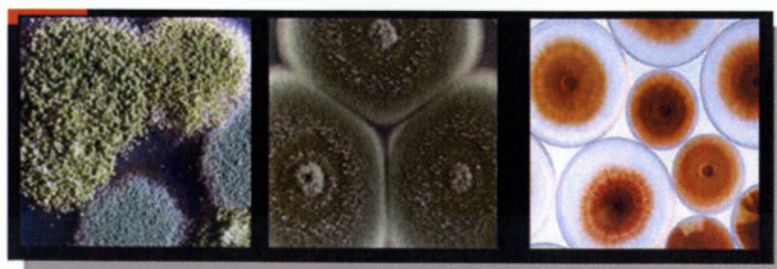


**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Α.Τ.Ε.Ι.) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**  
**ΚΑΡΑΜΠΑΤΣΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

**ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**  
**<<ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ>>**



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2012**

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Α.Τ.Ε.Ι.) ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΚΑΡΑΜΠΑΤΣΟΥ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ**

**ΘΕΜΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ  
<<ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ>>**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΑΠΟΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ**

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2012**

**Αφιερώνεται στη μητέρα μου Αλεξάνδρα**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

**Με την παρούσα τις βαθιές μου ευχαριστίες εκφράζω στους**

- **Παναγιώτη Κάτσαρη, Γεωπόνο, Βιοτεχνολόγο**
- **Ιωάννη Καπόλο, καθηγητή ΑΤΕΙ Καλαμάτας**
- **Λάμπρο Φαρμάκη, Επιστημονικό Συνεργάτη ΑΤΕΙ Καλαμάτας**
- **Αγγελική Χρονοπούλου, Χημικό, ΚΕΠΥΕΛ Καλαμάτας**

**οι οποίοι, με την επικουρική τους συμμετοχή, συνέβαλλαν στην αρτιότητα της εργασίας αυτής.**



## Περιεχόμενα

|   | Σελίδα |
|---|--------|
| <b>Εισαγωγή</b>   | 7      |
| <b>Κεφάλαιο 1:</b>  |        |
| <b>Γενικά περί μυκοτοξινών</b>  | 8      |
| 1.1 Ιστορική αναδρομή   | 8      |
| 1.2 Ορολογία μυκοτοξινών  | 9      |
| 1.3 Παραγωγή μυκοτοξινών  | 12     |
| 1.4 Μύκητες και τοξίνες   | 14     |
| <b>Κεφάλαιο 2:</b>  |        |
| <b>Κίνδυνοι και προστασία ελαιολάδου</b>                                    | 18     |
| 2.1 Κίνδυνοι που απειλούν το ελαιόλαδο                                      | 18     |
| 2.2 Προστασία της ασφάλειας του ελαιολάδου                                  | 19     |
| 2.3 Επικίνδυνες ουσίες  | 19     |
| 2.4 Φυσικοί και χημικοί κίνδυνοι  | 20     |
| 2.5 Διαχείριση ακατάλληλων προϊόντων  | 23     |
| <b>Κεφάλαιο 3:</b>  |        |
| <b>Κύριες κατηγορίες μυκοτοξινών και η τοξικότητά τους</b>                  | 27     |
| 3.1 Γενικά  | 27     |
| 3.2 Αφλατοξίνες   | 28     |
| 3.3 Ζεαραλενόνη   | 29     |
| 3.4 Κιτρινίνη   | 30     |
| 3.5 Ρουμπρατοξίνες  | 31     |
| 3.6 Στεριγματοκυστίνες  | 31     |
| 3.7 Τοξίνες του μύκητα <i>altenaria</i>                                     | 32     |
| 3.8 Τοξικές λακτόνες  | 32     |
| 3.9 Τρεμογόνες τοξίνες  | 33     |
| 3.10 Τριχοθεκένια   | 33     |
| 3.11 Ωχρατοξίνη Α   | 34     |
| 3.12 Συμπτώματα μυκοτοξίκωσης   | 35     |
| 3.13 Τι πρέπει να γνωρίζει ο καταναλωτής                                    | 36     |
| <b>Κεφάλαιο 4:</b>  |        |
| <b>Στάδια-μέθοδοι και ανίχνευση-προσδιορισμός μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο</b> |        |
| 4.1 Γενικά  | 38     |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.1 Στάδια προσδιορισμού μυκοτοξινών                  | 40        |
| 4.1.2 Μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας – TLC      | 52        |
| 4.1.3 Μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-HPLC | 53        |
| 4.1.4 Μέθοδος αερίου χρωματογραφίας-GC                  | 55        |
| 4.1.5 Μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay) | 55        |
| 4.2 Αποτελέσματα και συζήτηση                           | 56        |
| 4.3 Περιστατικό αφλατοξίνης B1 στο ελληνικό ελαιόλαδο   | 57        |
| <b>Κεφάλαιο 5:</b>                                      |           |
| <b>Συμπεράσματα</b>                                     | <b>60</b> |
| <b>Κεφάλαιο 6:</b>                                      |           |
| <b>Νομοθεσία</b>  | <b>62</b> |
| <b>Βιβλιογραφία</b>                                     | <b>65</b> |
| <b>Παράρτημα</b>  | <b>67</b> |
| Γλωσσάριο όρων  | 68        |
| Νομοθεσία   | 72        |

## Εισαγωγή

Το ελαιόλαδο είναι ένα εμπορεύσιμο είδος με τιμή που διαμορφώνεται από την εκάστοτε προσφορά και ζήτηση, αλλά και από τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Ένα βασικό είδος διατροφής υψηλής βιολογικής αξίας. Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αγροτικά προϊόντα της Ελληνικής Οικονομίας, ιδιαίτερης σημασίας για την ευρύτερη περιοχή της Μεσσηνίας, γεγονός που απεικονίζεται στην κλαδική κατανομή του Ακαθάριστου Εγχώριου Προϊόντος (Α.Ε.Π.) του Ν. Μεσσηνίας, αλλά και σε πολλούς άλλους οικονομικούς δείκτες της περιοχής της Πελοποννήσου. Ως τρόφιμο είναι ένα από τα βασικότερα είδη διατροφής και μάλιστα υψηλής βιολογικής αξίας, η οποία οφείλεται μεταξύ άλλων, στην περιεκτικότητα του σε πολυφαινολικές ενώσεις και βιταμίνη Ε, ουσίες που εμφανίζουν μεγάλη αντιοξειδωτική δράση.

Η παρούσα εργασία προσεγγίζει το ελαιόλαδο, από την σκοπιά της χημείας τροφίμων και της επιστήμης της διατροφής. Αποτελείτε συνολικά από 5 κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται ιστορική αναδρομή ορίζεται η ορολογία μυκοτοξινών η σχέση μυκήτων και τοξίνων και η παραγωγή μυκοτοξινών. Στο δεύτερο κεφάλαιο γίνεται αναφορά σε όλες τις μορφές κινδύνων που αφορούν το ελαιόλαδο. Στο κεφάλαιο τρία δίνονται πληροφορίες για τις κύριες κατηγορίες των μυκοτοξινών και αναφέρεται και η τοξικότητά τους. Το κεφάλαιο τέσσερα ασχολείται με τα στάδια και τις μεθόδους ανίχνευσης μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο. Στο κεφάλαιο πέντε συγκεντρώνονται τα συμπεράσματα της εργασίας.. Στο έκτο κεφάλαιο γίνεται μία συνοπτική αναφορά του καθοριστικού ρόλου και της αναγκαιότητας θέσπισης εφαρμογής νομοθεσίας για την αντιμετώπιση του προβλήματος των μυκοτοξινών στην υγεία.

Τέλος το παράρτημα αποτελείτε από το γλωσσάρι όρων, (ένα εργαλείο απαραίτητο για κάθε ειδικό του τομέα τροφίμων) και τη σχετική νομοθεσία (για να μπορεί να υπάρχει η σχετική ενημέρωση της κείμενης νομοθεσίας) που ισχύει και εφαρμόζεται.





## Κεφάλαιο 1: Γενικά περί μυκοτοξινών

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Η παθογόνος φύση μυκήτων στα φυτά έχει παρατηρηθεί από την αρχή της γεωργίας. Οι Ρωμαίοι τον δέκατο όγδοο και δέκατο έβδομο αιώνα π.χ. τιμούσαν την θεότητα Ρόμπιγκους, για να κατευιάσουν την οργή του προκειμένου να προστατευτούν οι καρποί και τα δέντρα. Εορταζόταν στις 25 του Απρίλη, περίοδος όπου είναι περισσότερο πιθανό για τα σπαρτά να δεχτούν επίθεση από σκόρο ή να προσβληθούν από μύκητες. Ακόμα και στα πρώτα στάδια της γεωργίας, οι αγρότες είχαν παρατηρήσει ότι η κατανάλωση μουχλιασμένων δημητριακών ή καρπών είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών. Αναφέρεται ότι, πολλές από τις μάστιγες της κεντρικής Ευρώπης έχουν συνδεθεί με την κατανάλωση ψημένου ψωμιού από μουχλιασμένα σιτηρά. Η πρώτη αναφορά τους στην βιβλιογραφία γίνεται την δεκαετία του 1960, όπου στη Μεγάλη Βρετανία πέθαναν πάνω από εκατό χιλιάδες γαλοπούλες. Αιτία ήταν η κατανάλωση ζωοτροφών που περιείχαν δευτερογενείς μεταβολίτες του μύκητα *Aspergillus flavus*. Αυτό έκανε τους επιστήμονες να σκεφτούν ότι, πιθανόν να υπάρχουν δύσκολα ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες που προέρχονται από μούχλα, οι οποίοι μπορεί να προκαλέσουν ακόμα και θάνατο. Έτσι οι επιστήμονες επινόησαν τον όρο μυκοτοξίνη για να περιγράψουν αυτήν την τοξική συμπεριφορά που παρατηρήθηκε για αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Σύντομα η κατηγορία των μυκοτοξινών συμπεριέλαβε πλήθος από ήδη γνώστες τοξίνες που προέρχονταν από μύκητες (ερισυβώση αλκαλοειδή, ergot alkaloids), κάποιες ενώσεις που αρχικά είχαν απομονωθεί ως αντιβιοτικά (Πατουλίνη) καθώς και ακόμα ένα πλήθος από καινούριους δευτερογενείς μεταβολίτες (Ωχροτοξίνη Α). Στις δεκαετίες 1960 και 1970 παρατηρήθηκε μια εντατική έρευνα γύρω από τη



μελέτη των μυκοτοξινών. Συνολικά έχουν βρεθεί περίπου 300 με 400 ενώσεις που χαρακτηρίζονται ως μυκοτοξίνες εκ των οποίων περίπου οι είκοσι από αυτές έχει αποδειχτεί ότι απαντώνται στις τροφές σε συχνότητα και σε επίπεδα τέτοια, ώστε να θεωρούνται απειλή για την υγεία και των ανθρώπων. Το 1960, στη Μεγάλη Βρετανία πάνω από 100.000 γαλοπούλες (ασθένεια X) πέθαναν λόγω τοξίκωσης, η οποία προκλήθηκε από τοξικούς μεταβολίτες μυκήτων. Η αιτία της ασθένειας αποδόθηκε σε ένα συστατικό της διατροφής τους, τις αραχίδες, σε ποσοστό από 0,5-16%, οι οποίες είχαν μολυνθεί από τον μύκητα *Aspergillus flavus*, ο οποίος συχνά αναπτύσσεται σε αυτό τον καρπό κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του. Η ανάλυση αυτής της ζωοτροφής αποκάλυψε μία σειρά φθοριζόντων ουσιών, οι οποίες αναγνωρίστηκαν ως μυκοτοξίνες και στη συνέχεια μετονομάστηκαν σε αφλατοξίνες (Afs). Εξάρσεις μυκοτοξίκωσης προκλήθηκαν τον επόμενο χρόνο (1961) σε βοοειδή και χοίρους, οι οποίοι είχαν ήδη διατραφεί με μολυσμένο γεύμα αραχίδας. Περίπου την ίδια περίοδο στις Η.Π.Α, παρατηρήθηκε μία έξαρση καρκίνου του ήπατος (hepatoma) στις πέστροφες, το οποίο αργότερα αποδόθηκε στη μόλυνση από αφλατοξίνες ενός μίγματος βαμβακόσπορου, συστατικού της διατροφής αυτών των ψαριών. Στην Ινδία, το 1974, καταγράφηκε η πιο σοβαρή έξαρση ηπατίτιδας στους ανθρώπους λόγω αφλατοξίκωσης (οξεία τοξικότητα από αφλατοξίνες). Στην εν λόγω περίπτωση, η αφλατοξίκωση προήλθε από κατανάλωση μολυσμένου καλαμποκιού από αφλατοξίνες στα επίπεδα από 0,25 έως 15 mg/kg και οι 108 από τους 397 ασθενείς πέθαναν. Πιο πρόσφατα, στην Κένυα το 2005, το πρόβλημα της αφλατοξίνης επανεμφανίστηκε οδηγώντας τουλάχιστον 125 ανθρώπους στο θάνατο από κατανάλωση καλαμποκιού μολυσμένου με αφλατοξίνη.

## 1.2 Ορολογία μυκοτοξινών

Οι μυκοτοξίνες, όπως λέει και το όνομά τους, είναι τοξικά προϊόντα μυκήτων (μούχλας) που αναπτύσσονται στα τρόφιμα. Από αυτές οι πιο γνωστές είναι οι αφλατοξίνες, οι ωχρατοξίνες κ.ά. Οι μυκοτοξίνες (mycotoxins) είναι μεταβολίτες που παράγονται από ορισμένα είδη μυκήτων και έχουν τοξική δράση. Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερος λόγος γίνεται για την παρουσία μυκοτοξινών στις ζωοτροφές και ερευνώνται εκτενώς οι επιπτώσεις τους στις παραγωγικές και αναπαραγωγικές αποδόσεις των ζώων και στην ποιότητα των τροφίμων ζωικής προέλευσης. Παλαιότερα, οι μυκοτοξίνες θεωρούνταν επιβλαβείς μόνο για τα ζώα που τις κατανάλωναν και κατά συνέπεια, επιζήμιες για την οικονομία των εκτροφών.

Κατά το παρελθόν, επίσης, η έλλειψη μεθόδων συντήρησης των τροφίμων, ανάγκαζε τους ανθρώπους σε άμεση κατανάλωσή τους, με αποτέλεσμα να μη δίνεται χρόνος στους μύκητες να αναπτυχθούν και να παράγουν μυκοτοξίνες. Σήμερα, η βελτίωση των μεθόδων συντήρησης των τροφίμων επιτρέπει τη μακροχρόνια αποθήκευσή τους και παράλληλα, έγινε αντιληπτό ότι οι μυκοτοξίνες εξακολουθούν να διεισδύσουν στην τροφική αλυσίδα. Έτσι, υπάρχει ανάγκη για περαιτέρω μελέτη του ρόλου των μυκοτοξινών, αλλά και των προβλημάτων που προκαλούν. Στα ζώα, η λήψη μυκοτοξινών με την τροφή οδηγεί σε διαταραχή της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού τους. Οι παθολογικές καταστάσεις που προκύπτουν ονομάζονται μυκοτοξικώσεις (mycotoxicoses). Συνήθως, παρατηρούνται τρεις μορφές μυκοτοξικώσεων: α) οι οξείες, μετά από λήψη μέτριας ή μεγάλης ποσότητας μυκοτοξινών, που μπορεί να προκαλέσουν ακόμη και το θάνατο του ζώου, β) οι χρόνιες, μετά από μακροχρόνια λήψη μικρής ποσότητας μυκοτοξινών που, συνήθως, έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των ζώων και στο δείκτη μετατρεψιμότητας της τροφής και γ) οι ασυμπτωματικές, ύστερα από τη λήψη ακόμη και ελάχιστης ποσότητας μυκοτοξινών που εκδηλώνονται, κυρίως, με ανοσοκαταστολή. Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στις ασυμπτωματικές μυκοτοξικώσεις, εξαιτίας της καθυστέρησης στη διάγνωσή τους και των προβλημάτων που δημιουργούν. Οι μύκητες είναι οργανισμοί που δεν έχουν χλωροφύλλη. Εμφανίζονται ως απλοί μονοκύτταροι ή και πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι παράγουν μούχλες, μανιτάρια και μαγιά. Οι μύκητες για να αναπτυχθούν τρέφονται με τα θρεπτικά συστατικά του ξενιστή που προσβάλλουν. Κατά την περίοδο της ανάπτυξής τους παράγουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών προϊόντων, τους μεταβολίτες. Ορισμένοι από τους μεταβολίτες είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο, όπως οι μυκοτοξίνες ενώ άλλοι είναι επικερδείς όπως τα αντιβιοτικά. Η λέξη μυκοτοξίνη είναι σύνθετη και χωρίζεται στον όρο *μύκο-* που προέρχεται από τη λέξη μύκητας και *-τοξίνη* που σημαίνει τοξικό σε βιολογικά συστήματα. Οι μυκοτοξίνες είναι οι μεταβολίτες (υποπροϊόντα) οι οποίες παράγονται καθώς ο μύκητας αναπτύσσεται παρασιτικά στον ξενιστή που έχει προσβάλλει. Οι μυκοτοξίνες ονομάζονται «δευτερογενείς μεταβολίτες» διότι δεν φαίνεται να είναι απαραίτητες για την φυσιολογική, βιομηχανική και αναπαραγωγική δραστηριότητα του κυττάρου. Παράγονται κατά τον κυτταρικό κύκλο από πρόδρομες ενώσεις που προέρχονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Αν και έχουν αναπτυχθεί αρκετές θεωρίες για την παραγωγή των μυκοτοξινών (ανταγωνιστική αναστολή, μολυσματικοί παράγοντες) ο

μηχανισμός παραγωγής αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών είναι μάλλον άγνωστος. Ωστόσο είναι αρκετά γνωστός ο τρόπος με τον οποίο παράγονται κατά την διάρκεια της σταθερής φάσης της ανάπτυξης του μύκητα ή υπό συνθήκες στρες.

Μεγάλο ρόλο για την ανάπτυξη των μυκοτοξινών παίζει το κλίμα, συνεπώς, η συγκέντρωσή τους δεν είναι χρονικά σταθερή. Έχει παρατηρηθεί ότι, η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται όταν ο καρπός υφίσταται στρες από καιρικά φαινόμενα, π.χ. μακρά διάρκεια ξηρασίας ακολουθούμενη από ισχυρή βροχόπτωση, ή όταν υποστεί βλάβη από πουλιά, έντομα, ή ακόμα όταν υπάρχει ανταγωνισμός με άλλα βότανα (παράσιτα). Όλες αυτές οι συνθήκες προκαλούν αδυναμία στον καρπό και δίνουν την ευκαιρία στους σπόρους του μύκητα να τον προσβάλλουν. Η ανάπτυξη του μύκητα ευνοείται επίσης όταν η αποθήκευση των καρπών γίνεται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας. Αξίζει να αναφερθεί ότι, η παρουσία μυκήτων δεν είναι πάντα στοιχείο ύπαρξης μυκοτοξινών. Με άλλα λόγια ο μύκητας μπορεί να υπάρχει αλλά να μην παράγει μυκοτοξίνες. Επιπλέον, η απουσία του μύκητα δεν αποκλείει την ύπαρξη μυκοτοξίνης αφού ο μύκητας μπορεί να προϋπήρχε και να έχει παράγει την τοξίνη σε προηγούμενο στάδιο παραγωγής ή επεξεργασίας της τροφής. Η μυκοτοξίνη μπορεί να παραμείνει στην τροφή πολύ μετά το θάνατο του μύκητα χωρίς να καταστραφεί ή να υποστεί οποιαδήποτε αλλοίωση υπό κανονικές συνθήκες.

Οι μυκοτοξίνες είναι δύσκολο να ταξινομηθούν εξαιτίας των ποικίλων χημικών δομών που τις χαρακτηρίζουν, των διαφορετικών βιοσυνθετικών μηχανισμών που ακολουθούν, των μυριάδων βιολογικών αποτελεσμάτων που παρουσιάζουν καθώς και από το ευρύ φάσμα των μυκήτων από τους οποίους προέρχονται. Οι γιατροί τις κατατάσσουν με γνώμονα το όργανο, το οποίο προσβάλλουν. Έτσι, οι μυκοτοξίνες ταξινομούνται ως ηπατοτοξικές, νεφροτοξικές, νευροτοξικές ανοσοτοξίνες κ.τ.λ. Οι βιολόγοι τις κατατάσσουν σε γενικότερες ομάδες, ικανές να προκαλέσουν τερατογένεση, μετάλλαξη, καρκινογένεση και αλλεργία. Οι χημικοί τις ταξινομούν με βάση τη χημική δομή τους (λακτόνες κουμαρίνες), οι βιοχημικοί με βάση τη βιοσυνθετική προέλευσή τους (πολυκετίδια, παράγωγα αμινοξέων) και οι μυκητολόγοι με βάση τους μύκητες από τους οποίους προέρχονται. Η Αφλατοξίνη για παράδειγμα, είναι ηπατοτοξική, ικανή να προκαλέσει μετάλλαξη και καρκινογένεση. Περιέχει δύο φουράνια, προέρχεται από πολυκετίδιο, και παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus*. Από τα παραπάνω φαίνεται ότι, η περιγραφή μιας και μόνο μυκοτοξίνης περιλαμβάνει εκτεταμένη ορολογία δεδομένου ότι πολλοί

ερευνητές από διαφορετικές ειδικότητες παρατηρούν και εμπλουτίζουν τη γνώση πάνω σε αυτές τις φυσικά απαντώμενες τοξίνες.

Η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με τις μυκοτοξίνες περιλαμβάνει τρεις κύριες κατευθύνσεις: τη μυκητολογία, τη χημεία των μυκοτοξινών και την τοξικολογία. Η μυκητολογία περιλαμβάνει την ταξινόμηση των μυκήτων, τις διεργασίες και τους παράγοντες που απαιτούνται για τον αποικισμό του μύκητα (βλάστηση του σπόρου και ανάπτυξη του μύκητα) καθώς και τα βιοσυνθετικά μονοπάτια που ακολουθούνται για τη δημιουργία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα και στα πρωτογενή αγροτικά προϊόντα. Η χημεία των μυκοτοξινών είναι ουσιαστικά οι μέθοδοι και οι διαθέσιμες τεχνικές που υπάρχουν για την ταυτοποίησή τους, τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και τη μελέτη των χημικών ιδιοτήτων τους. Τέλος η τοξικολογία αναφέρεται στις επιπτώσεις που έχει η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων στις μυκοτοξίνες, εφόσον οι ενώσεις αυτές, μπορεί να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα από παθολογικά συμπτώματα (οξεία τοξίκωση ή χρόνιες ασθένειες).

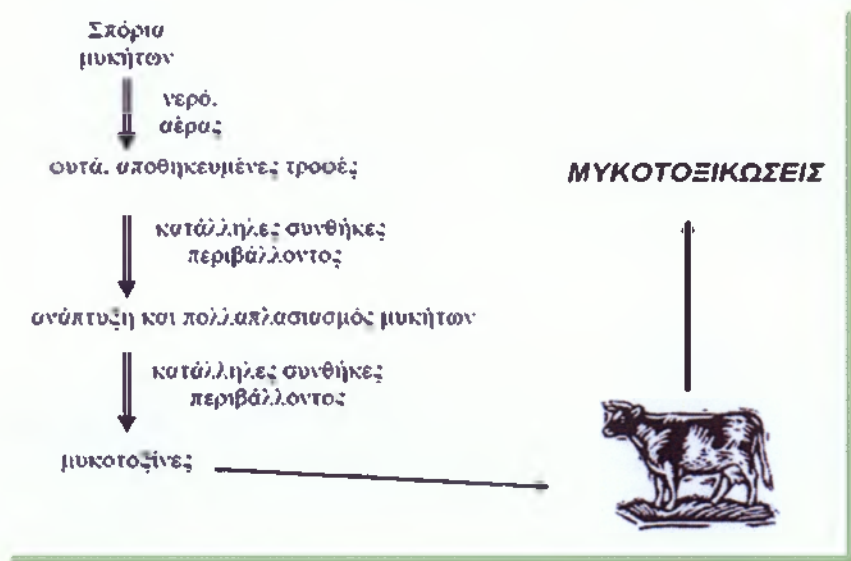
Οι μυκοτοξίνες είναι μια «οικογένεια» χημικών ενώσεων που σχηματίζονται και εκκρίνονται από τους μύκητες στην λογαριθμική και στατική φάση ανάπτυξής τους. Είναι ετεροκυκλικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους με συγγενείς μεταξύ τους χημικές ιδιότητες. Την επιστήμη της ασφάλειας των τροφίμων ενδιαφέρει η υψηλή τοξικότητά τους, αλλά και η ανθεκτικότητά τους σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι μυκοτοξίνες αναγνωρίζονται στην ανάλυση επικινδυνότητας των μελετών HACCP ως πιθανός κίνδυνος. Αποτελούν πιθανό κίνδυνο που σχετίζεται με τρόφιμα φυτικής προέλευσης, κυρίως σιτηρά, ξηρούς καρπούς και φρούτα (καλαμπόκι, σιτηρά, φιστίκια, μπανάνα, μήλο, σταφίδες, κτλ). Απαντώνται όμως και σε ζωικής προέλευσης τρόφιμα όπως το γάλα, τα αυγά, το συκώτι και άλλα, γεγονός που οφείλεται στην κατανάλωση μολυσμένων ζωοτροφών από τα ζώα. Τα ασφαλή όρια πρόσληψης μυκοτοξινών από τον άνθρωπο δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη πλήρως, παρ' όλα αυτά υπάρχουν όρια στις σχετικές νομοθεσίες για ορισμένες μυκοτοξίνες σε κάποια τρόφιμα (αφλατοξίνες στο γάλα, ζεαραλενόνη στα σιτηρά, κ.ά.). Στον παγκόσμιο επιδημιολογικό χάρτη έχουν καταγραφεί νοσήματα που αποδίδονται στην κατανάλωση τροφίμων τα οποία περιείχαν μυκοτοξίνες.

### 1.3 Παραγωγή μυκοτοξινών

Η ύπαρξη μυκοτοξινών στις ζωοτροφές ή στα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, προϋποθέτει την παρουσία μυκήτων. Για να αναπτυχθούν οι



μύκητες, είναι απαραίτητη η παρουσία σπορίων τους στις πρώτες ύλες ή/και στα επεξεργασμένα τρόφιμα. Τα σπόρια μεταφέρονται εύκολα με το νερό και τον αέρα, και μπορεί να μολύνουν τα φυτά, κατά τη διάρκεια της καλλιέργειάς τους, αλλά και τις αποθηκευμένες τροφές. Εφόσον οι συνθήκες περιβάλλοντος είναι κατάλληλες, ακολουθεί η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των μυκήτων. Συνεπώς, οι μύκητες μπορεί να παρίστανται τόσο κατά την καλλιέργεια και τη συγκομιδή των φυτών, όσο και κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση των ζωοτροφών. Κάτω από συγκεκριμένες, πάλι, συνθήκες οι μύκητες είναι δυνατό να παράγουν τους επιβλαβείς μεταβολίτες τους. Επομένως, η παρουσία μυκήτων στις ζωοτροφές δεν σημαίνει απαραίτητα και την παρουσία μυκοτοξινών, καθώς επίσης και η απουσία μυκοτοξινών δεν προδιαγράφει την απουσία μυκήτων.



**Εικόνα 1:** Παραγωγή μυκοτοξινών

Τρόφιμα ή ζωοτροφές με χαμηλό φορτίο μυκήτων δεν θα πρέπει να θεωρούνται ελεύθερα μυκοτοξινών. Οι τελευταίες αποδεικνύονται ιδιαίτερα σταθερές και ανθεκτικές κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (π.χ. θερμική) των προσβλημένων τροφίμων. Για την αποφυγή, λοιπόν, της προσβολής από μύκητες, θα πρέπει να δίνεται ξεχωριστή σημασία στα σημεία παραγωγής, αποθήκευσης και επεξεργασίας των τροφών. Σύμφωνα με δεδομένα του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) των Ηνωμένων Εθνών, το 25% της ετήσιας παγκόσμιας παραγωγής δημητριακών περιέχει μυκοτοξίνες. Οι ζωοτροφές που προσβάλλονται συχνότερα από μύκητες είναι ο αραβόσιτος, το σιτάρι, η βρώμη, το κριθάρι, ο βαμβακόσπορος και η σόγια.

Για να γίνει βιοσύνθεση στο αρχικό προϊόν, όπως π.χ. καλλιέργειες δημητριακών θα πρέπει να ισχύουν πολλοί παράγοντες ταυτόχρονα:

Για να γίνει βιοσύνθεση στο αρχικό προϊόν, όπως π.χ. καλλιέργειες δημητριακών θα πρέπει να ισχύουν πολλοί παράγοντες ταυτόχρονα:

1. Περιβαλλοντικοί παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία).
2. Η φύση του υποστρώματος του τροφίμου.
3. Ο μύκητας, να είναι ικανός να βιοσυνθέσει μυκοτοξίνες.
4. Σημαντικοί είναι και οι μηχανισμοί αντίστασης που εμφανίζουν τα φυτά ύστερα από μία προσβολή από μύκητες.

Επομένως, μόνο κάτω από ένα συνδυασμό των πλέον ευνοϊκών συνθηκών είναι δυνατόν να γίνει βιοσύνθεση μυκοτοξινών και αυτό σημαίνει ότι το φαινόμενο μπορεί να ποικίλει από χώρα σε χώρα. Επίσης, ποικίλει ανάλογα με την εποχή και τις κλιματολογικές συνθήκες μιας χώρας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των μυκήτων είναι:

- ❖ Υγρασία: Υγρασία χαμηλότερη από 14%. Σχετική ατμοσφαιρική υγρασία χαμηλότερη από 70%. Συνήθως απαιτείται υψηλή υγρασία αλλά υπάρχουν διαφορές στις συνθήκες ανάπτυξης των μυκήτων, ακόμη και όταν ανήκουν στο ίδιο γένος. Για παράδειγμα, ο *Aspergillus glaucus* μπορεί να αναπτύσσεται σε υγρασία 10% χαμηλότερη από ότι ο *Aspergillus flavus*.
- ❖ Θερμοκρασία: Θερμοκρασία χαμηλότερη από -2,2 °C. Οι περισσότεροι μύκητες αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Υπάρχουν όμως και μύκητες που μπορούν να αναπτυχθούν σε πολύ υψηλές ή σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες.
- ❖ Το διαθέσιμο οξυγόνο: Οξυγόνο σε αναλογία μικρότερη από 0,5% Οι μύκητες δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς την παρουσία οξυγόνου σε αναλογία 1-2%, τουλάχιστον.
- ❖ Η ευαισθησία συγκεκριμένων υβριδίων φυτών.

Είναι προφανές ότι, οι ανωτέρω συνθήκες δεν μπορούν να εξασφαλιστούν σε καθημερινή βάση. Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών:

**Πίνακας1:** Παράγοντες που επιδρούν στην παραγωγή μυκοτοξινών.

|    |  |
|----|--|
| 1. | θερμοκρασία (7,5 - 40°C)   |
| 2. | υγρασία (>80% σχετική υγρασία)                                       |
| 3. | φως (μεγαλύτερη παραγωγή απουσία φωτός)                              |
| 4. | pH (ιδανικό 4 - 4,6)   |
| 5. | υπόστρωμα (ευνοϊκό υπόστρωμα είναι τα προϊόντα φυτικής προέλευσης)   |
| 6. | παρουσία μυκοστατικών (NaCl, σορβικό οξύ, καφεΐνη, θεοφυλλίνη, κ.ά.) |

#### 1.4 Μύκητες και τοξίνες

Οι κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι αφλατοξίνες, οι φουμονισίνες, η πατουλίνη και οι ωχρατοξίνες (Kabak et al., 2006). Οι αφλατοξίνες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των επιβλαβών τους επιπτώσεων στην υγεία ανθρώπων και ζώων, συμπεριλαμβανομένων των καρκινογόνων, μεταλλαξιογόνων, τερατογόνων και ανοσοκατασταλτικών επιπτώσεων (Eaton and Gallagher, 1994). Παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* και *Aspergillus nominus*. Οι τέσσερις κύριες φυσικά παραγόμενες αφλατοξίνες είναι οι B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>, με τις δύο τελευταίες να περιέχονται με τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε μολυσμένα τρόφιμα (Petchkongkaew et al., 2008).

- Ζεαραλενόνη (ZON) είναι μυκοτοξίνη που παράγεται από είδη του γένους *Fusarium*, τα οποία εκτιμώνται ως μύκητες του αγρού (Mortensen et al., 2006). Κυρίως παράγεται από το είδος *Fusarium graminearum* (Elmholt and Hestbjerg, 2000, Hestbjerg et al., 2002). Είναι αποδεδειγμένο ότι η τοξικότητα της ζεαραλενόνης έχει σοβαρές επιπτώσεις στα φυτά, στους ανθρώπους και στα οικόσιτα ζώα. Επιπρόσθετα, οι οιστρογονικές επιπτώσεις της ζεαραλενόνης έχουν μεγάλο ενδιαφέρον (Kuiper-Goodman et al., 1987, JECFA, 2000, JECFA, 2001, Withanage et al., 2001, Ehrlich et al., 2002).
- Τοξίνες του γένους *Aspergillus's* Το γένος *Aspergillus's* βρίσκεται σε πολλές περιοχές του κόσμου, ιδιαίτερα σε περιοχές με τροπικά κλίματα. Το γένος περιέχει πολλά είδη μυκήτων ικανά να αναπτυχθούν σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας. Περιλαμβάνει περισσότερα απο εκατό γνωστά είδη μυκήτων,



πολλοί απο τους οποίους είναι υπαίτιοι για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες αυτού του γένους με τη μεγαλύτερη σημασία είναι η Αφλατοξίνη B1 (Aflatoxin B1), η Ωχρατοξίνη A (Ochratoxin A), η Στεριγματοκυστίνη (Sterigmatocystin), το Κυκλοπιαζονικό οξύ (Cyclopiazonic acid), η Κιτρινίνη (Citrinin), η Πατουλίνη (Patoulin) και οι Τρεμογόνες μυκοτοξίνες (Tremogen Group). Αν και έχει αποδειχθεί η καρκινογόνος δράση της Αφλατοξίνης B1, θα πρέπει να σημειωθεί ότι μερικά από τα είδη του γένους *Aspergillus*, έχουν και ωφέλιμες εφαρμογές, όπως η παραγωγή αφεψημάτων.

- Τοξίνες του γένους *Penicillium* Το γένος *Penicillium* περιλαμβάνει περίπου εκατόν πενήντα γνωστά είδη μυκήτων. Η ανακάλυψη της Πενικιλίνης το 1929 ήταν η αρχή για την ανακάλυψη και άλλων μυκήτων του γένους αυτού με αντιβιοτικές ιδιότητες. Τουλάχιστον εκατό είδη μυκήτων από το γένος *Penicillium* έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνα για την παραγωγή μυκοτοξινών. Οι πιο γνωστές μυκοτοξίνες του γένους *Penicillium* είναι: οι Ωχρατοξίνες A, B, C, η Κιτροεβιριδίνη (Citreoviridin), η Κιτρινίνη, το Κυκλοπιαζονικό οξύ, η Πατουλίνη, οι Ρουμπρατοξίνες A, B (Rubratoxins A, B) και το Πενικιλικό οξύ (Penicillic acid).
- Τοξίνες του γένους *Fusarium* Τα είδη που παράγονται απο τις τοξίνες του γένους αυτού, είναι παθογόνα των φυτών και η ανάπτυξή τους πραγματοποιείται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Μολύνουν καρπούς δημητριακών, ελαιούχους σπόρους και μπιζέλια. Το γένος *Fusarium* παράγει τις περισσότερες μυκοτοξίνες σε σχέση με άλλα γένη μυκήτων. Οι κυριότερες μυκοτοξίνες που παράγονται από μύκητες αυτού του γένους είναι: οι Φουμινισίνες (Foumonisins), τα Τριχοθεκένια (Trichothecenes), η Ζεαραλενόνη (Zearalenone), κ.α.
- Τοξίνες του γένους *Alternaria* Το γένος αυτό βρίσκεται σε αφθονία, στην ατμόσφαιρα, στο έδαφος και στα πρωτογενή γεωργικά προϊόντα. Τα είδη του γένους αυτού προσβάλλουν τα φυτά στις καλλιέργειες (σιτάρι, ζαχαροκάλαμο, κριθάρι), παράλληλα μπορούν να βρεθούν σε φρούτα και λαχανικά κατα την αποθήκευσή τους σε ψυγεία. Περιλαμβάνουν τις τοξίνες Αλτερναριόλη (Alternariol), Αλτενουένιο (Altenuene), Τενουαζονικό οξύ (Tenuazonic acid) και τις Αλτερτοξίνες (Alttoxins).

- Τοξίνες του γένους *Claviceps* Οι τοξίνες του γένους *Claviceps* προσβάλλουν τους καρπούς των δημητριακών, σίκαλη, σιτάρι. Τα είδη του μύκητα αυτού, αντικαθιστούν τα αναπαραγωγικά όργανα, του ξενιστή με σκληρώτιο, το οποίο περιέχει τοξικά αλκαλοειδή. Η μόλυνση γίνεται κατά την περίοδο άνθησης των φυτών προσβάλλοντας κυρίως τις ωοθήκες τους αποτρέποντας έτσι την αναπαραγωγή τους. Το γεγονός περιλαμβάνει πολλά αλκαλοειδή παράγωγα του Λυσαργικού οξέος (Lysergic acid), καθώς και την Εργοκριπτίνη (Ergocryptine), την Εργοταμίνη (Ergotamine), την Εργοσίνη (Ergosine) και την Εργονοβίνη (Ergonovine)<sup>8</sup>.

Οι σπουδαιότερες μυκοτοξίνες και οι μύκητες που τις παράγουν παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

**Πίνακας2 :** Μυκοτοξίνες και Μύκητες που τις παράγουν.

| Μυκοτοξίνη            | Μύκητες  |
|-----------------------|--|
| Αφλατοξίνες           | <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium sp.</i>  |
| Ζεαραλενόνη           | <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium tricinctum</i> , <i>Fusarium culmorum</i>                                      |
| Στεριγματοκυστίνη     | <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Aspergillus nidulans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> |
| Ωχρατοξίνες           | <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>                            |
| Πατουλίνη             | <i>Penicillium patulum</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i>                                   |
| Κιτρινίνη             | <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium viridicatum</i>   |
| Πενικιλλικό οξύ       | <i>Penicillium martensii</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>                             |
| Ρουμπατοξίνη          | <i>Penicillium rubrum</i>  |
| Αλκαλοειδή εργοτισμού | <i>Claviceps purpurea</i>  |
| T-Z τοξίνη            | <i>Fusarium tricinctum</i>   |
| Τριχοθεσίνες          | <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium roseum</i>   |

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι στις κυριότερες μυκοτοξίνες περιλαμβάνονται οι αφλατοξίνες (aflatoxins), η ζεαραλενόνη (zearalenone), οι τριχοθεσίνες (trichothecenes), η ωχρατοξίνη A (ochratoxin A) και οι φουμονισίνες (fumonisins). Οι ερευνητικές προσπάθειες επικεντρώνονται στη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους, στον τρόπο μεταβολισμού τους, στις δυσμενείς επιπτώσεις συγκεκριμένων κατηγοριών μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου κ.α.

**Πίνακας 3:** Είδη μυκήτων, μυκοτοξίνες που παράγουν και κυριότεροι μεταβολίτες των μυκοτοξινών στον οργανισμό

| Μύκητες  | Μυκοτοξίνες                     | Κυριότεροι Μεταβολίτες         |
|--|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>Aspergillus flavus</i><br><i>Aspergillus parasiticus</i>  | Αφλατοξίνες<br>(B1, B2, G1, G2) | M1 (μεταβολίτης της B1)        |
| <i>Penicillium verucosum</i><br><i>Aspergillus ochraceus</i>   | Ωχρατοξίνη A                    |                                |
| <i>Fusarium graminearum</i><br><i>Fusarium culmorum</i><br><i>Fusarium graminearum</i><br><i>Fusarium culmorum</i><br><i>Fusarium sporotrichioides</i> | Δεοξυνιβαλενόλη<br>T2 τοξίνη    | HT2 τοξίνη                     |
| <i>Fusarium graminearum</i><br><i>Fusarium culmorum</i>  | Ζεαραλενόνη                     | α-ζεαραλενόλη<br>β-ζεαραλενόλη |
| <i>Fusarium moniliforme</i><br><i>Fusarium proliferatum</i>  | Φουμονισίνες:<br>BL B2, B3      |                                |

## Κεφάλαιο 2: Κίνδυνοι και προστασία ελαιολάδου

### 2.1 Κίνδυνοι που απειλούν το ελαιόλαδο

Το ελαιόλαδο είναι πηγή υγείας και ζωής. Είναι ένα πλούσιο φυσικό προϊόν με υψηλή θρεπτική και βιολογική αξία το οποίο όμως μπορεί να επιμολυνθεί με επικίνδυνες για την ανθρώπινη υγεία ουσίες και ξένα σώματα, κατά τα διάφορα στάδια της παραγωγής, του εξευγενισμού, της τυποποίησης και της εμπορίας του.

Μεταξύ των χημικών ουσιών ιδιαίτερη σπουδαιότητα έχουν:

1. **Τα υπολείμματα των γεωργικών φαρμάκων** που οφείλονται στη μη εφαρμογή των κανόνων ορθής γεωργικής πρακτικής στο στάδιο παραγωγής του ελαιοκάρπου.
2. **Οι πτητικοί αλογονωμένοι διαλύτες** (τετραχλωροαιθυλένιο, FREON, τριχλωροαιθάνιο και τριχλωροαιθυλένιο). Η παρουσία του τετραχλωροαιθυλενίου έχει αποδοθεί στην προσθήκη υπολειμμάτων ελαίου από τον ποσοτικό προσδιορισμό ελαίου σε ελιές ο οποίος γίνεται με διαλύτη τετραχλωροαιθυλένιο. Η παρουσία FREON σε ελαιόλαδο αποδίδεται κυρίως σε διαρροές ψυγείων οινοποιητικών μονάδων που γειτνιάζουν με ελαιουργεία ή τυποποιητήρια ελαιολάδου. Η προέλευση των άλλων δύο χλωριωμένων διαλυτών έχει αποδοθεί σε διαλύτες κόλας, λάστιχου σε πάματα βυτίων μεταφοράς ελαιολάδου, σε διαλύτες λιπαντικών, καθαρισμού, κλπ.
3. **Τα βαρέα μέταλλα** των οποίων η παρουσία στα έλαια οφείλεται στην επαφή τους με τα μεταλλικά μέρη των μηχανημάτων ή των δεξαμενών. Τα έλαια μπορούν επίσης να επιμολυνθούν με βαρέα μέταλλα και κατά το στάδιο της παραγωγής τους από την μη τήρηση κανόνων ορθής υγιεινής πρακτικής.
4. **Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH)**. Η παρουσία των επικίνδυνων αυτών ουσιών κυρίως στα πυρηνέλαια σχετίζεται με τον τρόπο παραγωγής τους και ιδιαίτερα με την ξήρανση του ελαιοπυρήνα.
5. **Οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές**. Είναι κυρίως οι διοξίνες, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες, (βενζόλιο, τολουόλιο, αιθυλοβενζόλιο, ξυλόλιο, κλπ.).
6. **Επικίνδυνες ουσίες που μεταναστεύουν στα έλαια από τα υλικά συσκευασίας** οι οποίες οφείλονται στη χρήση ακατάλληλων υλικών. Υλικά συσκευασίας μπορούν για διάφορους λόγους (κακή κατασκευή, εγκλεισμός μονομερούς κλπ.) να επιμολύνουν τα έλαια με ξένες ουσίες π.χ. πλαστικοποιητές, μονομερές VC (βινυλοχλωρίδιο) προερχόμενο από PVC.

Οι φυσικοί κίνδυνοι αφορούν κυρίως στην παρουσία ξένων σωμάτων όπως θραύσματα γυαλιού, πλαστικών, μετάλλων, σκόνης και ακαθαρσιών.

## 2.2 Προστασία της ασφάλειας του ελαιολάδου

Όλα τα τρόφιμα τα οποία διακινούνται, αποθηκεύονται συσκευάζονται, εκτίθενται και μεταφέρονται, προφυλάσσονται από κάθε μόλυνση, η οποία ενδέχεται να τα καταστήσει

α) ακατάλληλα προς βρώση, επιβλαβή για την υγεία, ή

β) μολυσμένα κατά τρόπο που δεν θα ήταν λογικό να αναμένεται η κατανάλωσή τους σε αυτή τη κατάσταση. Ιδιαίτερα τα τρόφιμα πρέπει να τοποθετούνται ή να προστατεύονται κατά τρόπο που να ελαχιστοποιεί τον οποιοδήποτε κίνδυνο μόλυνσης.

- Το ελαιόλαδο και τα πυρηνέλαια θεωρούνται μη ασφαλή όταν έχουν μολυνθεί με τοξικές ουσίες (π.χ. υπολείμματα φυτοφαρμάκων) ή περιέχουν ανεπιθύμητες ξένες ύλες.
- Το ελαιόλαδο και τα πυρηνέλαια δεν θα πρέπει να καταναλώνονται εάν περιέχουν υπολείμματα επικίνδυνων χημικών ουσιών ή επικίνδυνες ξένες ύλες.
- Η προστασία έναντι αυτών των κινδύνων εξαρτάται από:
  - Τον ενδεχόμενο κίνδυνο,
  - Το είδος του ελαίου και πώς αυτό πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.

Μερικοί κίνδυνοι, όταν παρουσιαστούν, καθιστούν το προϊόν κατευθείαν ακατάλληλο και επικίνδυνο για την υγεία (π.χ. τοξικές ουσίες ή γυαλιά). Για αυτούς τους κινδύνους απαιτείται να ληφθούν μέτρα ώστε να αποφεύγεται η επιμόλυνση αυτή. Για παράδειγμα στη φάση της συσκευασίας προτείνεται η χρήση μεταλλικής σήτας στο στόμιο του γεμιστικού ενώ για την περίπτωση εναλλάκτη θερμότητας, θα πρέπει να εξασφαλίζεται ότι το μέσο εναλλαγής είναι κατάλληλο για τρόφιμα και δεν υπάρχει κίνδυνος επιμόλυνσης

## 2.3 Επικίνδυνες ουσίες

Οι επικίνδυνες ή /και μη εδωδιμες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των ζωοτροφών, πρέπει να φέρουν την κατάλληλη σήμανση και να αποθηκεύονται σε χωριστούς και ασφαλείς περιέκτες.

- Πρώτες και βοηθητικές ύλες, ενδιάμεσα και τελικά προϊόντα που έχουν μολυνθεί ή αυτά που έχει λήξει ο χρόνος διατήρησής τους, πρέπει να διαχωρίζονται στους αποθηκευτικούς χώρους και να επισημαίνονται



κατάλληλα ώστε να διευκολύνεται η αναγνώρισή τους.

- Δοχεία ή περιέκτες κατασκευασμένοι για μη βρώσιμα και επικίνδυνα υλικά, όπως υλικά για τον καθαρισμό, πρέπει να είναι ευδιάκριτα σημασμένοι, κλειστοί και να αποθηκεύονται μακριά από τους χώρους επεξεργασίας και αποθήκευσης του ελαιολάδου και των πυρηνελαιών. Δεν πρέπει με οποιοδήποτε τρόπο τα παραπάνω υλικά να έρθουν σε επαφή με τους περιέκτες του ελαιολάδου και των πυρηνελαιών.
- Χημικές ουσίες (π.χ. εντομοκτόνα, υλικά καθαρισμού) ή άλλες μη εδώδιμες ουσίες που μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο στην υγεία πρέπει να φέρουν κατάλληλη σήμανση με προειδοποίηση για την τοξικότητα και χρήση τους, να αποθηκεύονται σε ειδικούς χώρους που κλειδώνουν και να ορίζεται άτομο υπεύθυνο για τη διαχείρισή τους.

#### 2.4 Φυσικοί και γημικοί κίνδυνοι

Οι βασικές κατηγορίες κινδύνων για τα ελαιόλαδα διαχωρίζονται σε φυσικού και γημικούς. Στο συγκεντρωτικό πινάκα γίνεται κατηγοριοποίηση των αιτιών και της αντιμετώπισης τους για τις δυο αυτές κατηγορίες

##### **Φυσικοί κίνδυνοι**

Οι φυσικοί κίνδυνοι μπορούν να προκύψουν από μόλυνση ή / και ελλειείς διαδικασίες σε πολλά σημεία της τροφικής αλυσίδας, από την συγκομιδή έως την κατανάλωση.

**Πίνακας 4:** Συγκεντρωτικός πίνακας πηγών φυσικών κινδύνων και διαδικασιών ελέγχου.

| <b>ΞΕΝΑ ΣΩΜΑΤΑ</b>       | <b>ΠΙΘΑΝΗ ΠΗΓΗ</b> | <b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ</b>   |
|--------------------------|--------------------|--|
| Κομμάτια γυαλιού         | Υλικά συσκευασίας  | Πολιτική ασφαλείας γυαλιού, οδηγίες που καλύπτουν τις απαιτούμενες προδιαγραφές.   |
| Πέτρες, άλλες ξένες ύλες | Πρώτες ύλες        | Επιλογή προμηθευτών, προδιαγραφές που καλύπτουν τα απαιτούμενα πρότυπα και μεταφορά με προσήλωση στις οδηγίες καθαρισμού. Εξακρίβωση Ελεγκτών. |

|  |                       |  |
|--|-----------------------|--|
| Έντομα   | Περιβάλλον            | Πρόγραμμα ελέγχου εντόμων. Φυσικά προστατευτικά.   |
| Ανθρώπινες τρίχες / νύχια, κοσμήματα                       | Χειριστές             | Διαδικασίες υγιεινής και εκπαίδευσης, κατάλληλη προστατευτική ένδυση, τακτική ασφαλείας κοσμημάτων για τους χειριστές μηχανημάτων. |
| Σκόνη  | Περιβάλλον            | Κλειστές πόρτες και παράθυρα, διατήρηση κτηρίου και πρόγραμμα καθαρισμού.  |
| Ίνες από καθαρισμό ρούχων                                  | Υλές καθαρισμού       | Πλήρως εξειδικευμένες διαδικασίες καθαρισμού και εκπαίδευσης.  |
| Μπουλόνια, παξιμάδια βιδών κλπ από τον γεμιστικό εξοπλισμό | Γεμιστικός εξοπλισμός | Σχεδιασμένη συντήρηση εξοπλισμού και πρόγραμμα επιθεώρησης, προστατευτικά στους σωλήνες και μπροστά από τις αντλίες.               |



### Χημικοί κίνδυνοι

Το ελαιόλαδο και τα πυρηνέλαια μπορεί να επιμολυνθούν με χημικές ουσίες οι οποίες προέρχονται από διεργασίες που γίνονται εκτός και εντός του εργοστασίου. Οι κυριότερες επιμολύνσεις δίνονται στον πίνακα που ακολουθεί:

**Πίνακας 5:** Συγκεντρωτικός πίνακας πηγών χημικών κινδύνων και διαδικασιών ελέγχου.

| <b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ</b>                                    | <b>ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ</b>   | <b>ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ</b>   |
|---|---|--|
| <b>Διαδικασίες που γίνονται εκτός του εργοστασίου</b> | Από τα γεωργικά φάρμακα (κατάλοιπα φυτοφαρμάκων και λιπασμάτων)<br>Επιμόλυνση των πρώτων υλών από τα γεωργικά φάρμακα | Η επιχείρηση καθορίζει τις προδιαγραφές ποιότητας που πρέπει να πληρούν οι πρώτες ύλες και εφαρμόζει ένα αναλυτικό πλάνο ελέγχου κατά την παραλαβή τους. |
|   | Από ΡΑΗ<br>Επιμόλυνση των πρώτων υλών από το περιβάλλον   |  |
|   | Από βαρέα μέταλλα<br>Επιμόλυνση των πρώτων υλών από τον εξοπλισμό των ελαιοτριβείων                                   |  |
|   | Από διάφορες επικίνδυνες ουσίες από άλλα τρόφιμα κατά τη μεταφορά   | Χρησιμοποίηση για την μεταφορά βυτίων ή περιεκτών μόνο για τρόφιμα<br>Βεβαιώσεις καθαρισμού των βυτίων ή των περιεκτών ανά φορτίο                        |
| <b>Διαδικασίες που γίνονται εντός του εργοστασίου</b> | Από βαρέα μέταλλα<br>Κατά την επεξεργασία και τυποποίηση του ελαιολάδου και των πυρηνελαιών                           | Εφαρμογή Κανόνων Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής<br><br>Χρησιμοποίηση καταλλήλων υλικών εξοπλισμού  |
|   | Από λιπαντικά<br>Κατά την επεξεργασία και τυποποίηση του  | Χρησιμοποίηση κατάλληλων λιπαντικών για τρόφιμα<br>Τήρηση αρχείου συντήρησης του   |

|  |   |   |
|--|---|---|
|  | ελαιολάδου και των πυρηνελαιίων από τον εξοπλισμό   | εξοπλισμού  |
|  | Από ΡΑΗ<br>Κατά την παραγωγή πυρηνέλαιων  | Εφαρμογή Κανόνων Ορθής Βιομηχανικής Πρακτικής   |
|  | Από υπολείμματα καθαρισμού<br>Κατά τον καθαρισμό του εξοπλισμού                               | Τήρηση προγράμματος καθαρισμού<br>Χρησιμοποίηση κατάλληλων απορριπταντικών<br>Χρησιμοποίηση μόνο καθαρού εξοπλισμού |
|  | Από διαλύτες (τετραχλωροαιθυλένιο, τριχλωροαιθάνιο, τριχλωροαιθυλένιο)<br>Κατά την αποθήκευση | Εφαρμογή GMP  |
|  | Από μετανάστευση επικίνδυνων ουσιών που προέρχονται από τα συσκευαστικά υλικά                 | Κατάλληλα υλικά συσκευασίας   |

### 2.5 Διαχείριση ακατάλληλων προϊόντων

Σε περίπτωση διαπίστωσης μίας μόλυνσης του προϊόντος στη φάση της διανομής και διάθεσης στα σημεία πώλησης, η επιχείρηση ενημερώνει αμέσως τις Αρμόδιες Αρχές και προβαίνει στην ολική απόσυρση του αντίστοιχου φορτίου ή παρτίδας.

Για τις αποσυρθείσες ποσότητες, καθώς και εκείνες που προέρχονται από επιστροφές πελατών ή από μόλυνση κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας, εφαρμόζεται η προγραμματισμένη διαδικασία αποσυσκευασίας και εξευγενισμού ή διάθεσης στα απόβλητα, κατά τα προβλεπόμενα από τις ισχύουσες υγειονομικές διατάξεις σε σχέση με το είδος της μόλυνσης που έχει προκληθεί:

Καταγράφεται λεπτομερώς το συμβάν και οι επακόλουθες ενέργειες και συνεδριάζει η διοίκηση μαζί με την Ομάδα HACCP για να εντοπίσει την αιτία και να αποφασίσει την ανάγκη αναθεώρησης ή τροποποίησης του συστήματος HACCP.

Το σύστημα HACCP παρέχει τις τεχνικές μορφές να προσδιοριστούν και να αξιολογηθούν οποιοδήποτε κίνδυνοι που συνδέονται με τα διάφορα βήματα παραγωγής και καθορίζει μερικά διορθωτικά μέτρα για να αποτραπεί, να αποβληθεί ή να μειωθεί η πιθανότητα κίνδυνοι. Αυτές οι προϋποθέσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αναπτυχθεί ένα πρακτικό πρόγραμμα HACCP, προκειμένου να μειωθεί η παρουσία μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο, και να εφαρμοστούν ορθές γεωργικές πρακτικές. Είναι αλήθεια ότι αν και η σύνθεση του ελαιολάδου εμποδίζει τη μικροβιακή αύξηση για πολλούς λόγους, όπως η έλλειψη οξυγόνου, η μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό και η παρουσία λιπιδίων ως μοναδικό υπόστρωμα εντούτοις αυτή η σύνθεση δεν εγγυάται την απουσία σπορίων και τοξινών τα οποία είναι ήδη παρόντα κατά τη διάρκεια της συγκομιδής και μετά τη συγκομιδή κατά την αποθήκευση.

Η συσσώρευση μυκοτοξινών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας ελιάς εξαρτάται από διάφορους κλιματολογικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις και η σχετική υγρασία. Επίσης, η βιοσύνθεση των μυκοτοξινών μπορεί να πραγματοποιηθεί και κατά τη διάρκεια των σταδίων επεξεργασίας της ελιάς όπως η συλλογή, η μεταφορά, η αποθήκευση και η πλύση. Ο καλύτερος τρόπος να αποτραπεί και να ελεγχθεί η ανάπτυξη μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο είναι η πρόληψη και η σωστή διαχείριση των μετά τη συγκομιδή και αποθήκευσης σταδίων επεξεργασίας των ελιών (Park 1995).

**Πίνακας 6:** Ρυπαντές και όρια αυτών για διάφορες κατηγορίες ελαιολάδου.

| ΡΥΠΑΝΤΕΣ   | Εξαιρε-<br>τικά<br>παρθένο<br>ελαιόλαδο | Παρθένο<br>ελαιόλαδο | Ελαιόλα-<br>δο<br>λαμπάντε | Εξευγενι-<br>σμένο<br>ελαιόλαδο | Ελαιόλα-<br>δο | Ακατέργα-<br>στο<br>πυρηνέλαιο | Εξευγενι-<br>σμένο<br>πυρηνέλαιο | Πυρη-<br>νέλαιο |
|--|---|----------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| Αλογονομένοι<br>διαλύτες<br>Κάθε διαλύτης<br>που<br>ανιχνεύθηκε          | ≤0,1<br>mg/kg                           | ≤0,1mg<br>/kg        | ≤0,1<br>mg/kg              | ≤0,1 mg/kg                      | ≤0,1<br>mg/kg  |                                | ≤0,1 mg/kg                       | ≤0,1<br>mg/kg   |
| Άθροισμα<br>διαλυτών που<br>ανιχνεύθηκαν                                 | ≤0,2<br>mg/kg                           | ≤0,2<br>mg/kg        | ≤0,2<br>mg/kg              | ≤0,2 mg/kg                      | ≤0,2<br>mg/kg  |                                | ≤0,2 mg/kg                       | ≤0,2<br>mg/kg   |
| Φυτοφάρμακα<br>(εντομοκτόνα)   | 1 p.p.m ή 0.001%                        |                      |                            |                                 |                |                                |                                  |                 |
| Μέταλλα  |   |                      |                            | 1,5 mg/kg                       | 1,5 mg/kg      | 1,5 mg/kg                      | 1,5                              | 1,5             |
| Σίδηρος (Fe)   | 5mg/kg                                  | 5mg/kg               | 5mg/kg                     |                                 |                |                                | mg/kg                            | mg/kg           |
| Χαλκός (Cu)  | 0,4<br>mg/kg                            | 0,4<br>mg/kg         | 0,4<br>mg/kg               | 0,1 mg/kg                       | 0,1 mg/kg      | 0,1 mg/kg                      | 0,1<br>mg/kg                     | 0,1<br>mg/kg    |
| Μόλυβδος (Pb)  | 0,1 mg/kg                               | 0,1<br>mg/kg         | 0,1<br>mg/kg               | 0,1 mg/kg                       | 0,1 mg/kg      | 0,1<br>mg/kg                   | 0,1<br>mg/kg                     | 0,1 mg/kg       |
| Αρσενικό (As)  | 0,1 mg/kg                               | 0,1<br>mg/kg         | 0,1<br>mg/kg               | 0,1 mg/kg                       | 0,1 mg/kg      | 0,1 mg/kg                      | 0,1<br>mg/kg                     | 0,1<br>mg/kg    |
| Πολυκυκλικοί<br>Αρωματικοί<br>Υδρογονάνθρακ<br>ες<br>Βενζο(a)<br>πυρένιο |   |                      |                            |                                 |                |                                | 2 μg/kg                          | 2 μg/kg         |
| Βενζο(e)<br>πυρένιο  |   |                      |                            |                                 |                |                                | 2 μg/kg                          | 2 μg/kg         |
| Βενζο(a)<br>ανθρακένιο   |   |                      |                            |                                 |                |                                | 2 μg/kg                          | 2 μg/kg         |
| Βενζο(b)<br>φλουορανθένιο  |   |                      |                            |                                 |                |                                | 2 μg/kg                          | 2 μg/kg         |
| Βενζο(k)<br>φλουορανθένιο  |   |                      |                            |                                 |                |                                | 2 μg/kg                          | 2 μg/kg         |

|  |                                 |  |  |  |  |  |         |         |  |
|--|---------------------------------|--|--|--|--|--|---------|---------|--|
| Διβενζο(a,h)<br>ανθρακένιο                             |                                 |  |  |  |  |  | 2 µg/kg | 2 µg/kg |  |
| Βενζο(g,h,i)<br>περυλένιο                              |                                 |  |  |  |  |  | 2 µg/kg | 2 µg/kg |  |
| ΙνδENO(1,2,3-d)<br>Πυρένιο                             |                                 |  |  |  |  |  | 2 µg/kg | 2 µg/kg |  |
| Άθροισμα όλων<br>πιθανών<br>συνδυασμών<br>των παραπάνω |                                 |  |  |  |  |  | 5 µg/kg | 5 µg/kg |  |
| Διοξίνες   | 0,75 pg WHO-PCDD/F-TEQ/g λίπους |  |  |  |  |  |         |         |  |

### Κεφάλαιο 3: Κύριες κατηγορίες μυκοτοξινών και η τοξικότητά τους

#### 3.1 Γενικά

Ο άνθρωπος μπορεί να επιβαρυνθεί με μυκοτοξίνες από μολυσμένη με μύκητες τροφή ή μέσω της διατροφικής αλυσίδας, δηλαδή από προϊόντα που παράγονται από ζώα (αυγά, κρέας, γάλα), τα οποία έχουν εκτραφεί από μολυσμένες ζωοτροφές. Η τροφική επίδραση των μυκοτοξινών στον άνθρωπο και στα ζώα είναι γνωστή ως μυκοτοξίκωση και η σφοδρότητά της εξαρτάται από την τοξικότητα της μυκοτοξίνης, το βαθμό της έκθεσης, την ηλικία, το φύλο και άλλους συνεργαστικούς παράγοντες. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η έκθεση του ανθρώπου σε τροφές μολυσμένες με μυκοτοξίνες έχει παρατηρηθεί από τα αρχαία χρόνια. Για παράδειγμα στον μεσαιώνα, υπήρξαν μαζικές εκδηλώσεις εργοτισμού από ερισυβώδη αλκαλοειδή, που παράγονταν από το μύκητα *Claviceps purpurea*. Ο εργοτισμός έφτασε στα ποσοστά της επιδημίας και οδήγησε πολλούς ανθρώπους της Κεντρικής Ευρώπης στον ακρωτηριασμό και το θάνατο. Η ασθένεια είναι γνωστή σαν «η φωτιά του Αγίου Αντωνίου, διότι εκείνη την περίοδο πιστεύονται πως το προσκύνημα στον τάφο του Αγίου Αντωνίου θα έφερνε ανακούφιση από την έντονη αίσθηση καψίματος. Τα θύματα είχαν εκτεθεί σε ένα παραισθησιογόνο το διαιθυλαμίδιο του λυσεργικού οξέος (LSD), το οποίο παραγόταν κατά το ψήσιμο ψωμιού, από κριθάρι μολυσμένο με ερισυβώδη αλκαλοειδή (ergot alkaloids) και άλλα παραισθησιογόνα. Ωστόσο, ο εργοτισμός δεν θεωρείται πλέον απειλή για την υγεία των ανθρώπων. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν απομακρυνθεί από τη διατροφή του ανθρώπου εξαιτίας των αυστηρών ελέγχων υγιεινής και των νέων μεθόδων επεξεργασίας των πρώτων υλών. Για παράδειγμα, έχει για δεκαετίες να αναφερθεί νέο κρούσμα από την ασθένεια του κίτρινου ρυζιού, καθώς οι έλεγχοι για τη διακίνηση του ρυζιού είναι πλέον αυστηροί. Ακόμα, μία ασθένεια που ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένη κατά τις δεκαετίες 1930 και 1940 στην τότε Σοβιετική Ένωση ήταν η *alimentary toxic aleukia*, από σπόρους προσβεβλημένους με τριχοθεκένια. Αναφέρουμε ακόμα, την ασθένεια που έδωσε την ώθηση για τη μελέτη των μυκοτοξινών, την οξεία αφλατοξίκωση που εμφανίστηκε στις γαλοπούλες τη δεκαετία του '60 στη Μεγάλη Βρετανία, καθώς και την αστάθεια στο βάδισμα που είχε παρατηρηθεί σε πρόβατα και χοιροειδη από τις τρεμογόνες τοξίνες στην Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία. Η μυκοτοξίκωση μπορεί να εμφανιστεί τόσο σε βιομηχανοποιημένες όσο και σε αναπτυσσόμενες χώρες. Επειδή το εμπόριο πραγματοποιείται σε παγκόσμια κλίμακα το πρόβλημα με αγροτικά προϊόντα μολυσμένα με μυκοτοξίνες συνδυάζει πολλές διαφορετικές



προϋποθέσεις όπως περιβαλλοντικές κοινωνίες και οικονομίες. Η ανάπτυξη των μυκήτων στις τροφές μπορεί να γίνει κατά το στάδιο της παραγωγής, της επεξεργασίας, της μεταφοράς ή της αποθήκευσης της τροφής. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μύκητα αλλά και την παραγωγή μυκοτοξινών είναι κυρίως η υγρασία, η θερμοκρασία, το pH της τροφής κ.α. Οι μυκοτοξίνες θεωρείται ότι είναι υπαίτιες για την εμφάνιση ασθενειών, σε περιπτώσεις όπου τα συμπτώματα εμφανίζονται σε πολλά άτομα χωρίς καμία εμφανή σύνδεση μεταξύ τους. Τα συμπτώματα της μυκοτοξίκωσης είναι περίπου όμοια για όλες τις μυκοτοξίνες. Συχνά, παρουσιάζονται δυσκολίες στη διάγνωση λόγω των όμοιων συμπτωμάτων που έχουν με άλλες παθολογικές καταστάσεις, π.χ. καρκινογένεση, τετρατογένεση, μετάλλαξη κ.α. Γενικά, οι παθολογικές αυτές καταστάσεις: α) δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα, β) τα συμπτώματά τους συνδέονται με την τροφή και με πρωτογενή αγροτικά προϊόντα, γ) δεν είναι μεταδοτικές, δ) είναι περισσότερο εποχιακές (λόγω καιρικών συνθηκών) και ε) η δράση τους στον άνθρωπο και στα ζώα είναι συνάρτηση του φύλου, της ηλικίας και της βιολογικής κατάστασης του οργανισμού. Επιπλέον, οι μυκοτοξίνες δεν είναι αντιγονικές και έτσι τα ζώα και ο άνθρωπος δεν εμφανίζουν ανοσία εναντίων τους. Η παρουσία των μυκοτοξινών έχει συνδεθεί με μεταλλάξεις στα ζώα, δυσλειτουργίες στο νευρικό σύστημα, καρκινώματα στο ήπαρ, στα νεφρά, στους πνεύμονες, καθώς και στο ουρικό και πεπτικό σύστημα. Η επίσημη μέθοδος για την αξιολόγηση της άμεσης χημικής τοξικότητας μιας ένωσης, καθορίζεται μέσω του προσδιορισμού της τιμής LD (Lethal Dose). Η τιμή LD αντιστοιχεί στην ποσότητα μιας μυκοτοξίνης ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους, η οποία είναι θανατηφόρα για το 50% των πειραματόζωων. Για τις μυκοτοξίνες οι τιμές LD ποικίλουν, διότι εξαρτώνται από διαφορετικούς μεταξύ τους παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, το βάρος κ.α. Τα όργανα που συνήθως προσβάλλουν είναι το ήπαρ και τα νεφρά. Πολλές μυκοτοξίνες έχουν βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν στην πρωτεϊνοσύνθεση δημιουργώντας παρενέργειες που εμφανίζονται από άλλες δερματικές ευαισθησίες μέχρι έντονες ανοσολογικές ανεπάρκειες.

### 3.2 Αφλατοξίνες

Στις αφλατοξίνες έχει αποδοθεί οξεία τοξικότητα και καρκινογένεση σε ανθρώπους και σε ζώα. Η οξεία αφλατοξίκωση οδηγεί στο θάνατο, ενώ η χρόνια προκαλεί καρκίνο, ανοσολογική ανεπάρκεια κ.α. με το ήπαρ ως το σύνθετο όργανο που καταστρέφεται. Η αξιολόγηση επιδημιολογικών και ερευνητικών



αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκε από το διεθνή οργανισμό για την έρευνα του καρκίνου (International Agency for Research on Cancer, IARC) το 1987 απέδειξε ότι η έκθεση του ανθρώπου στις αφλατοξίνες συσχετίζεται με καρκινογένεσεις, ταξινομώντας έτσι την ομάδα των αφλατοξινών στην πρώτη ομάδα των καρκινογόνων ουσιών. Τα ποσοστά του καρκίνου του ήπατος στον ανθρώπινο πληθυσμό ποικίλουν από χώρα σε χώρα με υψηλότερα ποσοστά στα μέρη όπου οι κλιματολογικές συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων στις τροφές και κατά συνέπεια την παραγωγή αφλατοξινών. Η οξεία τοξικότητα των αφλατοξινών έχει εμφανιστεί και σε πολλά άλλα είδη, όπως ψάρια, κουνέλια, πουλερικά και σκύλους. Έχει βρεθεί ότι τα νεαρά ζώα και κυρίως τα αρσενικά είναι περισσότερο ευπαθή στην προσβολή από μυκοτοξίνες. Η LD κυμαίνεται από 0,5-10 mg/kg, ανάλογα το βάρος του σώματος. Η αφλατοξίνη B1 είναι ένα ισχυρό μεταλλαξιογόνο, μεταλλάσσει τα χρωμοσώματα των φυτών, ζώων και ανθρώπων. Η βιολογική δράση της αφλατοξίνης B1 προαπαιτεί τη μεταβολική ενεργοποίησή της στο C15-C16 εποξειδίου της το οποίο είναι πολύ δραστικό παράγωγο. Έχει βρεθεί ότι, σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός ανάμεσα στο N-7άτομο της γουανίνης με το ενεργό παράγωγο της αφλατοξίνης B1. Αυτό το προϊόν, το προϊόν της προσθήκης που σχηματίζεται, αναστέλλει τη σύνθεση του DNA.

Οι τοξικές επιδράσεις των αφλατοξινών είναι οι εξής :

- Οξεία και χρόνια τοξικότητα
- Καρκινογένεσεις
- Τερατογένεσεις
- Τοξικότητα/καρκίνο του ήπατος
- Εγκεφαλοπαθήσεις
- Αποβολές εμβρύων
- Νεκρώσεις οργάνων
- Αιμορραγία πνευμόνων, εντέρων. Ήπατος
- Εκφυλισμό των οστών
- Εκφυλισμό νευρικών κυττάρων
- Τοξαιμία

### 3.3 Ζεαραλενόνη

Η Ζεαραλενόνη επιδρά κυρίως στο αναπαραγωγικό σύστημα. Η κυριότερη βιολογική δράση που εμφανίζει είναι υπερ-οιστρογενισμός, ο οποίος θεωρείται χρόνια τοξίκωση. Μελέτες σε χοιροειδή έχουν δείξει ότι η Ζεαραλενόνη

απορροφάται γρήγορα μέσω της στοματικής κοιλότητας και μεταβολίζεται στα έντερα στις μορφές α- και β- Ζεαραλενόνη, όπου εν συνεχεία συζευγνύονται με το γλυκουρονικό οξύ. Στα θηλυκά χοιροειδή το σύνδρομο εμφανίζεται με διόγκωση του αιδοίου και των μαστικών αδένων, υπερπλασία της μήτρας, ατροφία των ωοθηκών, πρωκτική και κοιλιακή πρόπτωση. Στα αρσενικά χοιροειδή μπορεί να προκαλέσει εκφυλισμό, που εμφανίζεται με ατροφία στους όρχεις και υπερτροφία των μαστικών αδένων. Επίσης, παρατηρείται μειωμένη αναπαραγωγή, μείωση της ωορρηξίας και αρνητικές επιδράσεις στην εμβρυακή ανάπτυξη. Η Ζεαραλενόνη, λόγω της μεγάλης οιστρογενικής δραστηριότητας (increased estrogenic activity), έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της εμμηνόπαυσης και ως αντισυλληπτικό. Αν και η επικινδυνότητα της Ζεαραλενόνης για τον άνθρωπο δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί, είχε θεωρηθεί υπαίτια για τις πρόωρες έμμηνο ρήσεις των εφήβων στο Πόρτο Ρίκο, κάτι το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Φαρμάκων. Η συνιστώμενη ημερήσια έκθεση στη Ζεαραλενόνη είναι 0,05 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Εντούτοις, τα όρια για την παρουσία της Ζεαραλενόνης στις τροφές, δεν έχουν ακόμα θεσπιστεί νομοθετικά .

#### 3.4 Κιτρινίνη

Αρχικά στην Κιτρινίνη είχε αποδοθεί αντιβιοτική δράση αλλά οι ισχυρές παρενέργειες που παρουσίασε στα νεφρά θηλαστικών, άλλαξε γρήγορα αυτήν την πεποίθηση. Το 1951 στην Ιαπωνία το εισαγόμενο ρύζι από την Ταϊλάνδη με κίτρινο χρώμα εξετάστηκε και περιείχε Κιτρινίνη. Έκτοτε έχουν γίνει πολλές αναφορές για την παρουσία Κιτρινίνης στο ρύζι και έχει μείνει στην ιστορία σαν η «ασθένεια του κίτρινου ρυζιού», μια θανάσιμη μορφή μπέρι-μπέρι, με συμπτώματα όπως η δύσπνοια, παράλυση και τύφλωση. Η Κιτρινίνη θεωρείται ηπατοτοξική και νεφροτοξική και δρα συνεργατικά με την Ωχρατοξίνη Α με την οποία συνήθως συνυπάρχει. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η παρουσία της στις τροφές είναι σπανιότερη και οι συγκεντρώσεις χαμηλότερες σε σχέση με την Ωχρατοξίνη Α, θεωρείται ότι συμβάλει περισσότερο στην ηπατοτοξικότητα που παρατηρείται στα ζώα παρά ότι την προκαλεί. Η τιμή LD<sub>50</sub> για τα ποντίκια είναι 70 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Ο Πίνακας 7 που ακολουθεί, συγκεντρώνει τις LD<sub>50</sub> τιμές για τις κυριότερες μυκοτοξίνες. Η LD<sub>50</sub> είναι η ποσότητα μυκοτοξίνης ανά kg σώματος, ικανή να προκαλέσει το θάνατο στο 50% των πειραματόζωων.

**Πίνακας 7:** Τοξικότητα ορισμένων μυκοτονοξινών σε διάφορα βιολογικά συστήματα.

| <b>Είδος</b> | <b>Μυκοτοξίνη</b>         | <b>LD50<br/>(mg ανά Kg σώματος)</b> |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Κουνέλι      | Αφλατοξίνη Β <sub>1</sub> | 0,30                                |
| Χοιροειδή    | Αφλατοξίνη Β <sub>1</sub> | 0,62                                |
| Μαϊμού       | Αφλατοξίνη Β <sub>1</sub> | 2,2                                 |
| Ποντίκια     | Οχρατοξίνη Α              | 21 4-30,3                           |
| Κοτόπουλα    | Οχρατοξίνη Β              | 24                                  |
| Μαϊμού       | Στερυγματοκυστίνη         | 32                                  |
| Ποντίκια     | Δεοξυνιβαλενόλη           | 70                                  |
| Ποντίκια     | Διακετοξισκριπενόλη       | 23                                  |
| Ποντίκια     | Νεοσολανιόλη              | 14,5                                |
| Ποντίκια     | ΗΤ-2 τοξίνη               | 9,0                                 |
| Ποντίκια     | Τ-2 τοξίνη                | 5,2                                 |
| Ποντίκια     | Νιβαλενόλη                | 4,1                                 |
| Ποντίκια     | Βερρουκαρίνη Α            | 0,5                                 |
| Ποντίκια     | Ρουμπρατοξίνη Β           | 83                                  |
| Ποντίκια     | Τενουαζανικό οξύ          | 81-225                              |
| Κοτόπουλα    | Τενουαζανικό οξύ          | 37,5                                |
| Σκύλοι       | Τενουαζανικό οξύ          | 2,5-10                              |
| Χοιροειδή    | Τρεμογόνες τοξίνες        | 0,005                               |
| Κοτόπουλα    | Πατουλίνη                 | 170                                 |
| Ποντίκια     | Πενικιλικό οξύ            | 250                                 |
| Ποντίκια     | Ζεαραλενόλη               | 10.000                              |
| Χοιραιοειδή  | Ζεαραλενόλη               | 5.000                               |
| Ποντίκια     | Κιτρινίνη                 | 70                                  |

### 3.5 Ρουμπρατοξίνες

Μελέτες σε ενδοκυτταρικό επίπεδο έχουν δείξει ότι ο μηχανισμός δράσης των τοξινών αυτών, είναι η αναστολή της μιτοχονδριακής αναπνοής, της παραγωγής ATP και της πρωτεϊνοσύνθεσης. Το ήπαρ είναι το όργανο που κυρίως καταστρέφουν οι τοξίνες αυτής της κατηγορίας, καθώς και τα νεφρά, σπλήνα, πνεύμονες και οισοφάγο. Αλλοίωση έχει παρατηρηθεί στην λειτουργία του ήπατος, όπου κύτταρα εμφανίζουν εκφυλισμό και νέκρωση (ίκτερος, θρόμβωση). Άλλα κλινικά συμπτώματα όπου έχουν αποδοθεί στις Ρουμπρατοξίνες είναι η κατάθλιψη, ανορεξία, απώλεια βάρους, θρόμβωση και οι αιμορραγίες. Η τιμή LD<sub>50</sub> για τα ποντίκια είναι 83 mg/Kg ανά βάρος σώματος.

### 3.6 Στεριγματοκυστίνες

Οι τοξικές επιπτώσεις της Στεριγματοκυστίνης είναι περίπου όμοιες με αυτές της Αφλατοξίνης Β1. Η Στεριγματοκυστίνη μπορεί να προκαλέσει καρκινογένεση, μετάλλαξη και τερατογένεση. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η χρόνια έκθεση σε Στεριγματοκυστίνη προκαλεί ηπατώματα, καρκίνο στους πνεύμονες νεφρικές και ηπατικές αλλοιώσεις. Στα βοοειδή έχει παρατηρηθεί διάρροια αίματος, μειωμένη παραγωγή γάλατος ακόμα και θάνατος σε περιπτώσεις όπου τα όρια της Στεριγματοκυστίνης ήταν περίπου 8 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι, καμία χώρα δεν έχει νομοθεσία που να θεσπίζει τα όρια ανίχνευσης της Στεριγματοκυστίνης για την προστασία των καταναλωτών.

### 3.7 Τοξίνες του μύκητα *Altenaria*

Υπάρχουν μελέτες που θεωρούν τις τοξίνες του μύκητα *Altenaria* υπαίτιες για τα αιμορραγικά σύνδρομα που εμφανίζουν τα πουλερικά καθώς και με την μυκητίαση που εμφανίζουν τα βοοειδή. Τοξικολογικές μελέτες στα ποντίκια έδειξαν ότι η ενδοπεριτονιακή χορήγηση τοξινών αυτής της ομάδας επέφερε τον θάνατο ενώ στα άλογα παρατηρήθηκε αλλοίωση των βλεννογόνων αδένων. Γενικά οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση που έχουν οι τοξίνες του γένους *Altenaria*, έδειξαν ότι ενώ εμφανίζουν αντικές, αντιβακτηριδιακές, αντιμυκητιακές ιδιότητες είναι παράλληλα τοξικές τόσο σε φυτικά όσο και σε βιολογικά συστήματα. Η τιμή LD<sub>50</sub> για το Τενουαζικό οξύ (Teniazonic acid) στα ποντίκια βρέθηκε 125-225 mg/Kg ανά βάρος 18 σώματος για τα αρσενικά και 81-115 mg/Kg ανά βάρος σώματος για τα θηλυκά.

### 3.8 Τοξικές λακτόνες

Στην Πατουλίνη αρχικά είχαν αποδοθεί αντιβιοτικές ιδιότητες για την καταπολέμηση της κοινής γρίπης (βήχα, καταρροή). Επίσης, χρησιμοποιούταν και ως αλοιφή για την απαλλαγή από δερματικές μυκητιάσεις. Ωστόσο, ανάμεσα στις δεκαετίες του 1950 και 1960 μελέτες απέδειξαν ότι η Πατουλίνη εκτός από την αντιβακτηριαδική και αντικική δράση, ήταν τοξική για τον άνθρωπο και τα φυτά, κατατάσσοντας την τελικά ως μυκοτοξίνη. Η Πατουλίνη είναι τοξική σε βακτήρια, πρωτόζωα και μύκητες για αυτό αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ισχυρό αντιβιοτικό. Αποδείχτηκε ισχυρά τοξική και για τον άνθρωπο, επιδρώντας κυρίως στο στομάχι προκαλώντας συμπτώματα όπως ναυτία και εμετό. Σε πολύ ισχυρές δόσεις η Πατουλίνη έχει βρεθεί ότι προκαλεί γαστρεντερική υπεραναιμία, αιμορραγίες και έλκος. Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι, η Πατουλίνη προκαλεί πνευμονικό οίδημα, ηπατίτιδα, νεφρική ανεπάρκεια ενώ σε χρόνιες δόσεις προκαλεί ανοσολογική ανεπάρκεια και καρκινογενέσεις. Στα νεαρά κοτόπουλα η τιμή LD<sub>50</sub> για την Πατουλίνη είναι 170 mg/Kg ανά βάρος σώματος. Το Πενικιλικό οξύ έχει αποδεχτεί ότι έχει αντιβακτηριαδική αντιοϊκή και αντικαρκινική βιολογική δραστηριότητα, αλλά ταυτόχρονα και κυττοτοξικές ιδιότητες. Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι παρουσιάζει δακτυλωτή (digitalis-like action) δράση στην καρδιά, όταν βρίσκεται στην κυκλική μορφή της λακτόνης. Επιδρά σε όλα τα τριχοειδή αγγεία, μειώνει τη διαπερατότητα τους και εμφανίζει ανιδιουριτική δράση

### 3.9 Τρεμογόνες τοξίνες

Οι τρεμογόνες τοξίνες προκαλούν ρίγη και σπασμούς στα ζώα. Το σύνδρομο χαρακτηρίζεται από αστάθεια στην κίνηση η οποία μπορεί να μην είναι εμφανής έως ότου τα ζώα αναγκαστούν να τρέξουν, οπότε και παρατηρείται ασταθές βάδισμα, ρίγος στο κεφάλι, παραπάτημα έως και κατάρρευση ακολουθούμενη από νευρικούς σπασμούς. Η τοξικότητα των τοξινών αυτής της κατηγορίας είναι μεγάλη καθώς και ακόμα και η ποσότητα 0,005 mg/Kg ανά βάρος σώματος, είναι ικανή να προκαλέσει ρίγος και αστάθεια.

### 3.10 Τριχοθεκένια

Τα Τριχοθεκένια προκαλούν ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων λόγω, της ποικιλομορφίας που χαρακτηρίζει αυτήν την ομάδα των μυκοτοξινών. Χαρακτηρίζεται κυρίως ως νευροτοξικές και κυττοτοξικές. Η ανοσολογική τοξικότητα που εμφανίζουν οφείλεται κυρίως στην υποκατάσταση που φέρουν στη



θέση C8 του μορίου, στον οξιρανικό δακτύλιο στις θέσεις C12, C13 καθώς και στην παρουσία διπλού δεσμού στις θέσεις C9=C10. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι, τα μέλη της ομάδας των τριχοθεκενίων, είναι πολύ ισχυροί αναστολείς στην πρωτεϊνοσύνθεση ευκαρυωτικών κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν τη δράση της πεπτιδοτρανσφεράσης, απαραίτητο ένζυμο σε όλες τις διαδικασίες της μεταγραφής (tRNA) και ότι προκαλούν απόπτωση των πολυριβοσωμάτων. Τα τριχοθεκένια επιδρούν σχεδόν σε όλα τα όργανα του ανθρώπου. Η τοξική διατροφική αλευκία είναι μια καλά μελετημένη ασθένεια που έχει αποδοθεί στις τριχοθεκένια. Η ασθένεια προκαλεί μια πληθώρα διαταραχών όπως διάρροια, εμετό, φλεγμονές, δερματικούς ερεθισμούς, αναιμία, και νευρολογικές παθήσεις. Στην οξεία της φάση τα συμπτώματα είναι νεύρωση στη στοματική κοιλότητα, αιμορραγία από τη μύτη και τα γεννητικά όργανα καθώς και κλονισμό του νευρικού συστήματος. Μια άλλη ασθένεια που αποδίδεται στα τριχοθεκένια είναι η σταχυβοτρυτοξίκωση (*stachybotryotoxicosis*). Σε αυτήν την ασθένεια είχαν αποδοθεί αρχικά, οι αυξανόμενοι θάνατοι αλόγων και είχαν συνδεθεί με μουχλιασμένο άχυρο και σανό. Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι ο άνθρωπος δύσκολα μπορεί να προσβληθεί από αυτή την ασθένεια. Μελέτες όμως απέδειξαν ότι ο μύκητας *Stachybotrys* αναπτύσσεται σε όλα τα οικοδομικά υλικά που περιέχουν κυτταρίνη (υλικά μόνωσης, κεραμίδια, κλιματιστικά). Τα συμπτώματα που εμφανίζονται είναι υποθερμία στην μύτη και στο στόμα, ανορεξία, κατάπτωση, αιμορραγίες. Δεδομένου ότι η ομάδα των τριχοθεκενίων περιλαμβάνει πολλά μέλη, αυτά παρουσιάζουν διαφορετική βιολογική δραστηριότητα με αποτέλεσμα οι τιμές LD<sub>50</sub> να ποικίλουν. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι, για τα ποντίκια έχει βρεθεί ότι οι τιμές LD<sub>50</sub> για τη Δεοξυνιβαλενόλη είναι 70 mg/kg ανά βάρος σώματος, για την Βερρουκαρίνη Α είναι 0,5 mg/Kg ανά βάρος σώματος, ενώ για την T-2 τοξίνη είναι 5,2 mg/Kg ανά βάρος σώματος.

Τοξικές επιδράσεις Τριχοθεκενίων: Αιμορραγίες εντέρων, πρόκληση νευρικών διαταραχών, ογκογόνο δράση, οιστρογονική δράση.

### 3.11 Ωχρατοξίνη Α

Η Ωχρατοξίνη Α είναι κυρίως νεφροτοξική, ηπατοτοξική, ανοσοτοξική. Επίσης, προκαλεί τερατογένεση και καρκινογένεση. Ο διεθνής οργανισμός για την έρευνα του καρκίνου (International Agency for Research on Cancer IARC), έχει ταξινομήσει την Ωχρατοξίνη Α στην δεύτερη ομάδα των καρκινογόνων ουσιών. Η Ωχρατοξίνη Α διαταράσσει την κυτταρική λειτουργία με πολλούς τρόπους. Η δράση της εστιάζεται κυρίως στα ένζυμα που επιδρούν στο μεταβολισμό της

φαινυλαλανίνης, αναστέλλοντας τη δράση του ενζύμου που ευθύνεται για την σύνθεση του συμπλόκου φαινυλαλανίνη- tRNA. Έχει ανιχνευτεί στο αίμα και στο γάλα των ζώων και των ανθρώπων. Θεωρείται υπεύθυνη για τη νεφροπάθεια που παρουσιάζουν τα χοιροειδή στις Σκανδιναβικές χώρες. Η ασθένεια έχει ενδημικό χαρακτήρα στη Δανία όπου, τα ποσοστά στη νεφρική ανεπάρκεια των χοιροειδών και η μόλυνση των ζωοτροφών με Ωχρατοξίνη Α συσχετίζονται. Αρκετές τοξικολογικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για την Ωχρατοξίνη Α, το όριο το οποίο έχει θεσπιστεί είναι κάτω του 5 mg/Kg ανάλογα με το βάρος του σώματος. Δεδομένου ότι τα συμπτώματα από την έκθεση σε Ωχρατοξίνη Α μοιάζουν με αυτά της νεφρικής ανεπάρκειας χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή και τη διάγνωση. Οι ωχρατοξίνες είναι αρκετά τοξικές και έχουν μεγάλη καρκινογόνα δράση. Η ωχρατοξίνη είναι μυκοτοξίνη που συγκεντρώνει ολόένα και περισσότερο ενδιαφέρον, γιατί αποδεικνύεται τρομερά επικίνδυνη για τον άνθρωπο αλλά και τα ζώα (Ghitakou *et al*, 2006).

Τοξικές επιδράσεις των Ωχρατοξινών :

- Νεφροτοξικότητα
- Ανοσοκαταστολή
- Ηπατοτοξικότητα
- Καρκινογόνο δράση

### 3.12 Συμπτώματα μυκοτοξίκωσης

Η έκθεση του ανθρώπου και των ζώων σε μύκητες, μπορεί να οδηγήσει σε μία παθολογική κατάσταση, την μυκοτοξίκωση, η οποία προκαλεί ποικίλα συμπτώματα όπως:

- Αναπνευστική δυσκολία, βήχας, φτάρνισμα, ρινίτιδα, ασθματικές καταστάσεις
- Διαταραχές στις τιμές χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων
- Δυσκολία στην κατάποση, αίσθημα πνιγμού, βλενώδη πτύελα
- Πονοκέφαλοι, απώλεια μνήμης, υψηλή πίεση, ρινορραγίες
- Κάψιμο στο λάρυγγα και στους πνεύμονες, έντονη εφίδρωση κατά τον ύπνο
- Ναυτία, διάρροια, οξείς κοιλιακοί πόνοι, καρδιακή αρρυθμία
- Πόνοι στην κύστη, στο ήπαρ, στο σπλήνα και χρόνια κόπωση
- Επώδυνη ούρηση, σκοτεινόχρωμα ούρα
- Προβλήματα όρασης



- Βοή στα αυτιά, βαρηκοΐα, προβλήματα ισορροπίας
- Δυσάρεστη γεύση στο στόμα
- Πνευμονίες, πνευμονικά οιδήματα
- Πρησμένοι λεμφαδένες και απότομες μεταβολές σωματικού βάρους
- Προβλήματα θυρεοειδούς
- Απώλεια τριχοφυΐας, εύθραυστα νύχια
- Αναφυλαξία, αλλεργίες κάθε είδους
- Αστάθεια στην βάδιση
- Μυϊκή δυσκαμψία
- Προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα-Αποβολές
- Δυσκολία στην ομιλία
- Άνοια
- Άγχος, κατάθλιψη, ταχυκαρδία, σύγχυση
- Θάνατος σε ακραίες περιπτώσεις
- Χρόνια κόπωσης
- Μυϊκή δυσκαμψία
- Καρκίνοι

### 3.13 Τι πρέπει να γνωρίζει ο καταναλωτής

Κατ' αρχήν ο καταναλωτής θα πρέπει να γνωρίζει ότι γίνεται συστηματικός εργαστηριακός έλεγχος για την παρουσία μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Πολλές επίσης βιομηχανίες εφαρμόζουν σύστημα HACCP, δηλαδή "ανάλυση επικινδυνότητας στα κρίσιμα σημεία ελέγχου" κατά την παραγωγική διαδικασία και κατά την αποθήκευση και διάθεση των προϊόντων. Πολύ σημαντικό όμως είναι τι πρέπει να κάνει ο ίδιος ο καταναλωτής. Να προσέχει να μην καταναλώνει προϊόντα με αλλοιωμένα ή αλλαγμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Τα μουχλιασμένα τρόφιμα είναι πιθανόν να περιέχουν υψηλά επίπεδα μυκοτοξινών και δεν αρκεί να απομακρυνθεί το μουχλιασμένο μέρος, γιατί το προϊόν εξακολουθεί να είναι επικίνδυνο.

1. Να μην αποθηκεύει προϊόντα για μεγάλο χρονικό διάστημα, π.χ ξηρούς καρπούς, ξηρά φρούτα κ.λπ.
2. Να είναι επιφυλακτικός στα χωρίς επισήμανση " χύμα προϊόντα" καθώς και στα φερόμενα ως "είδη υγιεινής διατροφής", στα οποία, λόγω απουσίας

συντηρητικών, είναι δυνατόν να έχουν αναπτυχθεί μύκητες που βιοσυνθέτουν μυκοτοξίνες.

3. Το καλαμπόκι και οι ξηροί καρποί θεωρούνται τρόφιμα υψηλού κινδύνου για την πιθανή παρουσία της AFB1 και τα σιτηρά και το κόκκινο κρασί για την OTA.

Η μεγάλη ποικιλία των συμπτωμάτων καθιστά δύσκολη τη διάγνωση της μυκοτοξίκωσης, τα αίτια της οποίας είναι μία ομάδα εξαιρετικά τοξικών ουσιών που είναι γνωστές ως μυκοτοξίνες (mycotoxins). Οι αφλατοξίνες είναι εξαιρετικά τοξικές, καρκινογόνες, μεταλλαξιγόνες και ανοσοκατασταλτικές ουσίες. Η αφλατοξίνη B1 θεωρείται ως το ισχυρότερο γνωστό καρκινογόνο του ήπατος με αποδεδειγμένη γονοτοξικότητα. Σύμφωνα με τους Abdel-Wahhab and Aly (2003), οι αφλατοξίνες είναι ηπατοτοξικές, ηπατοκαρκινογονικές, μεταλλαξιογονικές και τερατογενετικές. Οι αφλατοξίνες, προκαλούν την οξειδωτική πίεση με την αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τη μείωση των ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών σε αφλατοξίνη. Η επικινδυνότητα των αφλατοξινών αυξάνεται ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ατόμων που πάσχουν από ηπατικές νόσους. Συγκεκριμένα, κατά την μόλυνση με τον ιό ηπατίτιδας, η έκθεση σε αφλατοξίνες αυξάνει τον κίνδυνο για ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Ο προσδιορισμός των αφλατοξινών στον άνθρωπο γίνεται με δύο τεχνικές. Η πρώτη τεχνική αφορά την μέτρηση της ένωσης με προσθήκη AFM1-γουανίνης στα ούρα. Η παρουσία αυτού του προϊόντος μεταβολισμού δείχνει έκθεση σε αφλατοξίνες. Παρόλα αυτά δεν είναι καλή μέθοδος λόγω της διάσπασης της ένωσης προσθήκης με το χρόνο. Η δεύτερη τεχνική στηρίζεται στον προσδιορισμό τη ένωσης προσθήκης AFB1-αλβουμίνης στο πλάσμα του αίματος. Ο προσδιορισμός αυτός είναι ακριβέστερος και είναι θετικός κατά 90% στα θετικά δείγματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μακροχρόνιες εκθέσεις σε αφλατοξίνη, αφού παραμένει θετικός μετά την έκθεση σε αφλατοξίνη ακόμα και μετά από 2-3 μήνες.

## **Κεφάλαιο 4: Στάδια - μέθοδοι και ανίχνευση - προσδιορισμός μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο**

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της μεσογειακής διατροφής και θεωρείται προϊόν υγιεινής διατροφής λόγω της περιεκτικότητάς του σε μονοακόρεστα λιπαρά. Το ελαιόλαδο είναι ουσιαστικά το έλαιο των καρπών της ελιάς και εξάγεται με έκθλιψη των ελιών, οι οποίες πρέπει να συλλέγονται πριν από την τελική τους ωρίμανση, όταν δηλαδή έχουν χρώμα πράσινο – μελιτζανί, καθώς η ποιότητα του λαδιού τους είναι πολύ καλύτερη από αυτή του λαδιού που εξάγεται από τους ώριμους καρπούς. Το ελαιόλαδο αποτέλεσε και συνεχίζει να αποτελεί αντικείμενο μελέτης για τις θρεπτικές και οργανοληπτικές του ιδιότητες. Είναι η σημαντικότερη πηγή διαιτητικού λίπους της μεσογειακής διατροφής, το οποίο μπορεί όμως να μολυνθεί από τις μυκοτοξίνες. Έχει αναφερθεί μια αποτελεσματική μέθοδος ανάλυσης, με την οποία μπορεί να προσδιοριστεί ταυτόχρονα η αφλατοξίνη Β1 (AFB1) και η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) στο ελαιόλαδο.

Με εφαρμογή της μεθόδου αναλύθηκαν τριάντα δείγματα παρθένου ελαιόλαδου που κυκλοφορούσαν στο εμπόριο στη Νότια Ιταλία και τη Βόρεια Αφρική. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και οικονομική μέθοδο που έχει αναπτυχθεί για τον ταυτόχρονο έλεγχο της AFB1 και της ΟΤΑ, στο ελαιόλαδο. Τα δεδομένα που ελήφθησαν έδειξαν ότι η ΟΤΑ ανιχνεύθηκε σε υψηλή συχνότητα, δηλαδή στο 80% των δειγμάτων από τις δύο γεωγραφικές περιοχές (έως 17,0 ng/g), ενώ η AFB1 βρέθηκε στα τρία από τα τέσσερα δείγματα της Βορείου Αφρικής μόνο (έως 2,4 ng/g).

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το δοχείο που περιέχει το λάδι μολύνεται σημαντικά από τις μυκοτοξίνες και επιβεβαιώνει την ανάγκη εφαρμογής του ευρωπαϊκού κανονισμού 1019/2002 (*Ευρωπαϊκή Επιτροπή 2002*), που απαγορεύει την πώληση ελαιόλαδου ιδιωτικής ετικέτας. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το «χωρίς ετικέτα» ελαιόλαδο (δηλαδή, το ελαιόλαδο που δεν διαθέτει επωνυμία και εμπορικό σήμα) μολύνεται από την ΟΤΑ περισσότερο από ότι τα επώνυμα δείγματα (έως 2,47 και 0,66 ng/g)

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα πιο σημαντικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής και οι φυσικοχημικές, οργανοληπτικές και διατροφικές του ιδιότητες έχουν μελετηθεί σε βάθος. Η Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων

ανακοίνωσε πρόσφατα τη διαθεσιμότητα μιας αλυσίδας μονοακόρεστων λιπαρών από ελαιόλαδο τα οποία μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο της στεφανιαίας νόσου (Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων Διοίκηση 2003).

Οι τιμές των οξέων, ΔΚ, και ο αριθμός υπεροξειδίου θεωρούνται ευρέως θρεπτικοί παραμέτροι που καθορίζουν την εμπορική κατηγορία του ελαιολάδου (Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (CEC) 1995). Οι δείκτες αυτοί συνήθως χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση του βαθμού οξείδωσης των βρώσιμων ελαίων και λιπών. Στην Ιταλία, η κατανάλωση ελαιόλαδου είναι 12-13 κιλά ανά άτομο ετησίως, σε σύνολο 750.000 τόνων και αξίας 3 δις ευρώ (Ismea 2003).

Πράγματι, το ελαιόλαδο διατίθεται στο εμπόριο ως «έξτρα παρθένο», «παρθένο» ή υποβαθμισμένο και η έλλειψη συμμόρφωσης του ακόμα και με μόνο μία από τις αναλυτικές παραμέτρους προκαλεί τον αποχαρακτηρισμό του ελαίου σε κατώτερη κατηγορία πώλησης. Μερικά από τα ποιοτικά πρότυπα είναι: η ελεύθερη οξύτητα, ο αριθμός υπεροξειδίου και οι σπεκτροφωτομετρικοί δείκτες, οι οποίοι είναι συγκεκριμένοι δείκτες γνησιότητας που στοχεύουν στην προστασία της υγείας του καταναλωτή. Οι μυκοτοξίνες είναι βιοενεργοί μεταβολίτες δευτέρου βαθμού που παράγονται από μύκητες που ανήκουν κυρίως στις οικογένειες *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*.

Οι αφλατοξίνες (AFS) που παράγονται από *A. flavus* και *A. Parasiticus* είναι πολύ σταθερές ενώσεις, διαλυτές σε πολικούς οργανικούς διαλύτες ή σε αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η AFS βρίσκεται ουσιαστικά στα εξής προϊόντα: φυστικά, ελαιώδεις σπόρους, αραβόσιτο και υποπροϊόντα, αμύγδαλα, ξύλα καρδιάς, φουντούκια και ξηρά σύκα (Galvano *et al.*, 2005). Η τοξικότητα AF είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων με τα νουκλεϊνικά οξέα και ιδιαίτερα στην έκφραση του p53 γονιδίου. Επιπλέον, θεωρούνται ισχυρά καρκινογόνες ουσίες, τερατογενούς και μεταλλαξιογενούς φύσης και θέτουν σε μεγάλο κίνδυνο τα ζώα και τον άνθρωπο (Chu 1991, Eaton & Groopman 1994, Galvano *et al.*, 2005).

Ο κίνδυνος μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο, είναι αρκετά σοβαρός (Arevalo & Gracian 1980, Tanoui-Elaraki *et al.*, 1983, Paster *et al.*, 1988, Bullerman & Mahjoub 1990, Yassa 1995, Eltem 1996, Visconti *et al.*, 1996). Οι ωχρατοξίνες είναι ομάδα μυκοτοξινών που παράγονται από τα διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*. Περιλαμβάνουν εννέα διαφορετικά μόρια, μεταξύ των οποίων τοξικότερη είναι η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ).

Η ΟΤΑ είναι διαλυτή σε οργανικούς πολικούς διαλύτες και μπορεί να βρεθεί ως φυσική πρόσμειξη σε διάφορα προϊόντα, όπως τα δημητριακά, ο καφές, το σταφύλι, τα αμύγδαλα, το κακάο και τα σύκα (Galvano et al 2005, Marjerus et al., 1993). Αν και οι καρποί της ελιάς μπορούν να επηρεαστούν από τοξικογενείς μύκητες πριν και μετά τη συγκομιδή, υπάρχουν λίγες αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με ελαιόλαδο και τη μόλυνση από ΟΤΑ (Le Tutour et al 1983, Markaki & Paraxrhstou 2004).

Τα αντικείμενα της παραπάνω μελέτης ήταν:

(1) η διερεύνηση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό AFB1 και ΟΤΑ στο ελαιόλαδο και

(2) η ανάλυση επώνυμων δειγμάτων ελαιολάδου για να ελεγχθεί η αναλυτική διαδικασία και να διερευνηθεί τυχόν μόλυνση στα δείγματα του παρθένου ελαιολάδου από δύο σημαντικές παραγωγικές περιοχές ελαιολάδου (νότια Ιταλία και Βόρεια Αφρική).

#### 4.1.1 Στάδια προσδιορισμού μυκοτοξινών

Οι πλέον αξιόπιστες μέθοδοι είναι αυτές που έχουν θεσπιστεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μυκοτοξινών, μέσω της εφαρμογής ουσιαστικά νέων πρακτικών μεθόδων. Όμως, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την ορθότητα και την αντιπροσωπευτικότητα της δειγματοληψίας ενός μολυσμένου καρπού. Ένα, επίσης, σημαντικό σημείο για την ανάλυση των μυκοτοξινών είναι ότι βρίσκονται συνήθως συνδυαστικά, δηλαδή δρουν σε συνεργασία με άλλες ουσίες. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την τοξίκωση σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με την παρουσία μίας μόνο μυκοτοξίνης.

Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) είναι ένα τοξικός μεταβολίτης που παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus Ochraceus* και *Penicillium Verrucosum* κ.α. (Scott, 1994). Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έχει κατατάξει την ωχρατοξίνη Α στη λίστα με τις «πιθανές καρκινογόνες για τον άνθρωπο ουσίες» (ομάδα 2B). (IARC, 1993) Επιπλέον, η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) θεωρείται υπεύθυνη για παθήσεις των νεφρών σε ορισμένες περιοχές των Βαλκανίων. (Castegnaro et al. 1991, Petkova-Bocharova and Castegnaro 1991). Η ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ) έχει ανιχνευθεί σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης, κυρίως στα σιτηρά και τις



υποκατηγορίες τους, αλλά και σε πράσινους κόκκους καφέ, το κακάο και άλλα τρόφιμα (Jørgensen και Bilde 1996, Patel et al. 1996, Thellmann και Weber 1997, Trucksess et al. 1999). Επιπλέον, οι μυκοτοξίνες μπορούν να μεταφερθούν από τις ζωοτροφές σε βρώσιμους ιστούς των ζώων, όπως το χοιρινό κρέας (Gareis 1996). Επίσης, ποτά όπως το κρασί, χυμοί, μύρες και καφέ μπορεί να περιέχουν σημαντικές ποσότητες της ωχρατοξίνης (Stegen et al. 1997, Visconti et al. 1999, Markaki et al. 2001, Tangui et al. 2002, Stefanaki et al. 2003).

Ελάχιστες πληροφορίες υπάρχουν, ωστόσο, σχετικά με τη μόλυνση του ελαιολάδου από την ωχρατοξίνη Α (ΟΤΑ). Οι ελιές συχνά αποθηκεύονται για εβδομάδες σε συνθήκες που προωθούν την ανάπτυξη της μούχλας (Tantaoui-Elaraki et al. 1983, Le Tutour et al. 1984, Samane et al. 1991). Αν και οι ανοσοσυγγενείς διαδικασίες καθαρισμού που χρησιμοποιούνται ευρέως στις αναλύσεις τροφίμων (Scott και Trucksess 1997), ο καθαρισμός στο ελαιόλαδο περιλαμβάνει διάλυμα αιθυλεστέρα και προσδιορισμό με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) (Le Tutour et al., 1983).

Στον Πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται ορισμένα στοιχεία για τις αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των κυριότερων μυκοτοξινών στα τρόφιμα, καθώς και τα όρια της εφαρμογής των μεθόδων αυτών.

**Πίνακας 8:** Όρια εφαρμογής διάφορων αναλυτικών τεχνικών για τον ποσοτικό έλεγχο ορισμένων μυκοτοξινών

| Είδος                     | Μυκοτοξίνη         | Μέθοδος | LD50<br>ανίχνευσης (mg ανά Kg σώματος) |
|---------------------------|--------------------|---------|--|
| Αφλατοξίνη Β <sub>1</sub> | Παιδικές τροφές    | HPLC    | 0,07-0,18                              |
| Αφλατοξίνη Β <sub>1</sub> | Φιστίκια           | HPLC    | 3-15                                   |
| Αφλατοξίνη Β <sub>2</sub> | Αμύγδαλα           | HPLC    | 1-3                                    |
| Αφλατοξίνη Β <sub>2</sub> | Σκόνη πάπρικας     | HPLC    | 0,1-1,3                                |
| Αφλατοξίνη G <sub>1</sub> | Αμύγδαλα           | HPLC    | 2-9                                    |
| Αφλατοξίνη G <sub>1</sub> | Φυστικοβούτυρο     | HPLC    | 0,3-3,3                                |
| Αφλατοξίνη Μ <sub>1</sub> | Γάλα σε σκόνη τυρί | TLC     | 0,3                                    |
| Αφλατοξίνη Μ <sub>1</sub> | Γάλα               | HPLC    | 0,08-1,3 mg/ml                         |
| Αφλατοξίνη Μ <sub>1</sub> | Γάλα σε σκόνη      | ELISA   | 0,15-0,4                               |

|                 |               |       |               |
|-----------------|---------------|-------|---------------|
| Αεοξυνιβαλενόλη | Σιτάρι        | TLC   | 50-1000       |
| Φουμονισύνη B2  | Καλαμπόκι     | HPLC  | 50-2000       |
| Φουμονισύνη B2  | Καλαμπόκι     | HPLC  | 50-750        |
| Φουμονισύνη B2  | Καλαμπόκι     | HPLC  | 100-1600      |
| Ωχρατοξίνη A    | Κριθάρι       | TLC   | 25-100        |
| Ωχρατοξίνη A    | Μπύρα         | HPLC  | 0,2-1,5 mg/ml |
| Ωχρατοξίνη A    | Λευκό κρασί   | HPLC  | 0,1 -2 mg/ml  |
| Ωχρατοξίνη A    | Κόκκινο κρασί | HPLC  | 0,2-3 mg/ml   |
| Πατουλίνη       | Χυμός μήλου   | HPLC  | 20-200 mg/ml  |
| Ζεαραλενόνη     | Καλαμπόκι     | TLC   | 100-2000      |
| Ζεαραλενόνη     | Καλαμπόκι     | HPLC  | 50-4000       |
| Ζεαραλενόνη     | Καλαμπόκι     | ELISA | 800           |

---

Γενικώς παρατηρείται μια ιδιαίτερη ανησυχία σε παγκόσμιο επίπεδο. Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε ότι οι ανησυχίες αυτές προκύπτουν από το γεγονός ότι:

α) Για πολλές από τις τοξίνες αυτές δεν υπάρχουν επαρκή τοξικολογικά δεδομένα και ανώτατα επίπεδα ημερήσιας πρόσληψης για τον άνθρωπο και τα ζώα.

β) Δεν υπάρχουν μέγιστα επιτρεπτά όρια για πολλές από αυτές.

Σε αντιμετώπιση των κινδύνων αυτών εφαρμόζονται:

α) Θέσπιση σειράς κανονισμών: 466/2001, 1881/2006, 1126/2007 για τον καθορισμό μέτρων ελέγχου και μέγιστων επιτρεπτών ορίων στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές.

β) Πολλοί από τους κανονισμούς τροποποιούνται και αναθεωρούνται σύμφωνα με νέες πληροφορίες του Codex Alimentarius (WHO, FAO).

γ) Αποφασίστηκε η ίδρυση Κοινοτικού Εργαστηρίου (IP/07/334, Βρυξέλες 15/3/07) για τον έλεγχο των μυκοτοξινών στις χώρες της ΕΕ.

Πίνακας 9: Μέγιστα Επιτρεπτά Όρια (MLs)

| Mycotoxins                | EU   | USA  |
|---------------------------|--|--|
| Aflatoxins B1, B2, G1, G2 | 2 ppb B1<br>4 ppb B1, B2, G1, G2<br>20 ppb ζωοτροφές   | 20 ppb για τροφές<br>100-300 ppb ζωοτροφές                       |
| Aflatoxin M1              | 0,5 ppb για γάλα   | 0,5 ppb για γάλα   |
| Ochratoxin A (OTA)        | 10 µg/kg σταφίδες, σταφύλια<br>2 µg/l κρασί και χυμούς σταφ.<br>5 µg/kg σπόρους δημητριακών<br>3 µg/kg προϊόντα σιτηρών<br>0,5 µg/kg παιδικές τροφές | No regulation in the USA   |
| Fumonisin                 | 4 mg/kg FB1 στα σιτηρά<br>1 mg/kg τρόφιμα με σιτηρά<br>0,2 mg/kg για παιδικές τροφές με βάση<br>σιτηρά<br>5-100 ppm ζωοτροφές                        | 2-4 ppm για τροφές<br>5-100 ppm για ζωοτροφές                    |
| Zearalenone (ZEA)         | 100 µg/kg για σιτηρά εκτός καλαμπόκι<br>350 µg/kg για καλαμπόκι<br>75 µg/kg για άλευρα εκτός καλαμπόκι<br>20 µg/kg για βρεφικές τροφές               | No regulation in the USA<br>1 ppm (προτείνεται)                  |
| Deoxynivalenon (DON/F2)   | 400-500 ppb for human and animal   | 1 ppm για δημητριακά<br>5-10 ppm για δημητριακά για<br>ζωοτροφές |
| Patulin                   | 50 ppb χυμό μήλων<br>25 ppb νωπά φρούτα<br>10 ppb παιδικές τροφές  | No regulation in the USA   |
| Other mycotoxins          |  | No regulation in the USA   |

Σε μελέτη των Daradimos *et al.* (2000) έχουν εξετασθεί 50 δείγματα ελαιολάδου της ελληνικής γης και αποκάλυψαν την παρουσία αφλατοξίνης B1 (AFB1) στο 72% των δειγμάτων. Πενήντα δείγματα των παρθένων ελαιολάδων, που παράχθηκαν μεταξύ 1998 και 2001, συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του 2001. Εικοσιπέντε από τα δείγματα συλλέχθηκαν από τους παραγωγούς και 25 από την αγορά της Αθήνας. Τα δείγματα του ελαιολάδου προήλθαν από τη Βόρεια Ελλάδα (Μακεδονία), Δυτική Ελλάδα (Ηπειρος, Αργίριο, Ιόνια νησιά), την Κεντρική Ελλάδα (Στερεά Ελλάδα, Θεσσαλία), Ανατολική Ελλάδα και Νότια Ελλάδα (Πελοπόννησος, Κρήτη). Ανάμεσά τους, τέσσερα δείγματα έφεραν την ένδειξη «Βιολογικά Γεωργικά Προϊόντα». Τα δείγματα φυλάχθηκαν κλειστά και μακριά από το φως, σε δροσερό μέρος μέχρι να αναλυθούν.

Η ωχρατοξίνη Α (OTA) και η αφλατοξίνη Β1 (AFB1) αγοράστηκαν από τη Sigma Chemical Co (St Louis, MI, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής). Χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα Millipore και η στήλη C18 Nova-Pak HPLC ήταν από την Waters (Millipore, Milford, MA, USA). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC, ενώ οι διαλύτες ήταν καθαρότητας HPLC και αγοράστηκαν από τη LAB SCAN. Το οξικό οξύ ήταν από την Merck (Darmstadt, Γερμανία) και το τριφθοριούχο βόριο από τη Sigma.

Τα στάδια ανίχνευσης για OTA και AFB1 στο ελαιόλαδο είναι τα εξής:

**1. Εκχύλιση.** Ένα δείγμα ελαίου ελιάς (10 g) αναμίχθηκε με 10 ml μεθανόλης και νερού (80 + 20 v / v) και ανακινείται καλά για 2 λεπτά. Το μίγμα μεταφέρθηκε σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρείται σε 4000 rpm μέχρι η καθίζηση να είναι πλήρης (20 λεπτά).

**2. Καθαρισμός.** Δύο χιλιοστόλιτρα από το παραπάνω μίγμα (10 ml) αραιώθηκαν με 40 ml PBS και αναμίχθηκαν για 1 λεπτό. Το μίγμα φορτώνεται στη στήλη Ochrarper (με ρυθμό ροής 2 ml/min) και πλύθηκε μία φορά με 20 ml ύδατος. Η στήλη στη συνέχεια αφήνεται να στεγνώσει με διέλευση αέρα μέσα από αυτή. Η ωχρατοξίνη Α (OTA) εκλείεται προσεκτικά με 2ml από διάλυμα μεθανόλης και οξικού οξέος (με ρυθμό ροής 0,3 ml/min). Το έκλουσμα στη συνέχεια εξατμίζεται μέχρι ξηρού υπό ήπιο ρεύμα αζώτου. Το υπόλειμμα διαλύθηκε αμέσως σε 200-500 ml στη κινητή φάση και ένα δείγμα κρατήθηκε στους 18°C για ανάλυση και επιβεβαίωση (Markaki et al. 2001). Η συγκέντρωση των OTA σε δείγματα ελαιολάδου υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{OTA (ng kg}^{-1}\text{)} = a \times b \times d \times 1000 / e \times c \times w$$

Όπου:

a: είναι η OTA σε ng

b: είναι ο όγκος της κινητής φάσης

d: είναι ο όγκος του υπερκείμενου H<sub>2</sub>O που εκχύεται

e: είναι ο επιπλέον όγκος που χρησιμοποιήθηκε

c: είναι ο όγκος που εκχύεται

w: είναι το βάρος του δείγματος

**3. Επιβεβαίωση.** Η επιβεβαίωση της παρουσίας ΟΤΑ πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της παραγωγοποίησης με μεθυλεστέρα και τον προσδιορισμό του παραγώγου των ΟΤΑ (ΜΕΤΟΤΑ) (Lerch και Mu Ller 1990). Ένα κλάσμα του εκλούσματος με ανοσοσυγγένεια ξηράνθηκε και διαλύθηκε σε ένα μεθανολικό διάλυμα του τριφθοριούχου βορίου και θερμάνθηκε στους 60°C για 15 λεπτά.

Ο προσδιορισμός της αφλατοξίνης Β1 (AFB1) έχει περιγραφεί λεπτομερώς από τον Daradimos *et al.* (2000). Δέκα γραμμάρια δείγματος αναμίχθηκαν με 10 ml μεθανόλης και νερού. Μετά από φυγοκέντρηση, 1ml από το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 9ml νερό. Το μίγμα μεταφέρθηκε πάνω σε μία στήλη Aflarper. Η AFB1, εκλούστηκε με 2 ml ακετονιτριλίου και εξατμίζεται μέχρι να ξηρανθεί.

Ένα παράγωγο της AFB1 (AFB2a, ημιακετάλης AFB1) παρασκευάστηκε με προσθήκη 200 ml εξανίου και 200 ml τριφθοροξικού οξέος στο εξατμισμένο διάλυμα AFB1. Στη συνέχεια θερμάνθηκε στους 40°C σε ένα λουτρό νερού για 10 λεπτά και εξάτμιση έως ξηρού, επαναδιάλυση σε 200-500 ml ακετονιτριλίου νερού και αναλύθηκε με HPLC. Η AFB2a δείχνει ενισχυμένη σε σύγκριση με το φθορισμό AFB1 (Stubblefield 1987).

Όσον αφορά τη γραμμικότητα από ένα μητρικό διάλυμα ΟΤΑ 1mg/ml σε 1ml μεθανόλης παρασκευάστηκε διάλυμα 10 mg/ml με αραιώση 10 ml από το μητρικό διάλυμα σε 1 ml μεθανόλης.

Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng/ml ως εξής: Ένα κλάσμα από το διάλυμα των 10 mg/ml εξατμίζεται μέχρι ξηρού και διαλύθηκε με 1 ml κινητής φάσεως. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκαν διαλύματα ωχρατοξίνης Α σε κινητή φάση με συγκεντρώσεις 20, 10, 5, 2 και 1 ng/ml. Ο όγκος που εισήχθηκε στη στήλη ήταν 20 μl. Χρησιμοποιήθηκε η γραμμική παλινδρόμηση για την παρασκευή πρότυπων καμπύλων με τη χρήση του εμβαδού των κορυφών των πέντε διαλυμάτων. Η εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ήταν:

$$E = 4.83(\pm 0.04) \times 10^6 \times C + 2.90(\pm 0.47) \times 10^4$$
$$r = 0.99995, \quad RSD = 0.7\%,$$

Όπου:

E: είναι το εμβαδόν της κορυφής της ΟΤΑ

C: είναι τα ng της ενιομένης ΟΤΑ



r: είναι ο συντελεστής παλινδρόμησης της καμπύλης

RSD: ο μέσος συντελεστής ανάκτησης

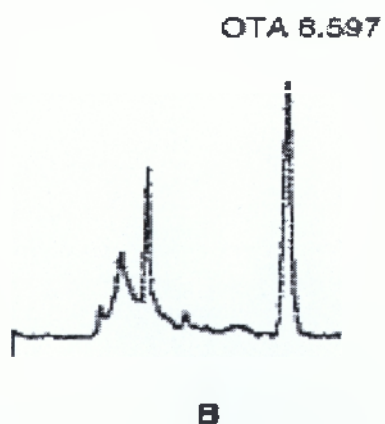
Πίνακας 10 : συνοπτική περιγραφή των συλλεχθέντων δειγμάτων:

|     |                                  |              |
|-----|----------------------------------|--------------|
| L1  | Riva degli Angeli (LE), Italy    | not labelled |
| L2  | Porto Cesareo-Veglie (LE), Italy | not labelled |
| L3  | Porto Cesareo (LE), Italy        | not labelled |
| L4  | Porto Cesareo (LE), Italy        | not labelled |
| L5  | Porto Cesareo (LE), Italy        | not labelled |
| L6  | Veglie (LE), Italy               | not labelled |
| L7  | Veglie (LE), Italy               | not labelled |
| L8  | Cellina (LE), Italy)             | not labelled |
| L9  | Carluccio (LE), Italy            | not labelled |
| L10 | Carluccio (LE), Italy            | not labelled |
| L11 | Nociara (LE), Italy              | not labelled |
| L12 | Chirella (LE), Italy             | not labelled |
| M1  | Morocco                          | not labelled |
| M2  | Morocco                          | not labelled |
| M3  | Morocco                          | not labelled |
| P1  | Bari, Italy                      | not labelled |
| P2  | Bari, Italy                      | not labelled |
| P3  | Taranto, Italy                   | not labelled |
| P4  | Sasso, Italy                     | labelled     |
| P5  | Pisciotta (SA), Italy            | not labelled |
| P6  | Bitonto (BA), Italy              | labelled     |
| P7  | COOP, Italy                      | labelled     |
| P8  | Gragnano (NA), Italy             | not labelled |
| P9  | Salerno, Italy                   | not labelled |
| P10 | Sicilia, Italy                   | not labelled |
| P11 | Ogliarola Giovinazzo (FG), Italy | labelled     |
| P12 | Salerno, Italy                   | labelled     |
| P13 | BIOFAM, Italy                    | labelled     |
| S1  | Salerno, Italy                   | labelled     |

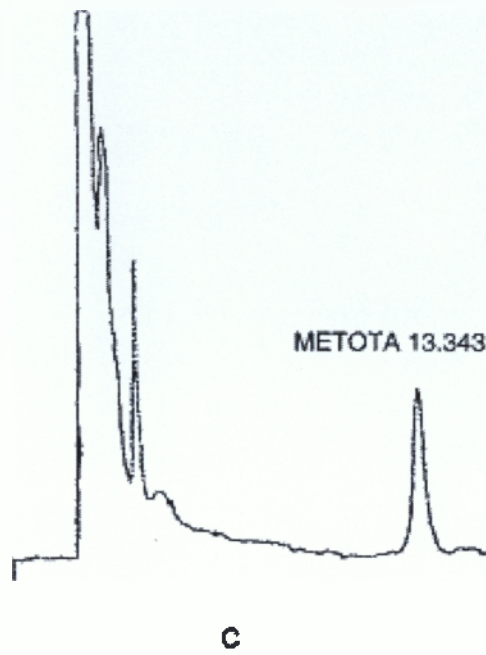
---



Σχήμα Α. Το χρωματογράφημα της ωχρατοξίνης Α (OTA),  $5 \text{ ng ml}^{-1}$



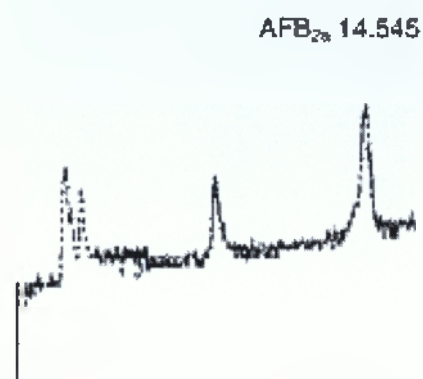
Σχήμα Β. Δείγμα ελαιολάδου που εμπεριέχει την ωχρατοξίνη Α (OTA)  $160 \text{ ng kg}^{-1}$



Σχήμα Γ. Ελαιόλαδο το οποίο εμπεριέχει 660 ng Kg<sup>-1</sup> ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ)

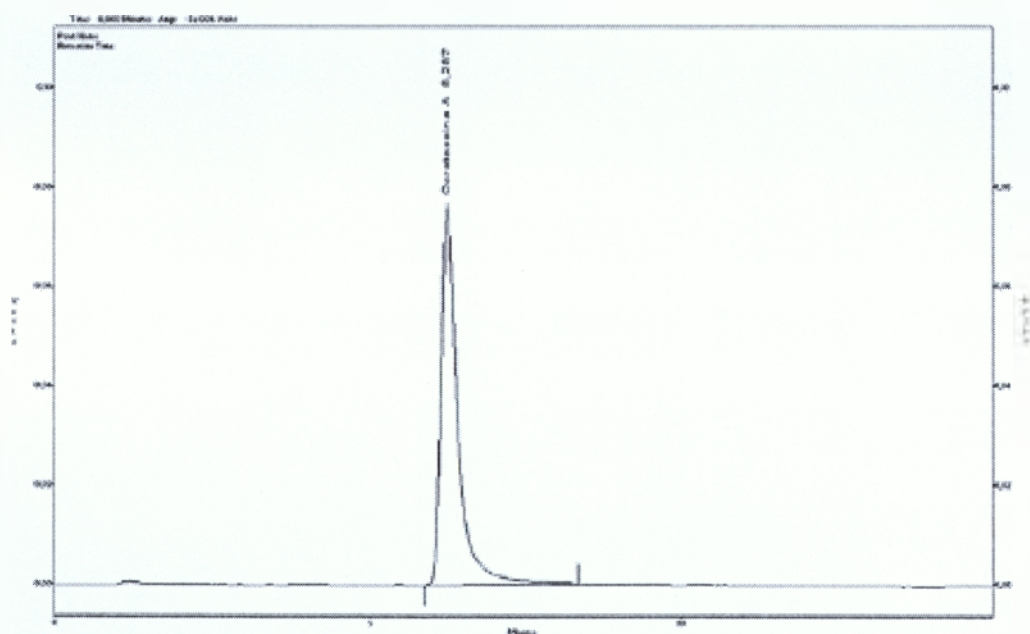


Σχήμα Δ. Πρότυπο δ/μα AFB<sub>2</sub> 2.5 ng ml<sup>-1</sup>

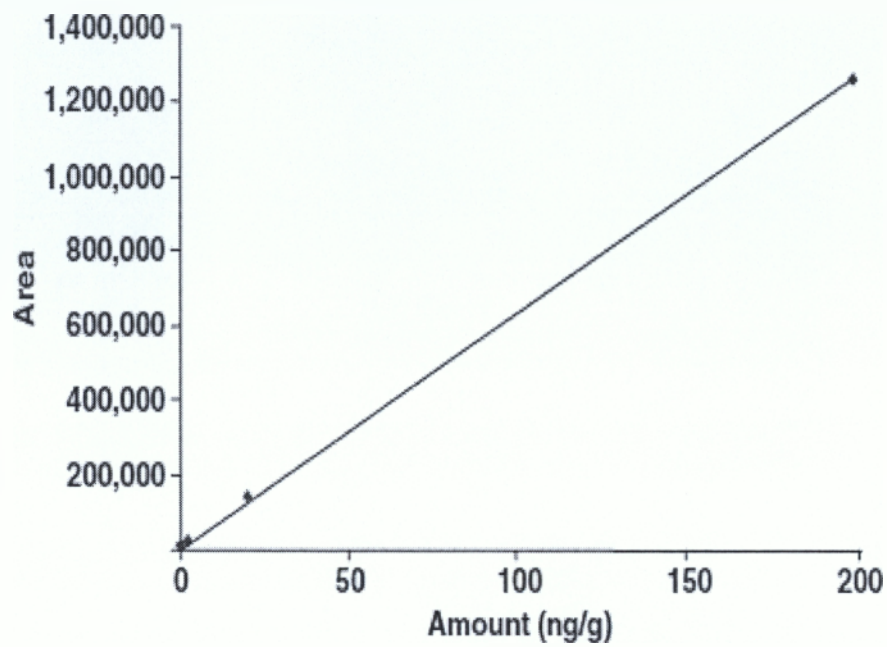


**E**

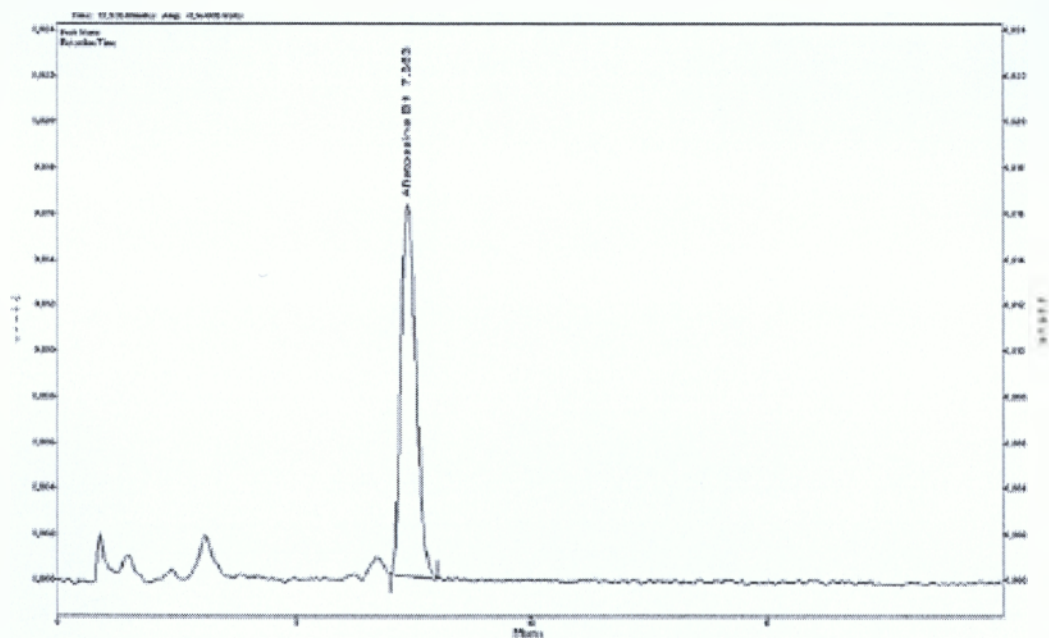
Σχήμα E. Ελαιόλαδο το οποίο εμπεριέχει αφλατοξίνη B1 (AFB1) 60 ng Kg<sup>-1</sup>.



A. Χρωματογράφημα της ωχρατοξίνης A 200 ng Kg<sup>-1</sup>

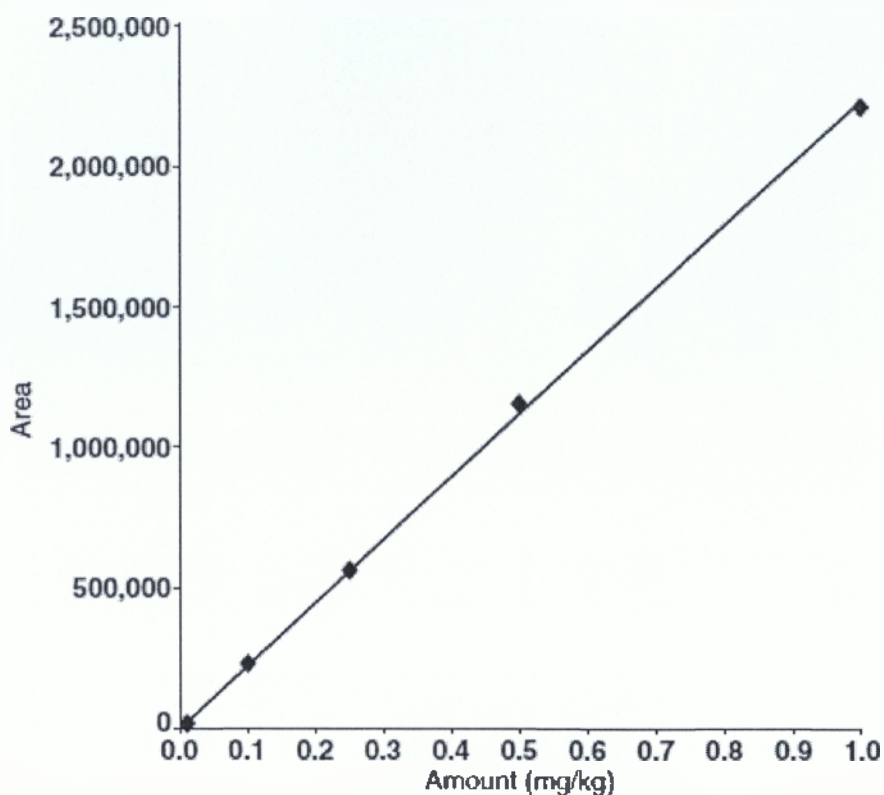


Εικόνα 1 : καμπύλη βαθμονόμησης της ΟΤΑ.



Β. Χρωματογράφημα της αφλατοξίνης B1 200 ng Kg<sup>-1</sup>





Εικόνα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης της AFB1

Εν κατακλείδι, τα επώνυμα ελαιόλαδα προσφέρουν μεγαλύτερες εγγυήσεις, όπως οι δείκτες της ποιότητας του ελαιολάδου. Αντίθετα, τα ελαιόλαδα χωρίς ετικέτα δεν προσφέρουν καμία εγγύηση, επειδή ο τίτλος έξτρα παρθένο ελαιόλαδο δεν υποστηρίζεται από την ανάλυση. Τέλος, τα δείγματα εμφιαλωμένου ελαίου φαίνεται να είναι ασφαλέστερα, επειδή η εμφάνιση ΟΤΑ ήταν κατά μέσο όρο τέσσερις φορές λιγότερο από αυτά που δε φέρουν ετικέτα (0,66 έναντι 2,47 ng gr<sup>-1</sup>). Επιπλέον, το 13% των δειγμάτων χωρίς ετικέτα ήταν μολυσμένα με αφλατοξίνη Β1 (AFB1).

#### 4.1.2 Μέθοδος: χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Η πρώτη τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των μυκητοξινών είναι η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευρέως διαδεδομένη λόγω της απλότητας της. Επίσης, με αυτήν την τεχνική μπορούν να διαχωριστούν σχεδόν όλες οι μυκοτοξίνες. Το μοναδικό της μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι τα διάφορα παράγωγα των μυκοτοξινών δύσκολα διαχωρίζονται, καθώς και ότι η μέθοδος έχει μικρή επαναληψιμότητα συνεπώς και χαμηλή ακρίβεια.

Η χρωματογραφία TLC είναι μια αρκετά απλή μορφή χρωματογραφίας και ανάλογη της χρωματογραφίας χάρτου, αλλά αντ' αυτού χρησιμοποιείται λεπτή στιβάδα προσροφητικού υλικού που στηρίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια (συνήθως οξειδίο πυριτίου ή αργύλου πάνω σε γυάλινη πλάκα). Έχει πολύ καλύτερη ικανότητα διαχωρισμού από την χρωματογραφία χάρτου. Επίσης επιτρέπει την εμφάνιση "αόρατων" ουσιών με πολύ πιο έντονα μέσα (π.χ. διαβροχή με θειικό οξύ - κάτι που θα κατέστρεφε το χαρτί). Ο λόγος της απόστασης που διήνυσε η κάθε ουσία προς την απόσταση που διήνυσε ο διαλύτης ( $R_f$ ), για κάθε σύστημα υλικού προσρόφησης-διαλύτη-θερμοκρασίας είναι φυσική σταθερά για την κάθε ουσία.

Για παράδειγμα, αν χρησιμοποιηθεί διαλύτης εξάνιο - ισοπροπανόλη 5:1, ξηρό χαρτί Whatman No1 και σε θερμοκρασία 25 βαθμούς Κελσίου μία ουσία που έχει  $R_f$  0.55, αυτό σημαίνει ότι αν ο διαλύτης κινηθεί 10 εκατοστά, η ουσία θα μετακινηθεί 5,5 εκατοστά. Αν κινηθεί 20 εκατοστά, η ουσία θα μετακινηθεί 11 εκατοστά κ.ο.κ. Δηλαδή αναπτύσσοντας ένα χρωματογράφημα, μπορούμε να εκτιμήσουμε και ποιες ουσίες είναι αυτές που διαχωρίστηκαν.

Είναι σύνηθες επειδή ακριβώς μπορεί από πείραμα σε πείραμα κάποιες συνθήκες να διαφέρουν ελάχιστα, αλλά να έχουν μεγάλη επίδραση στο  $R_f$ , παράλληλα με το δείγμα "τρέχουν" πρότυπες ουσίες (τοποθετείται μια κηλίδα τους δίπλα στην κηλίδα του δείγματος και μετά αναπτύσσεται το χρωματογράφημα). Μετά την ανάπτυξη, όσο έχει μετακινηθεί η πρότυπη ουσία, τόσο πρέπει να έχει μετακινηθεί και η μελετώμενη ουσία του δείγματος. Δηλαδή, ουσιαστικά προσδιορίζεται το  $R_f$  για τις συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος.

#### 4.1.3 Μέθοδος HPLC: υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Υπάρχουν ορισμένες τεχνικές που αναλύθηκαν όπως είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής επίδοσης καθώς και η αέρια χρωματογραφία (GC), οι οποίες έδωσαν αξιόπιστα αποτελέσματα με πολύ καλή επαναληψιμότητα. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των Αφλατοξινών, των Φουμονισινών, των Ωχρατοξινών καθώς και για τη Πατουλίνη και τη Κιτρινίνη. Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της Δεοξυνιβαλενόλης, της Πατουλίνης και των Φουμοισινών. Η φασματοσκοπία μάζας (MS) εφαρμόζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών. Η χρωματογραφία υπερκρίσιμου υγρού επίσης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των Αφλατοξινών της Δεοξυνιβαλενόλης και της Ζεαραλενόλης.

Η χρωματογραφία είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές διαχωρισμού και μέθοδος ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης, που βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους. Στηρίζεται στο διαχωρισμό, με βάση τις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δυο φάσεων. Η μία παραμένει σταθερή και ονομάζεται *στατική φάση*, και η άλλη διέρχεται μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της στατικής φάσης, και ονομάζεται *κινητή φάση*.

Η τεχνική της *Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Επίδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)* αποτελεί επέκταση της κλασσικής υγρής χρωματογραφίας με βαρυτική ροή. Η κύρια διαφορά τους είναι, ότι η πρώτη χρησιμοποιεί ως πληρωτικό υλικό σωματίδια μεγέθους μερικών μικρομέτρων με αποτέλεσμα να είναι απαραίτητη η εφαρμογή μεγάλης πίεσης για να εξασφαλισθεί η επιθυμητή ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι ότι οι HPLC στήλες έχουν αισθητά βελτιωμένες αποδόσεις σε σχέση με αυτές της κλασσικής υγρής χρωματογραφίας.

Η μέθοδος HPLC (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης) είναι η πιο χρησιμοποιημένη μέθοδος προσδιορισμού μυκοτοξινών. Είναι η μέθοδος χρωματογραφίας στήλης, η οποία εκτελείται με τη βοήθεια ενός συγκροτήματος οργάνων (συσκευή υγρού χρωματογράφου). Ανάλογα με το είδος της στατικής φάσης, η μέθοδος HPLC αποδίδει χρωματογραφικούς διαχωρισμούς σύμφωνα με τις αρχές προσρόφησης ή της κατανομής ή συνδυασμού αυτών, ή της ιοντο-ανταλλαγής ή τέλος της μοριακής διήθησης. Η συσκευή HPLC αποτελείται από διάφορα όργανα

και εξαρτήματα, τα οποία συνδεδεμένα λειτουργούν ως ενιαίο συγκρότημα. Τα βασικότερα από αυτά είναι:

- Οι φιάλες των υγρών διαλυτών της κινητής φάσης. Είναι κοινές γυάλινες φιάλες αντιδραστηρίων στις οποίες τοποθετούνται είτε καθαροί οργανικοί διαλύτες ή νερό υψηλής καθαρότητας ή διαλύματα ή μίγματα αυτών.
- Ο θάλαμος εισαγωγής του δείγματος. Στο θάλαμο αυτό εισάγεται το δείγμα υπό μορφή διαλύματος με ειδική σύριγγα. Το δείγμα παραμένει εκεί μέχρι να το παραλάβουν οι διαλύτες της κινητής φάσης και να το οδηγήσουν προς τη στήλη.
- Η στήλη ανάλυσης του δείγματος. Είναι ένας ευθύγραμμος κυλινδρικός σωλήνας από ανοξείδωτο ατσάλι μικρού μήκους και διαμέτρου, που στο εσωτερικό του βρίσκεται ειδικά συσκευασμένο υπό πίεση το προσροφητικό υλικό επί του οποίου θα γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Τα συστατικά αυτά, μεταφέρονται από τους διαλύτες της κινητής φάσης από τη στήλη προς τον ανιχνευτή.
- Οι αντλίες πίεσης για τη ροή των διαλυτών, με τη βαλβίδα ανάμιξης και προγραμματισμού ροής αυτών. Είναι παλινδρομικές αντλίες με τις οποίες παραλαμβάνονται οι διαλύτες από τις φιάλες με πίεση, διέρχονται από τον εγχυτή και οδεύουν προς τη στήλη. Ο αναμίκτης – προγραμματιστής ροής είναι ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενος και ελέγχει την πίεση και τη ροή των διαλυτών καθώς και την αναλογία ανάμιξης και μεταβολής αυτής κατά τη διαδικασία της ανάλυσης.
- Ο ανιχνευτής ή οι ανιχνευτές για την ανίχνευση των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος. Είναι ένα ανεξάρτητο όργανο υψηλής τεχνολογίας, το οποίο υποδέχεται το έκλουσμα των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος, ανιχνεύοντας τα ένα προς ένα, ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Το σήμα του ανιχνευτή μεταβιβάζεται στο σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων.
- Το σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων, αποτελούμενο από τον ολοκληρωτή ή τον υπολογιστή, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και από τον καταγραφέα, για την καταγραφή του χρωματογραφήματος.

Τα συστατικά διαχωρίζονται καθώς διέρχονται από τη στατική φάση της στήλης, με τη βοήθεια της κινητής φάσης που αποτελείται από διαλύτες κατάλληλης

πολικότητας για το διαχωρισμό. Από τη σύγκριση του χρόνου έκλουσης με αυτούς των προτύπων ουσιών σε όμοιες χρωματογραφικές συνθήκες, γίνεται προσδιορισμός του κάθε συστατικού.

#### 4.1.4 Μέθοδος: αέριος χρωματογραφία GC (gas chromatography)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μόνο για μερικές από τις μυκοτοξίνες. Η αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC) είναι η τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη γνωστή τεχνική στην ανάλυση μιγμάτων πτητικών οργανικών ενώσεων. Έχει χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό, ταυτοποίηση και ανάλυση όλων σχεδόν των αερίων και πτητικών υγρών μιγμάτων σε δείγματα φαρμάκων, βενζίνης, περιβαλλοντικών δειγμάτων αέρα και υδάτων, κ.α. Η γρήγορη ανάπτυξη της αεριοχρωματογραφίας, από τη στιγμή της εμφάνισής της στις αρχές της δεκαετίας του '50, δείχνει ότι είναι σχετικά απλή και χαμηλού κόστους τεχνική.

Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα ενίεται στον εισαγωγέα, όπου εξατμίζεται ταχύτατα και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης (στατική φάση) καθώς παρασύρεται από κινούμενο αδρανές αέριο. Η έκλυση των ουσιών του δείγματος πραγματοποιείται με τη ροή αυτού του αδρανούς αερίου, το οποίο ονομάζεται φέρον αέριο και αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο μόνος της ρόλος είναι η διακίνηση του, κατά μήκος της στήλης. Στη συντριπτική πλειονότητα των εφαρμογών, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη σε επιφάνεια αδρανούς στερεού υποστρώματος (χρωματογραφία αερίου-υγρού).

Με τη χρήση πακτημένης στήλης πληρωμένης με κονιοποιημένο υλικό στήριξης, το οποίο είναι καλυμμένο με ένα λεπτό στρώμα στατικής φάσης (πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο ή πολυαιθυλενογλυκόλη) πετυχαίνουμε διαχωρισμούς πτητικών οργανικών ενώσεων, όπως οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες ή ενώσεις διαφορετικής πολικότητας, όπως οι αλκοόλες και οι κετόνες. Με βάση τις τιμές των χρόνων ανάρσεσης των προτύπων ουσιών πετυχαίνουμε την ταυτοποίηση των ουσιών αυτών σε άγνωστα μίγματα. Επίσης μελετούμε τον διαχωρισμό και τη σειρά έκλουσής τους με βάση το σημείο ζέσεως τους, το μοριακό τους βάρος και την πολικότητά τους.



#### 4.1.5 Μέθοδος: ενζυματική ανασοδιάγνωση (enzyme linked immunoassay, ELISA)

Μια ακόμα πολλά υποσχόμενη τεχνική είναι η ενζυματική ανοσοδιάγνωση (enzyme linked immunoassay, ELISA) που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών μυκοτοξινών. Οι ενζυματικές ανοσοδιαγνωστικές τεχνικές είναι πολύ χρήσιμες σε μελέτες που αφορούν τον τρόπο με τον οποίο μεταβολίζονται οι μυκοτοξίνες στα ζώα καθώς και την δυσκολία που εμφανίζουν σε διάφορα βιολογικά συστήματα για την απομάκρυνση των μυκοτοξινών από το σύστημα τους.

Η μέθοδος ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και την παθολογία των φυτών, καθώς και ποιοτικού ελέγχου σε διάφορες βιομηχανίες. Προσπαθώντας να ανιχνεύσει (και ποσοτικά) την παρουσία του αντιγόνου στο δείγμα προχωρά ως ακολούθως: Τα Αντιγόνα από το δείγμα συνδέονται με μια επιφάνεια. Στη συνέχεια, ένα άλλο ειδικό αντίσωμα εφαρμόζεται πάνω στην επιφάνεια, ώστε να μπορεί να συνδέεται με το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο, και, στο τελικό άκρο προστίθεται μια ουσία που περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου. Η επακόλουθη αντίδραση παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, συνηθέστερα μια αλλαγή χρώματος στο υπόστρωμα.

Η πραγματοποίηση της ELISA περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα αντίσωμα με εξειδίκευση για ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Το δείγμα με μια άγνωστη ποσότητα αντιγόνου ακινητοποιείται σε ένα στερεό υπόστρωμα (συνήθως μία πλάκα μικροτιτλοδοτήσεως από πολυστερίνη) είτε μη-ειδικά (μέσω προσρόφησης στην επιφάνεια) ή ειδικά (μέσω της σύλληψης από ένα άλλο αντίσωμα ειδικό για το ίδιο αντιγόνο, σε ένα "σάντουιτς" ELISA). Αφού το αντιγόνο είναι ακινητοποιημένο, το αντίσωμα ανίχνευσης, προστίθεται, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο. Το αντίσωμα ανίχνευσης μπορεί να συνδέεται ομοιοπολικά με ένα ένζυμο, ή μπορεί η ίδια να ανιχνευθεί με ένα δευτερεύον αντίσωμα που είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο μέσω βιοσύζευξης. Μεταξύ εκάστου σταδίου, η πλάκα συνήθως πλένεται με ένα ήπιο διάλυμα απορρυπαντικού για την απομάκρυνση τυχόν πρωτεΐνες ή αντισώματα τα οποία δεν είναι ειδικά δεσμευμένα. Μετά το τελικό στάδιο πλύσης, η πλάκα έχει αναπτυχθεί από την προσθήκη ενός ενζυματικού υποστρώματος για να παράγει ένα ορατό σήμα, το οποίο υποδεικνύει την ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα.

#### 4.2 Αποτελέσματα και συζήτηση:

Με το στόχο να επιτευχθεί μια αποδοτική αναλυτική μέθοδος για ταυτόχρονο προσδιορισμό AFB1 και OTA στο ελαιόλαδο, πραγματοποιήθηκαν μια σειρά πειραματικών δοκιμών για να βελτιωθεί τη διαδικασία προσδιορισμού AFB1 σύμφωνα με Daradimos και et.al (2000). Αυτή η τελευταία μέθοδος τροποποιήθηκε για να παρέχει απλούστερα, γρήγορα και οικονομικότερα βήματα και τις διαδικασίες καθαρισμού. Η εξαγωγή και το βήμα καθαρισμού ήταν κοινές για AFB1 και για OTA και χρησιμοποιήθηκε μια ενιαία στήλη για τον καθαρισμό. Οι AFB1 και OTA διαχωρίστηκαν με εκχύλιση σε δύο διαφορετικούς διαλύτες, κατόπιν συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν χωριστά με HPLC. Για να βελτιστοποιήσουν τη διαδικασία πραγματοποιήθηκαν διαφορετικές δοκιμές αξιολογώντας την ανάκτηση σε δύο τεχνητά μολυσμένων με AFB1 και OTA δείγματα. Η τεχνητή μόλυνση του ελαιολάδου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια διάλυμα μυκοτοξινών σε μεθανόλη. Δεδομένου ότι η μεθανόλη δεν είναι απολύτως διαλυτή στο ελαιόλαδο, προστέθηκε 1ml νιτροεξάνιο για να αυξηθεί η διαλυτότητα των μυκοτοξινών. Το μολυσμένο ελαιόλαδο ανακινήθηκε για 5 λεπτά για να επιτύχει ομοιογενές διάλυμα. Η φάση πλύσης με το διαιθυλικό αιθέρα παρακάμφθηκε για να βελτιωθεί η ταχύτητα καθαρισμού. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση στήλης SiO<sub>2</sub> σε χαμηλή πίεση για να επιταχύνει η διαδικασία αλλά αυτή η εναλλακτική λύση εγκαταλείφθηκε επειδή ο παράγοντας αποκατάστασης για την AFB1 μειώθηκε δραστικά.

#### 4.3 Περιστατικό αφλατοξίνης B1 στο ελληνικό ελαιόλαδο:

Η παρουσία AFB1 στο ελαιόλαδο οφείλεται στις αφλατογεννητικές φόρμες όπως *Aspergillus flavus* και οι *A parasiticus* οι οποίες μολύνουν ελιές. Στην παρούσα μελέτη, 50 δείγματα του ελληνικού ελαιολάδου που παρήχθη μεταξύ 1995 και 1998 εξετάστηκαν για την παρουσία αφλατοξίνης B1.

Τα δείγματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας τις δύο μεθόδους που περιγράφηκαν ανωτέρω. Όταν αναλύονται με τη μέθοδο B όλα τα δείγματα βρέθηκαν για να είναι αρνητικά. Η χρήση της μεθόδου A αποκάλυψε την παρουσία αφλατοξίνης B1 σε 72% από τα εξετασμένα δείγματα. Αυτό οφείλεται στο χαμηλότερο όριο ανίχνευσης της μεθόδου (2,8 ng/kg). Έντεκα δείγματα επέδειξαν τα ίχνη AFB1 (2,8-4,7 ng/kg). Σε 20 δείγματα η συγκέντρωση ήταν μεταξύ 5,2 και 9,4 ng/kg, σε τέσσερα δείγματα μεταξύ 13,7 και 15,7 ng/kg και ένα δείγμα μολύνθηκε με

46,3 ng/kg. Σε 14 δείγματα η AFB1 δεν ήταν ανιχνεύσιμη. Πρέπει να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα δεν διορθώθηκαν για την ανάκτηση που είναι 87,2%. Στην παρούσα μελέτη, η μόλυνση των δειγμάτων ελαιολάδου βρέθηκε να είναι πολύ χαμηλή. Είναι ακόμα χαμηλότερη από τα επίπεδα που επιτρέπονται από τον κανονισμό που για τις αφλατοξίνες, όπως για την αφλατοξίνη M1 στο γάλα είναι 0,05 mg/kg ή 0,5 mg/kg (Van Egmond 1995).

Σε μελέτη των (Toussaint *et al.*, 1997) προηγουμένως είχε αναφερθεί ότι τα δείγματα ελαιολάδου που προέρχονται από την Ελλάδα και την Ισπανία βρέθηκαν να περιέχουν AFB1 σε επίπεδα 5-10 mg/kg. Επιπλέον οι Gracian και Arevalo (1980) ανέφεραν ότι το ισπανικό ελαιόλαδο μολύνθηκε με τις συνολικές αφλατοξίνες σε επίπεδα 13,4-155,4 mg/kg. Η παρούσα μελέτη δείχνει ότι τα τελευταία χρόνια τα επίπεδα μόλυνσης στο ελαιόλαδο ελληνικής προέλευσης έχουν μικρύνει.

Εντούτοις, γνωρίζουμε ότι το παρθένο ελαιόλαδο είναι το κύριο λίπος στη διατροφή Ελλήνων και των άλλων πληθυσμών της λεκάνης της Μεσογείου. Έχει επισημανθεί σε μελέτη των Tantaoui-Elaraki *et al.* (1983) ότι λόγω της συχνής κατανάλωσης του ελαιολάδου ακόμη και τα χαμηλά επίπεδα μόλυνσης μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία. Επιπλέον Costabaler *et al.* (1996) έδειξαν ότι οι κλιματολογικές συνθήκες όπως εκείνες στην επαρχία της Ισπανίας θα είχαν επιπτώσεις στην ασφάλεια των ελιών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Είναι επομένως απαραίτητο να εξασφαλιστεί ότι, οπουδήποτε παράγονται ελιές πρέπει να αποθηκεύονται με έναν τρόπο που θα αποτρέψει την αύξηση των τοξινογενών φορμών και την παραγωγή των αφλατοξινών.

Η ακρίβεια της μεθόδου που εφαρμόστηκε στο ελαιόλαδο μελετήθηκε με την ανάλυση των δειγμάτων του ελαιολάδου που βρέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Ο συντελεστής οπισθοδρόμησης  $r$  της καμπύλης βρέθηκε σε  $r=0,997$  [ $y=1,12 (+0,03) X-2,45 (+1,39)$ ], όπου  $Y$  είναι η συγκέντρωση OTA (ng kg<sup>-1</sup>) του ελαιολάδου που ανακτήθηκε και το  $X$  είναι η συγκέντρωση OTA (ng kg<sup>-1</sup>) του ελαιολάδου που ανιχνεύθηκε. Επιπλέον, μια δοκιμή του Φίσερ εφαρμόστηκε για να επιβεβαιώσει την αποδοχή της γραμμικής οπισθοδρόμησης. Ο μέσος παράγοντας αποκατάστασης βρέθηκε να είναι 108% (RSD=4,7%). Ο συντελεστής της παραλλαγής που καθορίστηκε υπό τους επαναλαμβανόμενους όρους κατά ανάλυση ενός φυσικά μολυσμένου δείγματος του ελαιολάδου ήταν 7,8%. Το όριο ανίχνευσης OTA καθορίστηκε να είναι 4,6 ng kg<sup>-1</sup> και το όριο του προσδιορισμού της ποσότητας 20,4 ng kg<sup>-1</sup>. Αυτά τα όρια θα μπορούσαν να είναι χαμηλότερα με την αλλαγή

μερικών παραγόντων, δηλαδή με τη χρησιμοποίηση περισσότερων ml από το υπερκείμενο νερό, με τη διάλυση του ξηρού υπολείμματος. Στην παρούσα μελέτη, οι όγκοι που χρησιμοποιήθηκαν από το υπερκείμενο νερό, την κινητή φάση για τη διάλυση του υπολείμματος και την έγχυση ήταν 2 ml, 200 ml και 20 ml, αντίστοιχα. Επιπλέον, η εσωτερική δυνατότητα αναπαραγωγής οκτώ δειγμάτων του ελαιολάδου που ανιχνεύθηκαν με OTA ( $1000 \text{ ng kg}^{-1}$ ) παρουσίασε μια αποκατάσταση 97,3% (RSD=8,9%).

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό OTA στο ελαιόλαδο είναι απλή, αξιόπιστη και αποδοτική. Η ακρίβεια, η δυνατότητα αναπαραγωγής, η επανάληψη, και τα όρια της ανίχνευσης και του προσδιορισμού της ποσότητας είναι πολύ ικανοποιητικές. Επιπλέον, το βήμα εξαγωγής είναι κοινό και για AFB1 και για OTA και οι διαδικασίες καθαρισμού με τη χρησιμοποίηση των στηλών είναι απλές. Ο προσδιορισμός HPLC εκτελείται με τον ίδιο ανιχνευτή στηλών και φθορισμού HPLC και για τις δύο μυκοτοξίνες. Είναι σημαντικό ότι από το ίδιο σχετικά μικρό δείγμα είναι δυνατό να εξαχθεί και να καθοριστεί και OTA και AFB1. Επιπλέον, με τη χρησιμοποίηση της ίδιας στήλης HPLC για τον προσδιορισμό και των δύο μυκοτοξινών, η μέθοδος μπορεί να κερδίσει και χρόνο και χρήματα. Ο χαρακτηρισμός της μεθόδου για τον καθορισμό AFB1 στο ελαιόλαδο έχει αναφερθεί λεπτομερώς από Daradimos *et al.* (2000). Η μέθοδος παρουσίασε έναν παράγοντα αποκατάστασης 84,8% (RSD=17,8%) και όριο ανίχνευσης AFB1  $56 \text{ ng kg}^{-1}$  του ελαιολάδου.

Οι LE Tutour *et al.* (1983) είχαν αναφερθεί προηγουμένως σε μία μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό AFB1 και OTA στο ελαιόλαδο που αναφερόταν στην εξαγωγή των μυκοτοξινών με την υδάτινη μεθανόλη, στο καθαρισμό χρησιμοποιώντας το οξικό άλας μολύβδου, απολιπαντικό με το εξάνιο, που χωρίζει το χλωροφόρμιο και την ανίχνευση με TLC. Τα όρια ανίχνευσης αυτής της μεθόδου για OTA και AFB1 ήταν 40 και  $56 \text{ ng kg}^{-1}$ , αντίστοιχα. Στην παρούσα μελέτη, τα όρια ανίχνευσης για OTA και AFB1 είναι πολύ χαμηλότερα ( $4,6$  και  $4 \text{ ng kg}^{-1}$ , αντίστοιχα).



## Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα

Το ελαιόλαδο, η σημαντικότερη πηγή διαιτητικού λίπους της μεσογειακής διατροφής, το οποίο μπορεί να μολυνθεί από τις μυκοτοξίνες. Μια αποδοτική αναλυτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της αφλατοξίνης Β1 (AFB1) και της ωχρατοξίνης Α (OTA) είναι αυτή που αναφέρεται στο ελαιόλαδο.

Το ελαιόλαδο είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά της μεσογειακής διατροφής και οι φυσικοχημικές οργανοληπτικές και, ιδιαίτερα, θρεπτικές ιδιότητές της έχουν μελετηθεί σε βάθος. Κατά συνέπεια, ο αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων ανήγγειλε πρόσφατα τη διαθεσιμότητα μιας κατάλληλης αξίωσης υγείας για το μονο-ακόρεστο λίπος από το ελαιόλαδο και μειώνει τις στεφανιαίες καρδιακές παθήσεις (αμερικανικός Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφίμων 2003). Οι όξινες τιμές, το Κ και ο αριθμός υπεροξειδίου θεωρούνται ευρέως θρεπτικές και εμπορικές παράμετροι για να καθορίσουν την εμπορική κατηγορία ελαιολάδων (η Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Κοινότητας (ΕΕΚ) 1995). Αυτοί οι δείκτες που χρησιμοποιούνται συνήθως για να αξιολογήσουν το βαθμό οξείδωσης των λαδιών και τα λίπη ήταν ο αριθμός υπεροξειδίου που μετρά την αρχική οξείδωση, στη συγκεκριμένη απορρόφηση στα 232nm (K232), αφορούσαν το περιεχόμενο των συζευγμένων διένιων, τα οποία διαμορφώθηκαν ως αποτέλεσμα της οξείδωσης και κατά τη διάρκεια της φάσης λεύκανσης στον καθαρισμό ελαιολάδου (Ευρωπαϊκή Επιτροπή 1991). Ο ευρωπαϊκός κοινοτικός κανονισμός CE 656/95 (η Επιτροπή Ευρωπαϊκή Κοινότητα (ΕΕΚ) 1995) είναι καθιερωμένος για να αξιολογήσει την ποιότητα του ελαιόλαδο. Πράγματι, το ελαιόλαδο που εμπορευματοποιείται ως «extra virgin», « virgin» ή υποβαθμισμένο, και η έλλειψη ομοιομορφίας προκαλεί αποχαρακτηρισμό του ελαιολάδου σε μια κατώτερη κατηγορία πώλησης. Μερικά από τα ποιοτικά πρότυπα, δηλαδή ελεύθερη οξύτητα, αριθμός υπεροξειδίου, σπεκτροφωτομετρικοί δείκτες και η δοκιμή επιτροπής, είναι συγκεκριμένοι δείκτες γνησιότητας που στοχεύουν στην προστασία του καταναλωτή και για να παλεψει τις εμπορικές απάτες. Οι μυκοτοξίνες είναι δευτεροβάθμιοι βιοενεργοί μεταβολίτες παραχθείς από μερικούς αεροβικούς μικροσκοπικούς μύκητες που ανήκουν κυρίως *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium* στα γένη που αυξάνονται στις εγκαταστάσεις (το Συμβούλιο για τις γεωργικές επιστήμες και την τεχνολογία (ΧΥΤΕΣ) 2003). Οι αφλατοξίνες (AFs) παράγονται από το *A. flavus* και το *A. parasiticus* και είναι πολύ σταθερή διαλυτή ουσία ενώσεων στους πολικούς



οργανικούς διαλύτες, και ιδιαίτερα διαλύτες στους αρωματικούς υδρογονάνθρακες. Η AFS βρίσκεται ουσιαστικά στις καλλιέργειες και τα προϊόντα όπως φυστίκια, ελαιώδεις σπόρους εγκαταστάσεων, αραβόσιτο και υποπροϊόντα, αμύγδαλα, ξύλα καρδιάς, φουντούκια, και ξηρά σύκα (Galvano και λοιποί. 2005). Η τοξικότητα AF είναι ένα αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων με τα νουκλεϊνικά οξέα, που καθορίζουν τα επιβλαβή αποτελέσματα στην πρωτεϊνική σύνθεση, και ιδιαίτερα στην έκφραση του p53 γονιδίου, και της ακεραιότητας των νουκλεϊνικών οξέων με την επακόλουθη ζημία στους οργανισμούς για αυτούς τους λόγους. Επιπλέον, θεωρούνται οι ισχυρά καρκινογόνες ουσίες, τερατογενές και μεταλλαξιγόνα, και θέτουν έναν αυστηρό κίνδυνο στο ζώο και τις ανθρώπινες υγείες (Chu 1991 Eaton & Groopman 1994 Galvano *et al.* 2005).

Ο κίνδυνος μυκοτοξινών στο ελαιόλαδο ήταν αναφερόμενος από τους διάφορους συντάκτες (Arevalo & Gracian 1980 Tanoui-Elaraki *et al.* 1983 Paster και λοιποί. 1988 Bullerman & Mahjoub 1990 Yassa 1995 Eltem 1996 Visconti *et al.* 1996).

Η παραγωγή τοξικών δευτερογενών μεταβολιτών από μυκοτοξικογόνους μύκητες αποτελεί σήμερα ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα για την διασφάλιση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων για την υγεία του ανθρώπου. Για αυτό το λόγο θα πρέπει να βρεθούν τρόποι αντιμετώπισης για όλα τα είδη των μυκοτοξινών (Ghitakou *et al.*, 2006).

Οι τρόποι αυτοί περιλαμβάνουν:

- Μελέτες οικολογίας - επιδημιολογίας μυκήτων
- Εφαρμογή κατάλληλων προσυλλεκτικών και μετασυλλεκτικών χειρισμών (αποθήκευση σε ξηρό περιβάλλον των ελιών και σε χαμηλή θερμοκρασία ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα)
- Εφαρμογή βιολογικών / βιοτεχνολογικών μεθόδων αντιμικροβιακών ενώσεων
- Προσθήκη άλλων ουσιών
- Εφαρμογή μυκητοκτόνων ως η πιο αξιόπιστη μέθοδος (Μάρκογλου, 2010).

Συμπερασματικά, τα επονομαζόμενα ελαιόλαδα προσφέρουν τις μεγαλύτερες εγγυήσεις, όπως οι ποιοτικοί δείκτες του ελαιολάδου. Αντίθετα, τα μη επανομαζόμενα ελαιόλαδα δεν προσφέρουν καμία εγγύηση επειδή τα δηλωμένα πρόσθετα παρθένα ελαιόλαδα δεν υποστηρίχθηκαν από την ανάλυση. Επιπλέον, μόνο οι ποιοτικοί

δείκτες ελαιολάδου δεν παρέχουν τη διαβεβαίωση για τον καταναλωτή για την πιθανή μόλυνση με AFB1 και OTA.

## Κεφάλαιο 6: Νομοθεσία

Τα πορίσματα των επιστημονικών μελετών από όλο τον κόσμο συντείνουν στο ότι η παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα θέτει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών. Αυτό έχει οδηγήσει τόσο σε εντατικούς ελέγχους όσον αφορά την παρουσία τους στα διάφορα τρόφιμα όσο και στην καθιέρωση ορίων, όπως και στην ΕΕ. Νομοθετικοί κανονισμοί για τις αφλατοξίνες υπάρχουν σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως. Στις ανεπτυγμένες 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.

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία κατατάσσει τις αφλατοξίνες στους επιμολυντές των τροφίμων (Καν. 1881/2006). Οι τρέχουσες επιστημονικές και τεχνικές γνώσεις καθώς και οι εφαρμοζόμενες πρακτικές παραγωγής και αποθήκευσης, δεν μπορούν να αποκλείσουν την ανάπτυξη των μυκήτων *Aspergillus* 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 ευλόγως εφικτό επίπεδο. Η μείωση της έκθεσης του ανθρώπου σε αυτού του είδους τις τοξικές ουσίες αποτελεί μέγιστη προτεραιότητα με ταυτόχρονη μείωση των ορίων. Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω επιπτώσεις στον άνθρωπο θεωρείται σκόπιμο, για λόγους ασφάλειας και δημόσιας υγείας, να περιοριστεί τόσο η συνολική περιεκτικότητα σε αφλατοξίνες στα τρόφιμα, όσο και η περιεκτικότητα σε αφλατοξίνη B1. Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η αφλατοξίνη M1 θεωρείται ως γονοτοξική καρκινογόνος ουσία ίση λιγότερο επικίνδυνη από ότι η αφλατοξίνη B1, είναι απαραίτητο να αποφευχθεί η περιεκτικότητά της στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από ανθρώπους και ιδίως από μικρά παιδιά. Αναμφίβολα πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν και οι πιο ευαίσθητες ομάδες του πληθυσμού και κυρίως τα βρέφη. Η θέσπιση των μέγιστων ορίων για την παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα αποτελεί μια σύνθετη υπόθεση. Για την οριοθέτηση των μέγιστων 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. Συνεπώς, η ΕΕ έχει θεσπίσει νομοθετικά όρια στα υλικά που προορίζονται για χρήση ως τρόφιμα ή ως ζωοτροφές. Για τη θέσπιση των μέγιστων ορίων λαμβάνονται υπ' όψιν πολλοί διαφορετικοί επιστημονικοί οργανισμοί, αρχές και άλλα σώματα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται σε αυτή τη διαδικασία. Μία περίληψη για την τοξικολογική εκτίμηση των αφλατοξινών με αναφορά στην επίδρασή τους στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον πραγματοποιείται με τη συνεργασία μεταξύ των ακόλουθων οργανισμών:

1. Διεθνές Πρόγραμμα για την Χημική Ασφάλεια (International Programm on Chemical Safety - IPCS, [www.who.int/pcs/](http://www.who.int/pcs/))
2. Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency on Research on Cancer - IARC, [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr))
3. 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/iecfa.htm](http://www.who.int/pcs/jecfa/iecfa.htm).)

Εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης αυτή η εκτίμηση διεξάγεται υπ' ευθύνη της Επιστημονικής Επιτροπής για τα Τρόφιμα (SCF, [http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/csf/index\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/fs/cs/csf/index_en.html)). Επιπρόσθετα, αρκετές ομάδες εργασίας και ειδικές επιτροπές με εξουσιοδότηση από όλα τα κράτη μέλη προετοιμάζουν τις προτάσεις. Η μέγιστη τιμή που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για κελυφωτά φιστίκια που προορίζονται για άμεση κατανάλωση ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα είναι 2,0 Mg/kg (ppb) για την B1 και 4,0 pg/kg (ppb) για το άθροισμα των B1, B2, G1 και G2. Για την αφλατοξίνη B1 έχει θεσπιστεί ξεχωριστό όριο. 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 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. Επομένως, στις περιπτώσεις αυτές, τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις αφλατοξίνες έχουν καθοριστεί λαμβανομένης υπόψη της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών που προαναφέρθηκαν και ειδικά για τα κελυφωτά φιστίκια είναι 5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) για την B1 και 10,0  $\mu\text{g}/\text{I}<9$  (ppb) για το άθροισμα των B1, B2, G1 και G2. Στις παρτίδες που ανιχνεύθηκαν αφλατοξίνες μέσα στα όρια που προορίζονται για διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία θα πρέπει να υπάρχει και η ανάλογη σήμανση. 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 απομάκρυνσή τους.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΛΙΟΛΙΟΥ Ε. «Μελέτη της επίδρασης ζυμών και γαλακτικών βακτηρίων στη συγκέντρωση ωχρατοξίνης Α σε εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα» Γ.Π.Α. μεταπτυχιακή μελέτη ΑΘΗΝΑ 2009

ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ Α. «Μυκοτοξικογόνοι Μύκητες και Μυκοτοξίνες Τοξικολογικοί κίνδυνοι και μέθοδοι ελέγχου και αντιμετώπισης» Εργ. Γ. Φαρμακολογίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΜΠΑΛΑΤΣΟΥΡΑΣ Γ. Μικροβιολογία Τροφίμων. Μύκητες που ενδιαφέρουν την βιομηχανία τροφίμων και τρόποι μόλυνσεως τροφίμων. Αθήνα. σελ. 101,264-291. (2006)

ΤΣΑΚΩΝΑΣ Π. «Επεξεργασία ελαιολάδου» 2009

### ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ADBEL-WAHAB M.A AND ALY S.E. Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin-contaminated diet.51.p.2409-14. (2003).

CHU F.S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. Mutat. Res. 259, p.291-396. Fietenborg O., Frisvad J.C. and Thrane U. (1996). Moulds in food spoilage. Int. J. Food Microbiol. 33, p.85-102. (1991).

DARADIMOS E., MARCAKI P. & KOUPPARIS M. «Evaluation and validation of two fluorometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B1 in olive oil» Available online: 10 Nov 2010

FERRACANE R. , TAFURI A. , LOGIECO A. , GALVANO F. , BALZANO D. & RITIENI A. "Simultaneous determination of aflatoxin B1 and ochratoxin A and their natural occurrence in Mediterranean virgin olive oil»

*a Department of Food Science, University of Naples Federico II, via Università 100, Parco Gussone Edificio 84, Portici, Naples I-80055, Italy*

*b Institute of Food Production (ISPA), via G. Amendola 122/0, 70126, National Research Council (CNR), Bari, Italy*

*c Department of Agroforestry and Environmental Science, University of Reggio Calabria, P. zza S. Francesco 7, 89061 Gallina di Reggio Calabria, Italy Available online: 17 Jan 2007*

GHITAKOU S., KOUTRAS K., KANELLOU E. AND MARKAKI P. Study of aflatoxin B1 and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. *Food Microbiology* 23, p.612-621. (2006)

KOKKONEN M., JESTOI M. AND RIZZO A. «The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicilium* strains». *Int. J. Food Microbiol.*99, p.207-214. (2005)

MILLER J.D., TRENHOLM H.L. (Eds.) «Mycotoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxin.»261-285. (1994)

JORGENSEN K. AND BILDE B. «Occurrence and estimated dietary intakes of ochratoxin» A in European countries. p. 15-16 (1993)

RAMTEJ J. AND NEETA M. «Effect of curcumin on aflatoxin-included biochemical changes in testis of mice.»India.p.1 19-235. (2009)

SAMANE S., TANTANOUI E.A. AND ESSADAQUI M. «Mycoflora of Moroccan "Greek style" black olives II toxigenesis. *Microbiol.» Alim. Nutr.* 9, p.335-352. . (1991)

SCOTT P.M., «*Penicilium* and *Aspergillus* toxins.»

PAPACHRISTOU A. & MARKAKI P. «Determination of ochratoxin A in virgin olive oils of Greek origin by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography» Available online: 20 Feb 2007

*a Department of Food Chemistry, School of Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, GR-157 71 Athens- Greece*

WILLIAMS J.H., PHILLIPS T.D., JOLLY C.M. AND AGGARWAL D. HUMAN «aflatoxicosis in developing countries» 80 p.106-122. (2004)

## ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

<http://www.eex.gr/Doclib/markoglou.pdf-193k>. EEX.

ΜΑΡΚΟΓΛΟΥ Α «Μυκυτοξικογόνοι Μύκητες και Μυκοτοξίνες.» (2010).

<http://www.chem.uoa.gr/.../chem-aflatoxins.htm>.

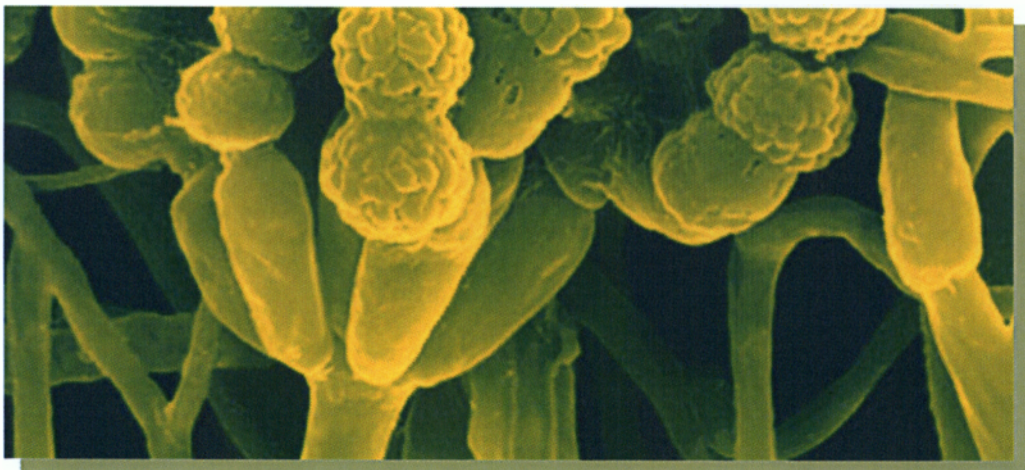
ΜΑΡΚΑΚΗ Π., ΒΑΛΑΒΑΝΙΔΗΣ Θ., ΚΑΙ ΕΥΣΤΑΘΙΟΥ Κ. «Αφλατοξίνες.»

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

**Γλωσσάριο όρων**



**Νομοθεσία**



## ΓΛΩΣΣΑΡΙΟ ΟΡΩΝ

### **Ανάλυση Κινδύνων και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου HACCP**

Ένα σύστημα διασφάλισης ποιότητας που θα πρέπει να εφαρμόζεται σε κάθε επιχείρηση τροφίμων και το οποίο προάγει την αναγνώριση των πιθανών κινδύνων των τροφίμων και συνιστά τους ελέγχους που απαιτούνται για την πρόληψη και την μείωση των κινδύνων αυτών

### **Αποθήκευση**

Η διατήρηση των πρώτων και βοηθητικών υλών, των υλικών και αντικειμένων συσκευασίας και των ημι-κατεργασμένων ή τελικών προϊόντων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή σε ελεγχόμενες συνθήκες (θερμοκρασίας, ψύξης, κατάψυξης, υγρασίας, ελεγχόμενου εξαερισμού με φίλτρα, ατμόσφαιρας CO<sub>2</sub>. κ.α.).

### **Απολύμανση**

Η χρησιμοποίηση χημικών υλών ή / και φυσικών μεθόδων που έχει σκοπό τον περιορισμό της ανάπτυξης μικροοργανισμών σε επίπεδα που είναι ασφαλή για την ποιότητα των τροφίμων

### **Αρχεία**

Έγγραφα που περιέχουν πληροφορίες για την διαδικασία παραγωγής ή τον ποιοτικό έλεγχο Αποτελέσματα των ελέγχων που πραγματοποιούνται κατά την παραγωγική διαδικασία, στα πλαίσια της εφαρμογής των συστημάτων διασφάλισης ποιότητας ISO και HACCP

### **Ασφάλεια των τροφίμων**

Η κατάσταση κατά την οποία εξασφαλίζεται ότι τα τρόφιμα έχουν παραχθεί με υγιεινές συνθήκες, δεν είναι πιθανή η ύπαρξη κινδύνου για την υγεία του καταναλωτή και δεν θίγονται τα οικονομικά του συμφέροντα

### **Ασφαλής κατασκευή του εξοπλισμού ή των εγκαταστάσεων**

Η κατασκευή του εξοπλισμού ή των εγκαταστάσεων που δεν εγκυμονεί τον κίνδυνο πιθανής επιμόλυνσης των τροφίμων από ανεπάρκεια ή βλάβη του εξοπλισμού ή των εγκαταστάσεων.

### **Διορθωτική ενέργεια**

Η διαδικασία που πραγματοποιείται από τους υπεύθυνους μιας επιχείρησης τροφίμων όταν αποδειχθεί από τους ελέγχους των κρίσιμων σημείων ότι οι τιμές των παραμέτρων έχουν αποκλίνει από τα όρια που τους έχουν τεθεί

### **Εγκατάσταση ή κτίριο**

Το κτίριο ή ο χώρος που στεγάζεται μια επιχείρηση τροφίμων και μέσα στον οποίο παρασκευάζονται τρόφιμα

### **Έλεγχος των κρίσιμων σημείων ελέγχου**

Οι ενέργειες που γίνονται για την διαπίστωση της παραγωγής ασφαλών και υγιεινών προϊόντων και οι οποίες περιλαμβάνουν μια σειρά παρατηρήσεων, μετρήσεων, ή και δειγματοληψιών για την διεξαγωγή των εξετάσεων

### **Εξυγίανση**

Η εφαρμογή του προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης

### **Επαρκές**

Ικανοποιητικό αποτέλεσμα για κάποιο προκαθορισμένο στόχο

### **Επεξεργασία**

Διεργασίες που διέπουν την παραγωγή ενός προϊόντος και μεταβάλλουν την αρχική του κατάσταση.

### **Επιμόλυνση**

Η εμφάνιση μικροοργανισμών ή χημικών ουσιών ή ξένων σωμάτων ή δυσάρεστων κηλίδων ή ανεπιθύμητων άλλων ουσιών στα τρόφιμα

### **Επιχείρηση τροφίμων**

Κάθε επιχείρηση δημόσια ή ιδιωτική, που ασκεί μία ή περισσότερες από τις παρακάτω δραστηριότητες κερδοσκοπικές ή μη:

Μεταποίηση, παραγωγή, συσκευασία, αποθήκευση.

Μεταφορά, διανομή, διακίνηση και προσφορά προς πώληση ή διάθεση τροφίμων

### **Καθαρισμός**

Η απομάκρυνση απορριμμάτων τροφών, ξένων σωμάτων, σκόνης, ρύπανσης

### **Κίνδυνος των τροφίμων**

Η ανάπτυξη μικροοργανισμών ή η παρουσία χημικών ουσιών ή ξένων σωμάτων στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα τα τρόφιμα να καθίστανται ακατάλληλα προς βρώση

### **Κρίσιμα όρια**

Οι τιμές των παραμέτρων που εξετάζονται στα κρίσιμα σημεία ελέγχου και θα πρέπει να εξασφαλίζεται η σταθερότητά τους για να μην παρουσιάζεται κίνδυνος για την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων



### **Κρίσιμο Σημείο Ελέγχου (Κ.Σ.Ε.)**

Κάθε σημείο της παραγωγικής διαδικασίας όπου είναι δυνατή η εξάλειψη ή ο περιορισμός των κινδύνων που εμφανίζονται και έχουν σχέση με την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων

### **Παρτίδα (lot)**

Το σύνολο των μονάδων του τροφίμου που παράγεται ή συσκευάζεται στις ίδιες συνθήκες

### **Περιοχές υψηλού κινδύνου**

Περιοχές της παραγωγικής διαδικασίας όπου είναι σημαντική η παρουσία του κινδύνου της επιμόλυνσης των τροφίμων και στις οποίες απαιτείται η εφαρμογή πολύ αυστηρών μέτρων υγιεινής για την παραγωγή ασφαλών και υγιεινών προϊόντων.

### **Περιοχές χαμηλού κινδύνου**

Περιοχές της παραγωγικής διαδικασίας όπου δεν παρουσιάζεται σημαντικός κίνδυνος για την ασφάλεια των τροφίμων αλλά θα πρέπει να εφαρμόζονται οι γενικοί κανόνες υγιεινής

### **Προδιαγραφές ποιότητας**

Η λεπτομερής περιγραφή των ποιοτικών ή λειτουργικών χαρακτηριστικών. Στην περίπτωση των ποσοτικών προδιαγραφών χρησιμοποιούνται για την έκφραση τους σταθερότυποι και επιτρεπτά όρια

### **Προληπτικά μέτρα**

Όλες οι διαδικασίες που εκτελούνται για τον περιορισμό ή την εξάλειψη των κινδύνων των τροφίμων.

### **Συσκευαστικό υλικό**

Το υλικό που χρησιμοποιείται για την κάλυψη των προϊόντων όπως αλουμίνιο, μεμβράνη, χαρτί ή κάθε περιέκτης που είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, γυαλί, πλαστικό ή χαρτί

### **Συστατικά**

Οι πρώτες και βοηθητικές ύλες που υποβάλλονται σε επεξεργασία για την παραγωγή του τελικού προϊόντος.

### **Τρόφιμα**

Όλα τα προϊόντα σε στερεή ή υγρή μορφή που χρησιμοποιούνται για την θρέψη του ανθρώπου. Σε αυτά ανήκουν επίσης και τα ποτά, ευφραντικά, το νερό, τα κόμματα, οι μαστίχες και κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που προστίθεται στα τρόφιμα.

### **Τρόφιμα υψηλής επικινδυνότητας**

Τρόφιμα που περιέχουν συστατικά τα οποία αλλοιώνονται εύκολα και επιτρέπουν την ταχεία ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

### **ΧΥΤΕΣ**

το Συμβούλιο για τις γεωργικές επιστήμες και την τεχνολογία.

#### **Υγιεινή κατασκευή του εξοπλισμού ή της εγκατάστασης**

Η κατασκευή του εξοπλισμού ή της εγκατάστασης που επιτρέπει τον εύκολο καθαρισμό και απολύμανσή τους.

#### **Υγιεινή τροφή**

Τροφή η οποία από άποψη υγιεινής, είναι κατάλληλη προς βρώση από τον άνθρωπο.

**Υγιεινή των τροφίμων** Όλα τα μέτρα που απαιτούνται για να είναι τα τρόφιμα ασφαλή και υγιεινά. Τα μέτρα καλύπτουν όλα τα στάδια μετά την πρωτογενή παραγωγή (η οποία περιλαμβάνει την παρασκευή, μεταποίηση, παραγωγή, συσκευασία, αποθήκευση, μεταφορά, διανομή, διακίνηση ή την προσφορά προς πώληση ή τη διάθεση στον καταναλωτή.

## NOMΟΘΕΣΙΑ

### ΚΟΙΝΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΘΝΙΚΗ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

**Κανονισμός αριθ. 136/66/ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 22ας Σεπτεμβρίου 1966 περί δημιουργίας κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα των λιπαρών ουσιών. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, P 172/3025, 30.09.66*

**Κανονισμός (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91** της Επιτροπής της 11ης Ιουλίου 1991 σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαιών καθώς και με τις μεθόδους προσδιορισμού. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 248/1, 05.09.91*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2472/97** της Επιτροπής της 11ης Δεκεμβρίου 1997 για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2568/91 σχετικά με τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών των ελαιολάδων και των πυρηνελαιών καθώς και με τις σχετικές μεθόδους προσδιορισμού και του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2658/87 του Συμβουλίου σχετικά με τη δασμολογική και στατιστική ονοματολογία και το κοινό δασμολόγιο. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 341/25, 12.12.97*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1638/1998** του Συμβουλίου της 20ής Ιουλίου 1998 για την τροποποίηση του κανονισμού αριθ. 136/66/ΕΟΚ περί δημιουργίας κοινής οργανώσεως αγοράς στον τομέα των λιπαρών ουσιών. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 210/32, 28.07.98*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1513/2001** του Συμβουλίου, της 23<sup>ης</sup> Ιουλίου 2001, για την τροποποίηση των κανονισμών αριθ. 136/66/ΕΟΚ και (ΕΚ) αριθ. 1638/98, όσον αφορά την παράταση του καθεστώτος ενισχύσεων και τη στρατηγική για την ποιότητα του ελαιολάδου. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L201/4, 26.07.01*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 2152/2001** της Επιτροπής, της 31<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 2001, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 2815/98 σχετικά με τα εμπορικά πρότυπα για το ελαιόλαδο. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L288/36, 01.11.01*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1019/2002** της Επιτροπής της 13<sup>ης</sup> Ιουνίου 2002, για τις προδιαγραφές εμπορίας του ελαιολάδου. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L155/27, 14.06.02*

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1964/2002** της Επιτροπής, της 4<sup>ης</sup> Νοεμβρίου 2002, για την τροποποίηση του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1019/2002 για τις προδιαγραφές εμπορίας του ελαιολάδου. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L300/3, 05.11.02*

**Οδηγία 2000/24/ΕΚ** της Επιτροπής, της 28ης Απριλίου 2000, για τροποποίηση των παραρτημάτων των οδηγιών του Συμβουλίου 76/895/ΕΟΚ, 86/362/ΕΟΚ, 86/363/ΕΟΚ και 90/642/ΕΟΚ που αφορούν, αντιστοίχως, τον καθορισμό των ανωτάτων περιεκτικοτήτων για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων πάνω και μέσα στα σιτηρά, στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και σε ορισμένα προϊόντα φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των οπωροκηπευτικών. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 107/28 της 04.05.00*

**Υπουργική Απόφαση του Υπουργού Γεωργίας (ΥΑ) 220426 / 03-03-2003** (ΦΕΚ τ. Β' 285/11.03.03) « Διαδικασία έγκρισης για την αναγραφή της προέλευσης του ελαιολάδου»

**Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Άρθρο 70, εδάφιο 3. Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 2000 (Αποφ. ΑΧΣ 388/96, ΦΕΚ 54/97, τ. Β') Εναρμόνιση με κανονισμό (ΕΚ), αριθ. 2472/97 της Επιτροπής της 11ης Δεκεμβρίου 1997

**Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Άρθρο 70, εδάφιο 6.γ), Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 2000 (Αποφ. ΑΧΣ 528/96, ΦΕΚ 54/97, τ. Β'), σχετικά με την παρουσία βαρέων μετάλλων σε έλαια.

**Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Άρθρο 70, εδάφιο 6.ζ), Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 2001 (Αποφ. ΑΧΣ 145/96, ΦΕΚ 485/96, τ. Β') Εναρμόνιση με την Οδηγία 2/95/Ε.Κ. σχετικά με την απαγόρευση χρήσης προσθέτων.

**Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, Άρθρο 72, Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 1998 (Αποφ. ΑΧΣ 172/95, ΦΕΚ 661/95, τ. Β') (Υπουργικής Απόφασης 100/13-3-2002 ΦΕΚ 355/2002), σχετικά με την παρουσία πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων σε πυρηνέλαια.

**Κώδικας Τροφίμων, Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης**, σελ. 58-11, τμήμα 5, Πίνακας 5.5., Γενικό Χημείο του Κράτους, Αθήνα, 2002, σχετικά με την παρουσία διοξινών σε έλαια.

**Οδηγία 75/106/ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 19<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 1974 περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των Κρατών μελών των αναφερόμενων στην προσυσκευασία κατ'όγκο ορισμένων προσυσκευασμένων υγρών. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, ν 42/1, 15.2.75. Η εναρμόνιση έγινε με την Υπουργική Απόφαση Αρ. Φ1-6909 (Φ.Ε.Κ. 784/Β'/31-12-85).

**Οδηγία 82/711/ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 18<sup>ης</sup> Οκτωβρίου 1982 για τον καθορισμό των βασικών κανόνων που είναι αναγκαίοι για τον έλεγχο της μετανάστευσης των συστατικών των υλικών και αντικειμένων από πλαστική ύλη που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 297/26, 23.10.82. Η εναρμόνιση έγινε με το Άρθρο 26 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών «Πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τα τρόφιμα».

**Οδηγία 85/7 ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 19<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 1984, για την τροποποίηση μιας πρώτης σειράς οδηγιών για την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών των σχετικών με τα τρόφιμα, όσον αφορά την παρέμβαση της Μόνιμης Επιτροπής Τροφίμων. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 2/22, 3.1.85.

**Οδηγία 89/109/ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 21<sup>ης</sup> Δεκεμβρίου 1988, για την προσέγγιση των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τα τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 40/38, 11.2.89. Η εναρμόνιση έγινε με το Άρθρο 21 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών «Γενικοί όροι χρήσης-Επισήμανση».

**Οδηγία 90/128/ΕΟΚ** της Επιτροπής της 23<sup>ης</sup> Φεβρουαρίου 1990, σχετικά με τα πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έρθουν σε επαφή με τρόφιμα. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 75/19. 21.3.90. Η εναρμόνιση έγινε με το Άρθρο 26 του Κώδικα Τροφίμων και Ποτών «Πλαστικά υλικά και αντικείμενα που προορίζονται να έλθουν σε επαφή με τα τρόφιμα».

**Οδηγία 92/59/ΕΟΚ** του Συμβουλίου της 29<sup>ης</sup> Ιουνίου 1992, για τη γενική ασφάλεια των προϊόντων. Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων, L 228/24, 11.8.92. Η εναρμόνιση προς την Οδηγία έγινε με την Υπουργική Απόφαση Αρ. Φ1-503 (ΦΕΚ 98/Β'/1996) «Γενική Ασφάλεια των Προϊόντων – Εναρμόνιση με την Οδηγία του Συμβουλίου 92/59/ΕΟΚ της 29<sup>ης</sup> Ιουνίου 1992».

**Οδηγία 93/43/ΕΚ** του Συμβουλίου της 14.06.93 περί υγιεινής των τροφίμων. Η



εναρμόνιση προς την Οδηγία έγινε με την Κ.Υ.Α. 487 (ΦΕΚ 1219/Β'4-10-2000).

**Οδηγία 2001/22/ΕΚ** της Επιτροπής της 8ης Μαρτίου 2001 για την καθιέρωση τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον επίσημο έλεγχο των συγκεντρώσεων μολύβδου, καδμίου, υδραργύρου και 3-MCPD στα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*, L077/14, 16.03.01.

**Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 466/2001** της Επιτροπής της 8ης Μαρτίου 2001 για τον καθορισμό μέγιστων τιμών ανοχής για ορισμένες προσμείξεις στα τρόφιμα. *Επίσημη Εφημερίδα των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων*, αριθ. L 077/1, 16.03.01

**Κανονισμός 178/2002** του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 28<sup>ης</sup> Ιανουαρίου 2002 για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφάλειας τροφίμων L31/24, 1.2.2002.