαία βιβλία ιατρικής και βοτανολογίας αναφέρουν τα μπαχαρικά ως σπουδαία φάρμακα στην θεραπεία διαφόρων ασθενειών. Τα θεωρούσαν ακριβά ως δώρα και τα εκτιμούσαν ιδιαίτερα. Η Αραβία υπήρξε τεράστιο κέντρο διακίνησης μπαχαρικών ενώ οι Άραβες έμποροι απέκρυπταν την πηγή παραγωγής τους. Η Αλεξάνδρεια της Αιγύπτου κατά την περίοδο της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας έγινε το διεθνές εμπορικό κέντρο μπαχαρικών δεχόμενη τα μπαχαρικά από την Ινδία που στην συνέχεια προωθούνταν στην Ευρώπη και στην Ελλάδα [2<sup>Α</sup>]. Στα τέλη του 13<sup>ου</sup> αιώνα, η εξερεύνηση του Μάρκο Πόλο προς την Ασία είχε ως αποτέλεσμα η Βενετία να γίνει το σημαντικότερο εμπορικό λιμάνι, μέχρι περίπου το 1498 [2<sup>Α</sup>, 27]. Ο πορτογάλος εξερευνητής, Βάσκο ντε Γκάμα απέπλευσε από την Πορτογαλία με σκοπό να πάει στις Ινδίες, όπου έφτασε στην

Καλκούτα, επέστρεψε με πιπέρι, κανέλα, τζίντζερ και κοσμήματα, καθώς επίσης παρότρυνε τους Πορτογάλους να συνεχίσουν τις εμπορικές συναλλαγές με την Ινδία [2<sup>Α</sup>,27]. Ο Rosengarten (1969) παρουσίασε μια πολύ ενδιαφέρουσα ιστορία σχετικά με την εξέλιξη του εμπορίου των μπαχαρικών. Το 1492, ο Χριστόφορος Κολόμβος, έφτασε στην Αμερική, ψάχνοντας τα νησιά των μπαχαρικών, αν και δεν βρήκε τα νησιά αυτά, έφερε πίσω μπαχάρι, βανίλια και κόκκινες πιπεριές από τις Δυτικές Ινδίες πίσω στους Ισπανούς [27].

Πολέμοι που αναπτύχθηκαν γύρω από τα νησιά της Ινδονησίας, μεταξύ των Ευρωπαϊκών κρατών για το εμπόριο των μπαχαρικών συνεχίστηκαν για περίπου 200 χρόνια, μεταξύ του 15<sup>ου</sup> και 17<sup>ου</sup> αιώνα [27]. Το 1870, ξέσπασε πόλεμος μεταξύ Άγγλων και Ολλανδών σχετικά με το εμπόριο των μπαχαρικών με αποτέλεσμα η Ολλανδία να χάσει όλα τα κέντρα εμπορίας μπαχαρικών. Οι ΗΠΑ είναι ο σημαντικότερος αγοραστής μπαχαρικών στο κόσμο, ακολουθούμενη από την Γερμανία, την Ιαπωνία και την Γαλλία [27].

Η Ινδία είναι η πρώτη χώρα στο κόσμο που καλλιεργεί και συντελεί στο εμπόριο των μπαχαρικών συμπεριλαμβανομένων της κανέλας, πιπεριού, μοσχοκάρυδου, γαρίφαλλου και τζίντζερ [2<sup>Α</sup>,27]. Ωστόσο όλο και περισσότερα μπαχαρικά φυτεύονται και στο δυτικό ημισφαίριο. Στην Βραζιλία καλλιεργείται πιπέρι σε μεγάλες εκτάσεις. Η Γουατεμάλα ηγείται της καλλιέργειας κάρδαμου. Η Γρανάδα καλλιεργεί μοσχοκάρυδο και τζίντζερ και διάφορα άλλα μπαχαρικά καλλιεργούνται στην Τζαμάικα [27].

### **Γ.1.1. Η Παγκόσμια Παραγωγή Μπαχαρικών.**

Η κύρια ετήσια παραγωγή μπαχαρικών ανέρχεται σε 6-7 εκατοντάδες χιλιάδες τόννους και η αξία της υπολογίζεται στα 3-3,5 δισεκατομμύρια δολάρια. Η τιμή των μπαχαρικών εξαρτάται



συγκεκριμένα από την τιμή που έχει το πιπέρι, καθώς το πιπέρι είναι το κυρίως μπαχαρικό που προωθείται στην παγκόσμια αγορά [28].

Η παγκόσμια παραγωγή μπαχαρικών αναμένεται να αυξηθεί καθώς υπάρχει ολοένα και περισσότερο ενδιαφέρον των καταναλωτών της δυτικής κοινωνίας για πιο εξωτικές και έθνικ γεύσεις στα τρόφιμα τους [28]. Στην Αγγλία, για παράδειγμα, η εισαγωγή μπαχαρικών αυξήθηκε κατά 27% τα τελευταία 5 χρόνια, όπου αφορούσε τα μπαχαρικά κανέλλα και τζίντζερ [28].

Περίπου το 85% των μπαχαρικών εξάγονται διεθνώς στην κανονική τους μορφή (δηλ. δεν έχουν επεξεργαστεί), όπου οι χώρες εισαγωγής τυποποιούν και συσκευάζουν το τελικό προϊόν στις βιομηχανίες τροφίμων και στις εγχώριες αγορές τους [28].

### **Γ.1.2 Ο λειτουργικός ρόλος των μπαχαρικών.**

Τα μπαχαρικά μπορούν να προστεθούν στα διάφορα τρόφιμα σε διάφορες μορφές όπως: φρέσκα, αλεσμένα, αποξηραμένα, σαν αιθέρια έλαια και σαν ελαιορητίνες [27]. Σε γενικές γραμμές τα μπαχαρικά διατίθενται ως αποξηραμένα γιατί έχουν την μεγαλύτερη διάρκεια ζωής [2<sup>A</sup>].

Τα μπαχαρικά μεταδίδουν άρωμα, χρώμα και γεύση στα τρόφιμα και κάποιες φορές καλύπτουν άσχημες μυρωδιές [27]. Τα πτητικά τους έλαια δίνουν το άρωμα και οι ελαιορητίνες μεταδίδουν την γεύση [27]. Τα συστατικά των αρωμάτων τους παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των μπαχαρικών, όπου χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων για να ενισχύσουν την γεύση και να αυξήσουν την εμφάνιση των προϊόντων τους [27].

Τα μπαχαρικά δεν είναι μόνο πολύτιμα για την πρόσδοση γεύσης στα τρόφιμα. Η αντιοξειδωτική τους δράση βοηθά επίσης να παρατείνει την διάρκεια ζωής των τροφίμων τους [28]. Υπάρχει συνεχής αύξηση της έρευνας για το ρόλο τους ως φυσικά συντηρητικά. Τα αντιοξειδωτικά παίζουν επίσης ρόλο στην άμυνα του οργανισμού έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, ορισμένων (επιθηλιακών) καρκίνων και άλλες παθήσεις όπως η αρθρίτιδα και το άσθμα [27, 28].

## Γ.2. Το Πιπέρι

Το πιπέρι αποτελεί μια γενική ονομασία που περιλαμβάνει μπαχαρικά που παρασκευάζονται από τους αρωματικούς καρπούς διαφόρων φυτών. Τα είδη του πιπεριού είναι: το κοινό πιπέρι (άσπρο, μαύρο), το τσίλι, το πιπέρι καγιέν και το ταμπάσκο [2<sup>Α</sup>]. Το μαύρο πιπέρι είναι το πιο σημαντικό, πιο δημοφιλή και το πιο διαδεδομένο μπαχαρικό στο κόσμο, συχνά αναφέρεται και ως «ο Βασιλιάς των μπαχαρικών» [27, 28]. Από το σύνολο των μπαχαρικών που εξάγονται στο διεθνές εμπόριο το 34% ανήκει αποκλειστικά στο πιπέρι [28].

Το μαύρο πιπέρι ήταν το πρώτο μπαχαρικό που είχε εισαχθεί στο δυτικό κόσμο, και ήταν γνωστό και στους Ρωμαίους και στους Έλληνες. Η χρήση του πιπεριού οδήγησε σε επαναστατικές αλλαγές στο δυτικό τρόπο μαγειρέματος και μαζί με άλλα μπαχαρικά συνέβαλλαν στην βελτιώση της γεύσης και η συντήρηση των τροφίμων έγινε πιο εύκολη [28]. Η χαρακτηριστική του καυτερή και πικρή του γεύση οφείλεται στο αλκαλοειδές συστατικό του την πιπερίνη [27, 28]. Το πιπέρι χρησιμοποιείται όχι μόνο στην μαγειρική, αλλά και για άλλους σκοπούς όπως φαρμακευτικούς, ως συντηρητικό και στην αρωματοποιία [27,28].

Το μαύρο πιπέρι προέρχεται από την οικογένεια του φυτού *Piper nigrum Piperaceae* . Σε αυτήν την οικογένεια ανήκει το **μαύρο πιπέρι** (οι καρποί μαζεύονται λίγο πριν ωριμάσουν και απλώνονται στον ήλιο για να ξεραθούν), το **άσπρο πιπέρι**(οι καρποί μαζεύονται φού ωριμάσουν και μουςκεύονται για μερικές μέρες, ώστε να ξεφλουδίσουν και έπειτα ξηραίνονται) και το **πράσινο πιπέρι**(οι καρποί του μαζεύονται πολύ πριν ωριμάσουν και απλώνονται στον ήλιο για να ξεραθούν) [2<sup>Α</sup>,28].

Η νοτιοδυτική Ινδία είναι η περιοχή απ'όπου κατάγεται το μαύρο πιπέρι και καλλιεργείται, ιδιαίτερα οι Δυτικές Παράκτιες περιοχές της Νότιας χερσονήσου της Ινδίας (Malabar coast). Άλλες

περιοχές που καλλιεργείται το πιπέρι είναι η Ινδονησία, Μαλαισία, Σρι-Λάνκα, Ταϊλάνδη, Κίνα, Βιετνάμ και η Καμπότζη[28].

### Γ.3 Η Κανέλα

Η κανέλα είναι ένα από τα σπουδαιότερα μπαχαρικά στον κόσμο και η χρήση της είναι ήδη γνωστή από την αρχαιότητα [2<sup>A</sup>,29]. Οι πρώτες αναφορές στην κανέλα γίνονται σε κινέζικα βιβλία γύρω στο 3.000π.χ, ενώ στην Ελλάδα η κανέλα πρωτοαναφέρεται σε ποίημα της Σαπφούς τον 7<sup>ο</sup> αιώνα π.χ. Η κανέλα είχε βαρυσήμαντη αξία στην αρχαιότητα, ήταν δώρο κατάλληλο για μονάρχες και θεούς. Στην αρχαιότητα, η πηγή προέλευσης της κανέλας ήταν άγνωστη, κάτι που διατηρήθηκε και μέχρι το μεσαίωνα για να μην χαθεί το μονοπώλιο από τους μεσάζοντες εμπόρους [2<sup>A</sup>,29].

Τα χρησιμοποιούμενα μέρη του φυτού είναι ο εσωτερικός φλοιός, τα φύλλα και το αιθέριο έλαιο του. Ο φλοιός υπό μορφή κυλίνδρου ή ημικυλίνδρου και η σκόνη που γίνεται από το θρυμμάτισμα του φλοιού χρησιμοποιείται ευρέως στην ζαχαροπλαστική και στην μαγειρική [2<sup>A</sup>,29]. Οι φαρμακολογικές δράσεις της κανέλας αποδίδονται κυρίως στην κινναμαλδεΐδη, όπου η ουσία αυτή έχει ισχυρή αντιβακτηριακή και μυκητοκτόνο δράση, καθώς και αντιδιαβητική και αντιοξειδωτική δράση [2<sup>A</sup>,28,29].

Το γένος *Cinnamomum* περιλαμβάνει πάνω από 250 είδη, που αναπτύσσονται στις τροπικές περιοχές[2<sup>A</sup>, 28, 29]. Το *Cinnamomum verum*, η γνωστή κανέλα, είναι ιθαγενές φυτό της Σρι-Λάνκα και αναπτύσσεται στα τροπικά δάση σε υψόμετρο 500m. Το γένος *Cinnamomum verum* δεν ευδοκίμει μόνο στην Σρι-Λάνκα, αλλά καλλιεργείται εκτεταμένα σε όλες τις τροπικές περιοχές του κόσμου ιδιαιτέρως στις Φιλιππίνες, στις Δυτικές και Ανατολικές Ινδίες, στις Αντίλλες, την Ιάβα και την Σουμέρα της Ινδονησίας, τη Μαδαγασκάρη, την Βραζιλία και στην Αίγυπτο [2<sup>A</sup>,29].

#### Γ.4 Το Μοσχοκάρυδο

Το μοσχοκάρυδο προέρχεται από το αιθαλές δένδρο *Myristica fragans*, και συναντιέται στα νησιά Μολούκας, στην Ινδία και στα νησιά των μπαχαρικών, τα οποία θεωρούνται χώρα καταγωγής του [2<sup>Α</sup>,30]. Στην αρχαιότητα το χρησιμοποιούσαν σαν θυμίαμα και κατά την διάρκεια του μεσαίωνα ήταν ένα από τα πιο ακριβά μπαχαρικά. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ ενδεχομένως έχει και αντικαταθλιπτική δράση [30].

Από την σύνθλιψη του καρπού βγαίνει έλαιο που ονομάζεται βούτυρο του μοσχοκάρυδου, το οποίο χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική, στην σαπωνοποιία και στην αρωματοποιία [30]. Η χρήση του στην μαγειρική χρειάζεται προσοχή γιατί είναι τοξικό, θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε μικρές ποσότητες έως 3mg ημερησίως [30].

Άλλες παράγωγες χώρες του μοσχοκάρυδου είναι η Ινδία, Μαλαισία, Σρι-Λάνκα και κάποια νησιά της Καραϊβικής όπως του Αγίου Βικεντίου[2<sup>Α</sup>].

#### Γ.5 Το Γαρίφαλλο

Το γαρίφαλλο προέρχεται από τους ξηρούς οφθαλμούς του δένδρου *Eugenie Aromatica* ή *Caryophyllete*. Το μήκος του φθάνει τα 2cm και περιέχει ισχυρό έλαιο σε ποσοστό 25% [30]. Η γεύση του γαριφαλλού είναι δυνατή και χαρακτηριστικά καυστική [2<sup>Α</sup>,30]. Ήταν γνωστό στον αρχαίο κόσμο (κυρίως στην Αιγυπτο) το οποίο ήρθε στην Ευρώπη από Άραβες εμπόρους πριν το μεσαίωνα [2<sup>Α</sup>].

Το γαρίφαλλο είναι το μπαχαρικό με τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό [30]. Το αιθέριο έλαιο του, γνωστό ως γαριφαλέλαιο χρησιμοποιείται στην οδοντιατρική και στην αρωματοποιία [2<sup>Α</sup>,30]. Σήμερα το γαρίφαλλο καλλιεργείται κυρίως σε τροπικές χώρες

όπως στις Φιλιππίνες, Σουμάρα, Μαδαγασκάρη, την Τζαμαϊκά, τις Δυτικές Ινδίες, την Βραζιλία και τις Αντίλλες [2<sup>A</sup>].

## **Δ. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ**

### **Δ.1 Προσδιορισμός των αφλατοξινών**

Η ανίχνευση των αφλατοξινών παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον λαμβάνοντας υπόψη τις συνέπειες που επιφέρουν στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων η ύπαρξη τους στα τρόφιμα ή τις ζωοτροφές. Όταν οι έλεγχοι διεξάγονται με σκοπό να επιβεβαιωθεί η συμμόρφωση των προϊόντων με τα θεσμοθετημένα μέγιστα επιτρεπτά όρια είναι καθοριστικής σημασίας το τελικό αποτέλεσμα να εκφράζει την πραγματική τιμή για το λόγο αυτό οι μέθοδοι θα πρέπει να είναι επικυρωμένες [5]. Εάν δεν επιτυγχάνεται κάτι τέτοιο είναι δυνατό πολλά προϊόντα να απορρίπτονται χωρίς λόγο ή αντίστροφα, προβληματικές παρτίδες να γίνονται αποδεκτές δημιουργώντας κινδύνους στην υγεία και την ασφάλεια των καταναλωτών, καθώς επίσης και σοβαρές επιπτώσεις στην οικονομία και το παγκόσμιο εμπόριο [5].

Νομοθετικά (Καν.882/2004), στις γενικές απαιτήσεις για τις μεθόδους ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τροφίμων αναφέρεται ότι οι μέθοδοι ανάλυσης πρέπει να χαρακτηρίζονται από τα ακόλουθα κριτήρια:

- I. Ορθότητα
- II. Ευκολία εφαρμογής
- III. Όριο ανίχνευσης
- IV. Όριο προσδιορισμού
- V. Ακρίβεια (λαμβάνεται από εργαστηριακή δοκιμή)

VI. Επαναληψιμότητα

VII. Αναπαραγωγιμότητα

VIII. Ανάκτηση

IX. Επιλεκτικότητα

X. Ευαισθησία

XI. Γραμμικότητα

XII. Αβεβαιότητα.

Για την ανάλυση των αφλατοξινών στα τρόφιμα υπάρχουν διαθέσιμες στην βιβλιογραφία διάφορες μέθοδοι, καθώς και οι επίσημες μέθοδοι του AOAC (Association of the Official Analytical Chemists) [2,5,14,31]. Επιπλέον, είναι απαραίτητη η ανάπτυξη και επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που θα χρησιμοποιηθούν στον προσδιορισμό των αφλατοξινών λαμβάνοντας υπόψιν τα θεσμοθετημένα όρια [31].

Είναι επίσης αναγκαίο τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους με ποσοστά επίδοσης όπως απαιτούνται από την νομοθεσία (Καν 401/2006) [32].

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί αρκετά πρωτόκολλα προσδιορισμού, η χρήση των οποίων εξαρτάται από την υλικοτεχνική υποδομή που έχουν τα διάφορα εργαστήρια, τις οικονομικές τους δυνατότητες, τον χρόνο της ανάλυσης και την ευαισθησία τους [2,13]. Πριν από την τελική ανάλυση των τροφίμων για τον έλεγχο αφλατοξινών προηγούνται μία σειρά πολλών και σύνθετων λειτουργιών, στις οποίες περιλαμβάνονται: η δειγματοληψία, η προετοιμασία του δείγματος, η εκχύλιση των αφλατοξινών από το δείγμα, ο καθαρισμός του δείγματος [2,5,31,33].



### **Δ.1.1 Δειγματοληψία**

Η δειγματοληψία αφορά την επιλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος από το σύνολο της παρτίδας, στο οποίο θα γίνει και η ανάλυση. Η δειγματοληψία είναι το πιο σημαντικό στοιχείο της ανάλυσης δεδομένου ότι οι αφλατοξίνες είναι ανομοιόμορφα κατανεμημένες στα τρόφιμα [2]. Στον ευρωπαϊκό κανονισμό (ΕΚ 401/2006) που καθορίζεται ο τρόπος δειγματοληψίας για τον έλεγχο των αφλατοξινών στα τρόφιμα αναφέρεται επίσης ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα και ότι οι αφλατοξίνες κατανέμονται κατά τρόπο πολύ ανομοιογενή σε μια παρτίδα, ειδικότερα σε παρτίδα τροφίμων με σωματίδια μεγάλου μεγέθους όπως είναι τα κελυφωτά φιστίκια ή τα αράπικα φιστίκια [32].

### **Δ.1.2 Προετοιμασία δείγματος**

Τα στάδια για την προετοιμασία του δείγματος είναι η επιλογή των κατάλληλων τεμαχίων του δείγματος, η άλεση και η ομογενοποίηση της συνολικής ποσότητας των επιλεγμένων τεμαχίων, ώστε να προκύψει ομοιογενές υλικό [33]. Από το ομογενοποιημένο δείγμα λαμβάνεται μικρή ποσότητα για ανάλυση, αφού πρώτα ζυγιστεί [33].

### **Δ.1.3 Εκχύλιση**

Η εκχύλιση είναι ένα σημαντικό στάδιο στον προσδιορισμό των αφλατοξινών στα διάφορα υποστρώματα ή τρόφιμα [35]. Λόγω της διαφορετικής φύσης των προϊόντων που είναι δυνατό να επιμολυνθούν με αφλατοξίνες, δεν υπάρχει μία μοναδική μέθοδος κατάλληλη για όλα τα προϊόντα [34]. Η εκχύλιση υγρού-στερεού είναι μία από τις συνήθεις διαδικασίες στην ανάλυση αφλατοξινών σε γεωργικά προϊόντα [35]. Η εκχύλιση, κατά ένα μεγάλο μέρος εξαρτάται από τις

φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών που έχουν μολυνθεί με αφλατοξίνες και ουσιαστικά βασίζεται στη διαλυτότητα των αφλατοξινών σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες [34,35]. Για παράδειγμα, υλικά με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος και χρωστικές απαιτούν μία πιο εκλεκτική εφαρμογή, η οποία ακολουθείται από εκτεταμένες μεθόδους καθαρισμού για τον προσδιορισμό της αφλατοξίνης [34]. Ο διαλύτης θα πρέπει να είναι τέτοιος ώστε να εκχυλίζει μόνο αυτό που θέλουμε να αναλύσουμε -αφλατοξίνη- με την προσθήκη όσο το δυνατό λιγότερων χημικών ενώσεων, έτσι ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδραση τους στο τελικό στάδιο της ανάλυσης [35]. Για την εκχύλιση, χρησιμοποιούνται συνήθως οργανικοί διαλύτες ή μίγματά τους όπως ακετόνη, χλωροφόρμιο ή μεθανόλη, επειδή οι αφλατοξίνες είναι διαλυτές σε μετρίως ή ελαφρώς πολικούς διαλύτες [1<sup>A</sup>,34]. Επίσης, η χρήση μικρών ποσοτήτων νερού σε συνδυασμό με τους προαναφερόμενους διαλύτες υγραίνει το υπόστρωμα αυξάνοντας έτσι τη διείσδυση των οργανικών διαλυτών στο δείγμα άρα βελτιώνει την εκχύλιση της αφλατοξίνης [34]. Οι πιο συνήθεις διαλύτες για την εκχύλιση των αφλατοξινών σε διάφορα τρόφιμα είναι μίγματα χλωροφόρμιου-νερού, μεθανόλης- νερού, μεθανόλης-ακετονιτριλίου-νερού και ακετονιτριλίου νερού [2,13,35]. Ο διαλύτης μεθανόλη-νερό έχει το πλεονέκτημα ότι είναι λιγότερο τοξικός σε σχέση με τα μίγματα ακετονιτριλίου [13]. Σε τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, όπως τα κελυφωτά φιστίκια, αραχίδα (περισσότερο από 50%), συστήνεται η προσθήκη μη-πολικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, για τον διαχωρισμό του λίπους [31,34,35].

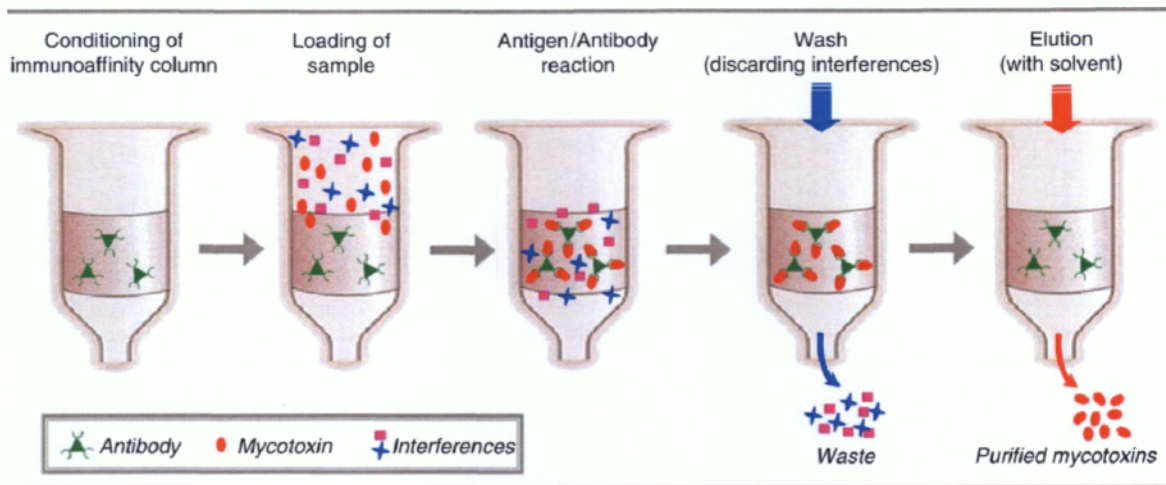
Σε τελευταίες δημοσιεύσεις αναφέρεται και η εκχύλιση με πεπιεσμένο υγρό ( Pressurized Fluid Extraction – PFE) με την εμπορική ονομασία εκχύλιση επιταγχνόμενου διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction – ASE) [35]. Σε αυτή χρησιμοποιούνται διαλύτες σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης εκχύλιση του αναλυτή από στερεά ή ημι-στερεά υποστρώματα με μικρές ποσότητες διαλυτών σε μικρότερο χρόνο [35]. Η αύξηση της

θερμοκρασίας κατά την εκχύλιση του αυξάνει την απόδοση λόγω του ότι μειώνεται το ιξώδες των οργανικών διαλυτών και αυξάνει η διαλυτική τους ικανότητα, αλλά εξασθενεί και η ισχυρή σύνδεση αφλατοξίνης-υλικού υποστρώματος [35]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οργανικός διαλύτης να διεισδύει περισσότερο στο υπόστρωμα και να βελτιστοποιείται η εκχύλιση [35]. Η αύξηση της θερμοκρασίας πρέπει να είναι μέχρι ενός κατάλληλου ορίου ώστε να μην μειωθεί η εκλεκτικότητα του διαλύτη και συμπαρασύρει και άλλες ουσίες [35]. Τα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έδειξαν διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης, όπως υψηλότερη απόδοση, χαμηλότερο όριο ποσοτικοποίησης και μικρότερο όγκο διαλύτη [35].

#### **Δ.1.4 Καθαρισμός**

Η διαδικασία καθαρισμού (clean-up) του δείγματος είναι ίσως το πιο σημαντικό στάδιο στην ανάλυση αφλατοξινών, αφού το εκχύλισμα που παραλαμβάνεται από το προηγούμενο στάδιο περιέχει εκτός από την ποσότητα αφλατοξίνης και πολλά άλλα συνεκχυλίσματα (coextractives) που προέρχονται από το φυσικό υπόστρωμα [33].

Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιούνται διαχωρισμοί υγρού-υγρού ή πιο πρόσφατα συσκευές εκχύλισης στερεής φάσης (solid phase extraction cartridges) και στήλες ανοσοσυγγένειας IAC (Immunoaffinity Columns) [5,13,34,36], Μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία είναι εξειδικευμένα για αφλατοξίνες ακινητοποιούνται επάνω σε πολυσακχαρίτες και στη συνέχεια ενσωματώνονται σε μικρές στήλες [5,36]. Η προς εξέταση τοξίνη συλλέγεται με έκλουση με κατάλληλο διαλύτη [13,31]. Έτσι, τα εκχυλίσματα από το δείγμα του τροφίμου περνούν μέσα από την στήλη και τελικά παραλαμβάνεται ένα εντελώς καθαρό εκχύλισμα ελεύθερο από άλλες ουσίες [5,13,31,36]



Εικόνα Δ.1.4 Βασικές αρχές λειτουργίας των στήλων ανοσοσυγγένειας [31]

Οι στήλες ανοσοσυγγένειας έχουν δείξει πολλά πλεονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε διάφορα τρόφιμα δεδομένου ότι δίνουν τη δυνατότητα μεγαλύτερων όγκων εκχυλίσματος του δείγματος με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου [5,36]. Επιπλέον, δεν είναι απαιτητικές όσον αφορά την ικανότητα και την εμπειρία που απαιτείται από τον χρήστη [5,36]. Ως μοναδικό μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος αφού είναι μιας και μοναδικής χρήσης [5].

Ο ρυθμός ροής του υγρού της εκχύλισης από τα διάφορα φίλτρα καθαρισμού είναι πολύ σημαντικός για την απόδοση της εκχύλισης και την παραλαβή όσο το δυνατό πιο καθαρής αφλατοξίνης. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο μειώνεται ο ρυθμός ροής και αυξάνει έτσι ο χρόνος του καθαρισμού, αυξάνεται η απόδοση της εκχύλισης λόγω του ότι ο χρόνος επαφής του διαλύτη και του υποστρώματος είναι μεγαλύτερος [35,36]. Το διάλυμα που εκχυλίζεται μετά τον καθαρισμό συλλέγεται και συμπυκνώνεται για την περαιτέρω ανάλυση [33-34]

## **Δ.2 Μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξίνων**

### **4.2.1. TLC**

Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας TLC (Thin layer chromatography) είναι μια τεχνική που έχει ως σκοπό το διαχωρισμό μιγμάτων ουσιών στα συστατικά τους με βάση την κατανομή των συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μια στατική και μια κινητή. Τα συστατικά του μίγματος μετακινούνται με την βοήθεια της κινητής φάσης πάνω στην ακίνητη και έτσι προκαλείται ο διαχωρισμός τους [37]. Η TLC είναι η πρώτη τεχνική που αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως μέθοδος ανίχνευσης των αφλατοξίνων [2,5,13], και είχε προταθεί ως επίσημη μέθοδος από τον AOAC [38]. Η TLC είναι μία απλή, γρήγορη, εξαιρετικά ευαίσθητη μέθοδος και δεν απαιτεί πολύπλοκο εξοπλισμό [37]. Παρ' όλα αυτά μετά την ανακάλυψη της υγρής χρωματογραφίας, η χρήση T.L.C. αντικαταστάθηκε και από το 1991 δεν θεωρείται ως επίσημη μέθοδος από τον AOAC. Εντούτοις, η χρήση της TLC ανεπίσημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική [2,5,13] ή ως γρήγορη μέθοδος (rapid method).

### **Δ.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης - H.P.LC (High Performance Liquid Chromatography)**

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης (H.P.L.C.) είναι η σημαντικότερη εξέλιξη στην τεχνική της χρωματογραφικής ανάλυσης [33]. Η HPLC είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα HPLC που φθάνουν τα εκατομμύρια δολάρια. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της και η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς [39]. Στην HPLC η κινητή φάση είναι υγρό ενώ η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια στερεού υλικού πλήρωσης πολύ μικρής

διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντίστασης [33]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι πλέον, όλες οι σύγχρονες μέθοδοι ανάλυσης αφλατοξινών γίνονται με HPLC, καθώς οι αναλύσεις με HPLC είναι και επίσημες μέθοδοι και από τον AOAC [2,5,13,31,34,35,39].

### **Δ.3.1 Οργανολογία HPLC**

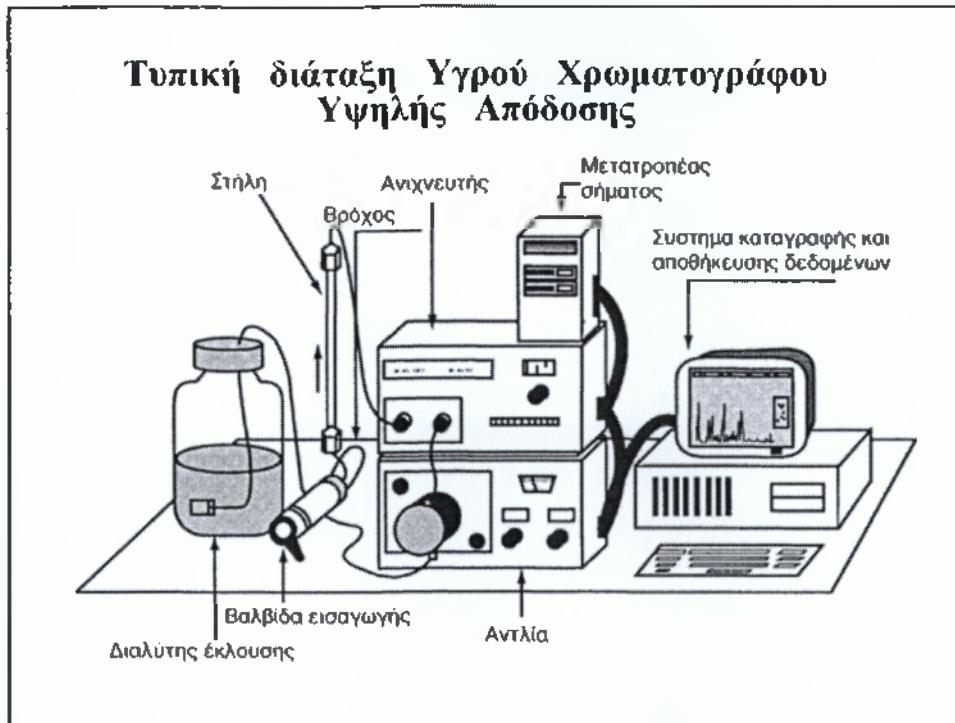
Μία τυπική διάταξη HPLC περιλαμβάνει [33,39]:

01. Φιάλες κινητής φάσης
02. Αντλία υψηλής πίεσης
03. Εισαγωγέας δείγματος
04. Χρωματογραφική στήλη
05. Ανιχνευτής
06. Σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων.

Η εικόνα Δ.2 απεικονίζει διαγραμματικά τα κυριότερα μέρη μιας διάταξης HPLC



### Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Απόδοσης



Το δείγμα εισάγεται κάθε φορά από τον εισαγωγέα δείγματος. Στα σύγχρονα όργανα υπάρχει αυτόματος δειγματολήπτης δίνοντας την ευκαιρία για πολλές και διαφορετικές αναλύσεις όλο το 24ωρο. Στις φιάλες αποθήκευσης διαλυτών βρίσκονται οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται κάθε φορά για την έκλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών, δηλαδή αποτελούν την κινητή φάση [33,39]. Η κινητή φάση προωθείται με τη βοήθεια μιας αντλίας υψηλής πίεσης στη χρωματογραφική στήλη, όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ουσιών [39]. Οι ουσίες μετά την έκλυσή τους από την στήλη της HPLC οδηγούνται σε ένα σύστημα ανίχνευσης [39]. Το σήμα που δίνουν στον ανιχνευτή οι προσδιοριζόμενες ουσίες καταγράφεται από ένα σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων και λαμβάνεται τελικά το χρωματογράφημα [39].

Από τα εξαρτήματα των διατάξεων της HPLC που προαναφέρθηκαν, σημαντικότερο ρόλο για την ανίχνευση των αφλατοξινών είναι το σύστημα ανίχνευσης και πιο συγκεκριμένα οι ανιχνευτές.

Τα πρώτα χρόνια εφαρμογής της μεθόδου χρησιμοποιούνταν η HPLC κανονικής φάσης (normal phase) με σύστημα ανίχνευσης για απορρόφηση στο UV. Γρήγορα αποδείχθηκε ότι δεν ήταν ικανοποιητική για τον προσδιορισμό αφλατοξινών σε επίπεδα νανογραμμαρίων (ng) [34]. Λόγω του ότι οι αφλατοξίνες φθορίζουν, ένα σύστημα φθορισμομετρικής ανίχνευσης θεωρήθηκε καταλληλότερο, αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου [34]. Ένα όμως από τα πιο σημαντικά προβλήματα είναι η εξάρτηση της ικανότητας φθορισμού των κυρίων αφλατοξινών (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) από την σύσταση του διαλύτη [34]. Η NP-HPLC από την δεκαετία του '70 σταμάτησε να χρησιμοποιείται, μετά την ανάπτυξη της χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης, λόγω μειωμένης επαναληψιμότητας των χρόνων συγκράτησης όταν το νερό ή οργανικοί διαλύτες μεταβάλλουν την υγρασία του υλικού πλήρωσης της στήλης (silica ή alumina). Σήμερα, η HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας και πολλές φορές αναφέρεται απλά ως HPLC χωρίς να επεξηγείται ιδιαίτερα. Η RP-HPLC αποτελείται από μία μη-πολική στατική φάση (συνήθως silica στο οποίο έχει εφαρμοστεί RME<sub>2</sub>SiCl, όπου R είναι αλκύλιο όπως C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> ή C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) και μία υδατική μέτρια πολική κινητή φάση. Το σύστημα RP-HPLC αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδο λόγω της ευκολίας στο χειρισμό και της μικρότερης τοξικότητας των διαλυτών που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση [34].

#### **Δ.4. Παραγωγοποίηση**

Συνεπώς μετά την επικράτηση της HPLC ανάστροφης φάσης (RP-HPLC) η ανάλυση αφλατοξινών πραγματοποιείται με κινητή φάση μεθανόλης-νερού ή ακετονιτρίλιου-νερού ή μίγματος νερού-ακετονιτρίλιου-μεθανόλης σε ορισμένη αναλογία [34]. Όμως, σε αυτούς τους υδατικούς διαλύτες, ο φθορισμός της B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> αφλατοξίνης είναι χαμηλός με αποτέλεσμα να χρειάζεται μία μέθοδος

μετατροπής των B<sub>1</sub> και G<sub>1</sub> στα ισχυρώς φθορίζοντα υδροξυλιωμένα παράγωγά τους B<sub>2a</sub> και G<sub>2a</sub> [34]. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **παραγωγοποίηση** [34].

Διάφορες μέθοδοι παραγωγοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί και ερευνηθεί ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Αρχικά, το 1977 περίπου, η παραγωγοποίηση γίνονταν πριν το έκλουσμα εισαχθεί στη στήλη (pre-column derivatization) με την προσθήκη ισχυρών οξέων όπως το τριφθοροοξικό οξύ (trifluoroacetic acid – TFA)[34]. Αργότερα, το 1978 η μέθοδος παραγωγοποίησης με το TFA χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό αφλατοξινών σε μια σειρά προιόντων και το 1980 επεκτάθηκε και για τον προσδιορισμό της M1 αφλατοξίνης στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προιόντα [34]. Όμως, η χαμηλή σταθερότητα των B<sub>2a</sub> και G<sub>2a</sub> παραγώγων στη μεθανόλη (διαλύτη της κινητής φάσης) θεωρήθηκε βασικό μειονέκτημα της μεθόδου και αντικαταστάθηκε από μεθόδους παραγωγοποίησης μετά την είσοδο του εκλούσματος στη στήλη (post-column derivatization) [34]. Επιπλέον, με την αυτοματοποίηση του συστήματος της HPLC, οι μετα-τη στήλη μέθοδοι παραγωγοποίησης προτιμώνται λόγω της μείωσης των απαιτούμενων χειρισμών για κάθε δείγμα [34].

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες post-column μέθοδοι παραγωγοποίησης με οξειδωτικά όπως ιώδιο και βρώμιο [34]. Η μέθοδος παραγωγοποίησης με ιώδιο έγινε αποδεκτή ως επίσημη μέθοδος από τον AOAC.

#### **Δ.5. Ανιχνευτές**

Ένας ανιχνευτής HPLC, ανεξάρτητα, από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληρεί κάποιες προϋποθέσεις[39].

- ⇒ Χαμηλό επίπεδο θόρυβου
- ⇒ Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
- ⇒ Μικρός χρόνος απόκρισης
- ⇒ Μικρός νεκρός όγκος (να μη συνεισφέρει στη διεύρυνση των κορυφών)
- ⇒ Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής
- ⇒ Σταθερότητα σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης
- ⇒ Αξιοπιστία και ευκολία στην χρήση
- ⇒ Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους
- ⇒ Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος.

Ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των αφλατοξινών με χρήση της HPLC:

- I. **Ανιχνευτής ορατού – υπεριώδους (UV-Vis)**. Μετρά την απορρόφηση των ουσιών σε διάφορα μήκη κύματος του υπεριώδους και του ορατού. Είναι ευαίσθητος στην περιοχή  $10^{-6}$  έως  $10^{-10}$  g/mL για αρκετές ενώσεις [33,39]
- II. **Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector)**. Μετρά την φθορίζουσα αντινοβολία των ουσιών ή των φθορίζόντων παράγωγων τους. Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δεν φθορίζουν [33,39]. Συνδυάζονται με συστήματα παραγωγοποίησης στις περιπτώσεις εκείνες που οι προς ανάλυση ουσίες δεν φθορίζουν.

## Δ.6 Φασματογράφος Μάζας (mass spectrometer)

Το φασματόμετρο μαζών είναι ένα όργανο που διαχωρίζει ταχέως κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο μάζας προς φορτίο,  $m/z$  [39]. Τα κύρια τμήματα από τα οποία αποτελείται ένας φασματογράφος μάζας είναι τα εξής:

- I. Στόμιο εισαγωγής
- II. Πηγή ιόντων
- III. Αναλυτής μαζών
- IV. Μεταλλάκτης ιόντων
- V. Επεξεργαστής σήματος
- VI. Φάσμα μαζών.

Ο ρόλος του σημείου εισόδου (στόμιο εισαγωγής) είναι η εισαγωγή μικροποσότητας δείγματος στην πηγή ιόντων, όπου οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε εκνέφωμα ιόντων μετά από βομβαρδισμό τους με ηλεκτρόνια. Εναλλακτικά ο ιονισμός μπορεί να επιτευχθεί με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια [39]. Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών (συνχότερα) ή αρνητικών ιόντων σε αέρια κατάσταση, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλύτη μαζών [39].

Ο ρόλος του αναλυτή μαζών είναι ανάλογος με αυτόν του μονοχρωμάτορα στα οπτικά φασματόμετρα. Ωστόσο στον πρώτο η διασπορά βασίζεται στο λόγο μάζας προς φορτίο των ιόντων του αναλυτή και όχι στο μήκος κύματος των φωτονίων [39]. Επίσης ένα φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνει έναν μεταλλάκτη που μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο

μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία, να αποθηκευτεί στην μνήμη ενός ηλεκτρονικού υπολογιστή και να παρουσιαστεί και να καταγραφεί με διάφορους τρόπους [39]. Τα φασματόμετρα μάζων απαιτούν ένα πολύπλοκο σύστημα παραγωγής κενού για διατήρηση της πίεσης σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλα τα τμήματα του, εκτός από το τμήμα επεξεργαστή σήματος και το σύστημα ανάγνωσης και καταγραφής [39].

Υπάρχουν 2 τύποι φασματομέτρων :

**I. Το φασματόμετρο μαζών τετραπόλου (Quadrupole mass spectrometry) [39,40].** Το QMS είναι ο συνηθέστερος τύπος φασματόμετρου μαζών. Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, μικρότερο κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότερο από τους περισσότερους τύπους φασματομέτρων μαζών [39]. Επίσης έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης ώστε ολόκληρο το φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100ms [39]. Καρδιά του τετραπολικού φασματόμετρου μαζών είναι οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικοί ράβδοι οι οποίες δρουν σαν ηλεκτρόδια [39]. Έτσι στον μεταλλάκτη φτάνουν μόνο τα ιόντα, των οποίων οι τιμές  $m/z$  βρίσκονται σε στενή περιοχή τιμών του λόγου  $m/z$ . Με τα τετραπολικά ιόντα μπορούν εύκολα να διακριθούν ιόντα, που διαφέρουν κατα μία μονάδα μάζας [39].

**II. Το φασματόμετρο μαζών χρόνου πτήσης (Time of flight mass spectrometry) [39,40].** Στα όργανα τύπου πτήσης TOF τα θετικά ιόντα παράγονται περιοδικά μετά από βομβαρδισμό του δείγματος με σύντομους παλμούς ηλεκτρονίων, δευτερογενών ιόντων ή φωτονίων ακτινοβολίας λέιζερ [39]. Οι τυπικοί χρόνοι πτήσης των σωματιδίων κυμαίνονται από 1 έως 30μs [39]. Από άποψη διακριτικής ικανότητας και επαναληψιμότητας τα όργανα που



χρησιμοποιούν αναλυτές χρόνου πτήσης, δεν παρέχουν τόσο ικανοποιητικά αποτελέσματα όσο τα όργανα στα οποία χρησιμοποιούνται τετράπολα [39]

## **E. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΑΝΑΛΥΣΗΣ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

### **E.1. Πλεονεκτήματα της Υγρής Χρωματογραφίας- Φασματομετρίας Μάζας.**

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με το φασματογράφο μάζας έχει διαδραματίσει ένα ζωτικής σημασίας ρόλο στην ανίχνευση των αφλατοξινών στα διάφορα τρόφιμα [40-46]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι είναι η ταχύτερη μέθοδος για την ανίχνευση και την ανάλυση των αφλατοξινών [40-46]. Αν και η τεχνική αυτή απαιτεί έμπειρο προσωπικό και πολύ υψηλό κόστος, δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα για την ανίχνευση των αφλατοξινών σε πολύ χαμηλές τιμές (1 έως 10pg).

Παρόλα αυτά η σημαντική αυτή εξέλιξη δε συνέβη μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του 1990. Συγκρινόμενη με τις κλασσικές χρωματογραφικές μεθόδους ανίχνευσης όπως UV, η φασματοσκοπία μάζας μπορεί να προσφέρει αυξημένη ευαισθησία και επιλεκτικότητα (αν και ο ανιχνευτής φθορισμού μπορεί να είναι πολύ πιο ευαίσθητος για τις αφλατοξίνες) [40-46]. Επιπροσθέτως είναι δυνατό να διερευνήσει τη μοριακή δομή μεταβολιτών (κρυμμένες μυκοτοξίνες-masked mycotoxins) και να παρακάμψει τελείως τα στάδια της παραγωγοποίησης και του καθαρισμού που είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και ελλοχεύουν κινδύνους για εργαστηριακά λάθη [40].

Η HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτή μάζας τετραπόλου έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα γιατί διακρίνεται από το μεγάλο βαθμό ευαισθησία της σε σχέση με τον φασματογράφο μάζας ατομικής πτήσης, επίσης ο χρόνος της ανάλυσης είναι ιδιαίτερα σύντομος [40]. Αξίζει να αναφερθεί, ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να ανιχνεύσει και άλλους ομάδες μυκοτοξινών που μπορεί να υπάρχουν στα διάφορα τρόφιμα με ένα απλό χρωματογράφημα [40-46].

Στον Πίνακα Ε.1 παρατηρούμε τα ερευνητικά αποτελέσματα για την ανίχνευση αφλατοξινών σε μπαχαρικά και ξηρούς καρπούς όπως αυτά δημοσιεύτηκαν σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά (Food Control, Food Additives and Contaminants, Rapid Communications in Mass Spectrometry, κα). Από τα αποτελέσματα αυτά βλέπουμε ότι για την ανίχνευση αφλατοξινών χρησιμοποιείται κυρίως η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φθορισμό και παραγωγοποίηση μετά τη στήλη. Η διακύμανση των επιπέδων αφλατοξινών ποικίλει ανά υπόστρωμα (κελυφωτά φυστίκια, φουντούκια, αράπικα φυστίκια, πιπέρι, πάπρικα, κλπ). Αξιοσημείωτη είναι η ανίχνευση αφλατοξινών στα επίπεδα 2500μg/Kg (AFB1) και 4320μg/Kg (AFTotal) σε καρύδια. Οι τιμές αυτές είναι υπερβολικά μεγάλες, τόσο που και η απλή επαφή ή εισπνοή της σκόνης από τα καρύδια αυτά θα μπορούσε να προκαλέσει αφλατοξίκωση και να οδηγήσει στο θάνατο. Όπως προαναφέρθηκε, η σωστή δειγματοληψία παίζει σπουδαίο ρόλο στην ανίχνευση και στον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών. Θα πρέπει να τονιστεί ότι τα επίπεδα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού διαφέρουν ανάλογα με το υπόστρωμα, ιδιαίτερα στους ξηρούς καρπούς. Η περιεκτικότητά τους σε έλαια καθορίζει και τον τρόπο προετοιμασίας του δείγματος (μείγμα διαλυτών εκχύλισης, κλπ). Επίσης η παραγωγοποίηση με φωτοχημική μέθοδο (λάμπα UV=254nm) αντί για την κλασική μέθοδο με διάλυμα ιωδίου ή βρωμίου αρχίζει και προτιμάται από πολλά ερευνητικά εργαστήρια καθώς και εργαστήρια επίσημου ελέγχου. Ακόμα, στις περισσότερες περιπτώσεις ανίχνευσης αφλατοξινών σε μπαχαρικά προτιμάται η χρησιμοποίηση ανοσοστηλών

για την προετοιμασία του δείγματος καθώς η φύση των χρωστικών των μπαχαρικών παρεμποδίζει το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των μυκοτοξινών. Αντίθετα, η απομάκρυνση των χρωστικών είναι αδιάφορη στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με διπλή συστοιχία μαζών (LC-MS/MS). Στις περιπτώσεις αυτές προτιμάται η ανάπτυξη μεθόδων QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) έστω και αν τα επίπεδα ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού είναι ελαφρώς υψηλότερα.

**Πίνακας Ε.1:** Αποτελέσματα από την ανίχνευση αφλατοξινών σε μπαχαρικά και ξηρούς καρπούς.

ΠΡΟΪΟΝ	ΤΕΧΝΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	Αναφορά
Αράπικα φυστίκια (v=20)	HPLC-FLD with post column derivatization	AFB1= 0.006	AFB1= 0.02	Επιμόλυνση σε 5% Μέγιστα επίπεδα: 0.17μg/Kg AFB1 και 0.30μg/Kg AFTotal	41
Κελυφωτά φυστίκια (v=20)		AFB2= 0.015 AFG1= 0.006 AFG2= 0.015	AFB2= 0.05 AFG1= 0.02 AFG2= 0.05	Επιμόλυνση σε 45% Μέγιστα επίπεδα: 1430μg/Kg AFB1 και 1450μg/Kg AFTotal	
Καρύδια (v=20)				Επιμόλυνση σε 30% Μέγιστα επίπεδα: 2500μg/Kg AFB1 και 4320μg/Kg AFTotal.	
Κελυφωτά φιστίκια (v=32)	HPLC-FLD with post column photochemical derivatization	Each Aflatoxin: 0,04	Each Aflatoxin: 0,1	Επιμόλυνση σε 34% Μέγιστα επίπεδα: AFB1 0,29μg/kg και AFB2: 0.14μg/kg	42

Πάπρικα (n=70)	HPLC-FLD with precolumn derivatization with TFA	AFB1= 0.09 AFB2= 0.09 AFG1= 0.14 AFG2= 0.14	AFB1= 0.23 AFB2= 0.23 AFG1= 0.45 AFG2= 0.45	Επιμόλυνση σε 82.9%  Μέγιστα επίπεδα: AFB1 7.0µg/kg και AFtotal: 7.3µg/kg	43
Πιπέρι (n=15)	LC-MS/MS	AFB1= 0.85 AFB2= 1.3 AFG1= 1.5 AFG2= 1.7	AFB1= 1.7 AFB2= 2.7 AFG1= 3.0 AFG2= 3.3	Επιμόλυνση σε 60%  Μέγιστα επίπεδα: AFB1 4.0µg/kg και AFtotal: 4.6µg/kg	40
Κελυφωτά φυστίκια (n=50)	HPLC-FLD with post column photochemical derivatization	AFB1= 0.23 AFB2= 0.075 AFG1= 0.23 AFG2= 0.075	AFB1= 0.7 AFB2= 0.23 AFG1= 0.7 AFG2= 0.23	Επιμόλυνση σε 10%  Μέγιστα επίπεδα: AFB1 1037.31µg/kg και AFtotal: 1134.53µg/kg	44
Κάστανα (n=51)	LC-MS/MS	AFB1= 0.04 AFB2= 0.02 AFG1= 0.04 AFG2= 0.02	AFB1= 0.10 AFB2= 0.06 AFG1= 0.10 AFG2= 0.05	Επιμόλυνση σε 53%  Μέγιστα επίπεδα: AFB1 50µg/kg και AFtotal: 188.78µg/kg	45
Τσίλι πιπεριές (n=80)	HPLC-FLD with post column photochemical derivatization	AFB1= 0.02 AFB2= 0.02 AFG1= 0.1 AFG2= 0.05	AFB1= 0.06 AFB2= 0.06 AFG1= 0.3 AFG2= 0.15	Επιμόλυνση σε 65%  Μέγιστα επίπεδα: AFB1 56.61µg/kg και AFtotal: 79.7µg/kg	46



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Grain Fungal Diseases & Mycotoxins Reference, United States Department of Agriculture, Grain Inspection, Packers & Stockyards Administration September 2006.
2. Carlo Brera, Barbara De Santis, Francesca Debegnuch and Marina Miraglia (editors 2008), chapter 12, Mycotoxins, Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 51, Elsevier B. V.
3. Patricia A. Murphy, Suzanne Hendrich, Cindy Landgren and Cory M. Bryant (editors 2006) «Food Mycotoxins an update», Journal of Food Science 71, p.61-65
4. FAO (Rome 2011). Manual of the application of the HACCP system in Mycotoxins prevention and control.
5. Isabel Arranz Hernandez «Development and validation of analytical Methods for Mycotoxins in Food» Medicinal Herbs and Feed (Bonn 2009)
6. Frisvad G. Jens, Trane VLF, Samson A.Robert and John I. Pitt (editors 2006), chapter 1, «Important mycotoxins and the fungi which produce them», volume 571, « Advances in Food Mycology», Springer.
7. Scott E. Baker and Joan W. Bennett (editors 2008), « An overview of the Genus Aspergillus» chapter 1, p. 3-14, Gustavo H. Goldman & Stephen A. Osmani «The Aspergilli» Mycology, 26, CRC press.



8. Μαρκογλού Α. « Μυκοτοξικογόνοι μύκητες και Μυκοτοξίνες, Τοξικολογικοί κίνδυνοι και μέθοδοι ελέγχου και αντιμετώπισης». Ε.Ε.Χ, Ημερίδα:Νέες τάσεις στο χώρο της Χημείας τροφίμων/Metropolitan Expo (20/03/2010)
9. Ειρήνη Λιόλιου « Μελέτη της επίδρασης ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων στην συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα», Μεταπτυχιακή μελέτη ΓΠΑ, Τμήμα Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων, Αθήνα 2009
10. Jiujiang Yu, Garry A. Payne, Bruce G. Cambell, Baozhu Guo, Thomas E. Cleveland, Jane F. Robens, Nancy P. Keller, Joan W. Bennett and William C. Nierman (editors 2008), «Mycotoxin Production and Prevention of Aflatoxins Contamination in Foods and Feeds», chapter 27, p.457-472, Custavo H. Goldman & Stephen A. Osmani «The Aspergilli», Mycology, 26, CRC press
11. Σφακιωτάκης Ευαγγελος, «Μετασυλλεκτική Φυσιολογία & Τεχνολογία Νωπών Οπωροκηπευτικών Προϊόντων», Εκδόσεις Τυρο Man, Θεσσαλονίκη 1995
12. The Rapid Alert System For Food and Feed (RASFF) Annual Report 2009
13. Carlo Brera and Marina Miraglia, «Determination of Mycotoxins in Grains and Related Products», chapter 12, p.493-507, «Mycotoxins»
14. Joao Augusto, Wilson M. David, «Development of a screening method for the determination of Aflatoxins» Master of Science, Athens, Georgia 2004
15. Κανονισμός ( ΕΚ) αριθμ. 1881/2006 της επιτροπής της 19<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 2006 «για καθορισμό μεγίστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες οι οποίες επιμολύνουν τα τρόφιμα»

16. Egmont van H.P and Jonker M.A ( editors 2004), chapter 3, p.49-65, «Current regulations governing mycotoxins limits in food», Magan N. and Olsen M., «Mycotoxins in Food Detection and Control», CRC
17. Food and Agriculture Organization (2004), «Worldwide regulationd For mycotoxins in Food and feed 2003», FAO Food and Nutrition Paper, 81, FAO of the United Nation , Rome, Italy
18. Amaralaradjou Mary Anne Roshni and Venkitanarayanan Kumar (editors 2008), chapter 10, p.225-236, «Detection of Penicilium, Aspergillus and Alternaria Species in Fruits and Vegetables», Golan-Barkai Rivka and Paster Nachman, «Mycotoxins in Fruits and Vegetables», Elsevier
19. Raper B. Kenneth and Fennel I. Dorothy «The Gennus Aspergillus», The Williams & Wilkings Co., Baltimore, U.S.A. (1965)
20. Payne A. Garry, Yu Jiujiang Yu, Nierman C. William, Machida Masayuk Bhatnagar, Thomas E. Cleveland and Ralph A. Dean (editors 2008), «A First glance into the Genome Sequence of Aspergillus Flavus», chapter 2, p.15-23, Gustavo H Goldman & Stephen A. Osmani, «The Aspergilli», Mycology 26, CRC press
21. Barry J. Blaney, «Mycotoxins in crops grown in differrent climatic region of Queensland», Trichothecenes and other Mycotoxins, Edited by J. Lacey, chapter 9, p 97-108
22. Μπαλατσούρας Γιώργος , «Μικροβιολογία Τροφίμων» Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα 2006
23. Καραμπέτσος Χ. Ιωαννης, «Σημειώσεις του μαθήματος Ανατομίας και Μορφολογίας Φυτών» Α.Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας 2003

24. Πετροπούλου –Καραγιαννοπούλου Σμαραγδή, «Σημειώσεις του μαθήματος Ειδικής Δενδροκομίας II» Α.Τ.Ε.Ι Καλαμάτας 2005
25. Ποντίκης Κ. Α. , «Ειδική Δενδροκομία», Τόμος Δεύτερος, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα 1996
26. Αλεξόπουλος Α. Αλέξιος, «Σημειώσεις απο τις παραδόσεις του μαθήματος Ειδικής Γεωργίας II του Δ' εξαμήνου του τμήματος Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων» Α.Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας 2007
27. Parthasarathy V.A, Chempakam B. and T. John Zacharian, «Chemistry of spices», Cabi, India 2008
28. Peter K.V.C, «Handbook of Herbs and Spices», CRC press, England 2008
29. Μυλωνά Δώρα, Κουρέρη Κατερίνα, «Κανέλλα: Ανασκόπηση των ιδιοτήτων της και Υπογλυκαιμική δράση», Αθήνα
30. Κάρου Ειρήνη, « Ο μαγικός κόσμος των μπαχαρικών», Bionews magazine, Τεύχος Ιανουαριού 2011
31. Dragacci, « Mycotoxins» , p.124-133.Elsiever 2005
32. Κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 401/2006 της επιτροπής της 23<sup>ης</sup> Φεβρουαρίου 2006 «για καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης τροφίμων για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξίνων στα τρόφιμα»

33. Αρβανιτογιάννης Σ.Ι., Βαρζάκας Χ.Θ., Τζίφα Ν.Κ, «Έλεγχος Ποιότητας Τροφίμων», Εκδόσεις Α.Θ. Σταμούλης, Αθήνα 2008
34. Jaimez J, G.A. Fente, Vazquez B.I, Franco C.M, Cepeda A., Mahuzier C, Prognon P, «Application of the assay of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorence Detection in Food Analysis», Journal of Chromatograpy A, 882, p. 1-10. 2000
35. Sheibani Ali, Ghaziaskar S. Hassan «Pressurized Fluid Extraction For guantitative recovery of Aflatoxins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> from pistachio», Food Control 20, p.124-128
36. Senyava J. Hamide, Gilbert John, «Immunoaffinity columm clean-up techigues in Food Analysis», Journal of Chromatography B, 878, p.116-124
37. Καπόλος Δ. Ιωάννης «Σημειώσεις του μαθήματος Φυσικοχημική και Ενόργανη Ανάλυσης φυτικών προϊόντων» Α.Τ.Ε.Ι Καλαμάτας 2005
38. AOAC Official Method 971.22 «Standars For Aflatoxins-Thin Layer Chromatographic Methods» M.1 First Action 1981, Final Action 1998, 49.2. 03
39. Skoog A. Douglas, Holler James F., Nieman A. Timothy, «Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης», Εκδόσεις Κωσταράκη, 5<sup>η</sup> Έκδοση, Αθήνα 2002
40. S. Monbaliu, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, K. Van Poucke, K. Heungens, S. De Saeger, «Development of a multi-mycotoxin liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for sweet pepper analysis» Rapid Commun. Mass Spectrom. 23, 3-11, 2009

41. C. Juan, A. Zinedine, J. C. Molto, L. Idrissi, J. Manes, «Aflatoxins levels in dried Fruits and nuts From Rabat –Sale Area, Morocco», Food Control 19, 849-853, 2008
42. Agustin Arino, Marta Herrera, Gloria Estopanan, M<sup>a</sup> Carmen Rota, Juan Jose Carraminana, Teresa Juan, Antonio Herrera «Aflatoxins in bulk and pre packed pistachios sold in Spain and effect of Roasting», Food Control 20, 811-814, 2009
43. Luzia Shundo, Andriana P de Almeida, Janette Alaburda, Leda CA Lamardo, Sandra A Navas «Aflatoxins and Ochratoxin A in Brazilian paprika» Food Control 20, 1099-1102, 2009
44. Fernane F., Cano-Sancho G, Sanchis V., Marin S., Ramos AJ «Aflatoxins and ochratoxin A in pistachios sampled in Spain: occurrence and presence of mycotoxigenic fungi» Food Additives and Contaminants Part B 3, 185-192, 2010
45. Amedeo Pietri, Silvia Rastelli, Annalisa Mulazzi, Terrenzio Bertuzzi «Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts produced in Italy» Food Control 25, 601-606, 2012
46. M. Jalili, S. Jinap «Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chilli» Food Control 24, 160-164, 2012

## ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1A. [http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem\\_afatoxins.htm](http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_afatoxins.htm)

2A. <http://www.wikipedia.org/>

3A. [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm)

4A. <http://www.livepedia.gr/index.php/Ακρόδραα>

5A. <http://www.agrotypos.gr/index.asp?mod=articles&id=4702>

6A. [http://www.iobe.gr/index.asp?a\\_id=46](http://www.iobe.gr/index.asp?a_id=46)

7A. <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=en&item=223&year=2005>