

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΣΦΕΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗΣ ΚΑΙ  
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΤΟ ΝΟΜΟ  
ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΝΤΟΥΜΠΑΚΗ ΕΛΕΝΗ**



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2015**

**ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**«ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΣΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗΣ ΚΑΙ  
ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΣΤΟ ΝΟΜΟ  
ΜΕΣΣΗΝΙΑΣ»**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΝΤΟΥΜΠΑΚΗ ΕΛΕΝΗ**

**Εξεταστική Επιτροπή :**

Καπόλος Ιωάννης (επιβλέπων)

Αγριοπούλου Σοφία (επιβλέπουσα)

Σπηλιόπουλος Ιωακείμ

**ΚΑΛΑΜΑΤΑ**

**2015**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης συνέβαλλαν κάποιοι άνθρωποι που χωρίς την πολύτιμη βοήθειά τους δεν θα μπορούσα να την ολοκληρώσω. Πρώτη από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της πτυχιακής μου, την κ. Αγριοπούλου Σοφία, γιατί μου πρότεινε το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας και με βοήθησε τόσο στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους όσο και στη συγγραφή της. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Καπόλο Ιωάννη που εκτός από επιβλέπον καθηγητής της πτυχιακής μου, με βοήθησε και αυτός με την σειρά του στην εκτέλεση του πειραματικού της μέρους και με καθοδηγούσε με τις μοναδικές γνώσεις του. Τις πιο ειλικρινείς μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κ. Σταματελοπούλου Ευχενία, μέλος του ειδικού τεχνικού προσωπικού του εργαστηρίου Χημείας στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας, όπως επίσης και την συμφοιτήριά μου Γεωργοπούλου Μαρία για την πολύτιμη βοήθειά τους σε όλες τις πειραματικές αναλύσεις αλλά και για την όλη υποστήριξή τους, τεχνική και ηθική καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού μέρους της πτυχιακής μου.. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Τσιγκριμάνη Διαμαντίνα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια της Χημείας Τροφίμων του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο τμήμα Χημείας που είχα την τιμή και την χαρά να γνωρίσω κατά την περίοδο της πρακτικής μου άσκησης που διεξάχθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, για την υπομονή και τις συμβουλές της καθώς και την ηθική υποστήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη την διάρκεια συγγραφής της πτυχιακής μου εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια και τους φίλους μου για την κατανόηση τους, την υπομονή τους καθώς και για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη που μου πρόσφεραν.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	5
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	8
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	9
ABSTRACT .....	10
1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	11
1.1 Γενικά .....	11
1.2 Είδη Μυκοτοξινών.....	12
1.2.1 Ergot alkaloids .....	12
1.2.2 Πατουλίνη.....	13
1.2.3 Ωχρατοξίνες.....	13
1.2.4 Αφλατοξίνες .....	15
1.2.5 Φουμονισίνες.....	17
1.2.6 Τοξίνη T2.....	18
1.2.7 Ζεαραλενόνη.....	18
1.2.8 Άλλες τοξίνες.....	19
1.3 Μυκοτοξίνες: Επιπτώσεις στην υγεία.....	23
2 ΔΕΣΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ .....	25
2.1 Εισαγωγή .....	25
2.2 Χημική Δομή .....	26
2.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες .....	27
2.4 Τοξικότητα.....	28
2.5 Φυσικές πηγές μόλυνσης .....	30
2.6 Μύκητας.....	33
2.7 Υγεία.....	35
3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC).....	37
3.1 Ιστορία .....	37
3.2 Χρωματογραφική Διαδικασία.....	38
3.3 Είδη Υγρής Χρωματογραφίας .....	39

3.4	Οργανολογία .....	40
4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	47
4.1	HPLC Ανάλυση .....	47
4.2	Συσκευές και όργανα .....	47
4.3	Αντιδραστήρια .....	48
4.4	Εργαστηριακός Εξοπλισμός .....	48
4.5	Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων Δεσοξυνιβαλενόλης .....	49
4.6	Πειραματική διαδικασία .....	49
5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	52
5.1	Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.....	52
5.2	Έλεγχος ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας με τη χρήση Πιστοποιημένων Υλικών Αναφοράς, CRM. ....	54
5.3	Δοκιμές ανάκτησης.....	55
5.4	Παράθεση χρωματογραφημάτων των δειγμάτων που αναλύθηκαν. ....	57
5.5	Ενεργότητα νερού ( $a_w$ ) .....	59
6	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ.....	62
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	64

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.</b> Χημική δομή Ergot alkaloids .....	12
<b>Σχήμα 2.</b> Χημική δομή Πατουλίνης. ....	13
<b>Σχήμα 3.</b> Ωχρατοξίνες A, B, C .....	14
<b>Σχήμα 4.</b> Χημική δομή Αφλατοξινών B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> .....	16
<b>Σχήμα 5.</b> Χημική δομή Φουμονισινών B1 και B2.....	17
<b>Σχήμα 6.</b> Χημική δομή τοξίνης T2 .....	18
<b>Σχήμα 7.</b> Χημική δομή Ζεαραλενόνης .....	19
<b>Σχήμα 8.</b> Χημική δομή τριχοθεσινών Τύπου Α.....	27
<b>Σχήμα 9.</b> Χημική δομή τριχοθεσινών Τύπου Β.....	27
<b>Σχήμα 10.</b> Συντακτικός τύπος Δεσοξυνιβαλενόλης .....	28
<b>Σχήμα 11.</b> Απεικόνιση της διαδικασίας διαχωρισμού στη χρωματογραφία.....	38
<b>Σχήμα 12.</b> Σχηματική διάταξη ενός χρωματογραφικού συστήματος. ....	40
<b>Σχήμα 13.</b> Κυψελίδα σχήματος .....	44
<b>Σχήμα 14.</b> Σύστημα DAD.....	44
<b>Σχήμα 15.</b> Καμπύλη βαθμονόμησης της μυκοτοξίνης DON.....	53
<b>Σχήμα 16.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της ανάκτησης της Δεσοξυνιβαλενόλης σε δείγμα από αλεσμένο ρύζι συγκέντρωσης 2.800 ppb (CRM).54	
<b>Σχήμα 17.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε ρύζι στα 750 ppb. ....	55
<b>Σχήμα 18.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε βρώμη στα 750 ppb. ....	56

<b>Σχήμα 19.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε σιτάρι στα 750 ppb.....	56
<b>Σχήμα 20.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε φιστίκια στα 750 ppb.....	57
<b>Σχήμα 21.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα ρυζιού. .....	57
<b>Σχήμα 22.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα βρώμης. .....	58
<b>Σχήμα 23.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα σιταριού.....	58
<b>Σχήμα 24.</b> Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα φιστικιού.....	59

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

<b>Πίνακας 1.</b> Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα Δεσοξυνιβαλενόλης για ορισμένες τροφές. ....	29
<b>Πίνακας 2.</b> Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων Δεσοξυνιβαλενόλης.....	49
<b>Πίνακας 3.</b> Δείγματα ρυζιού, φιστικιού, βρώμης και σιταριού που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με HPLC. ....	51
<b>Πίνακας 4.</b> Περιέχονται οι τιμές των συγκεντρώσεων Δεσοξυνιβαλενόλης και των εμβαδών κορυφής για τα πρότυπα διαλύματα Δεσοξυνιβαλενόλης. ....	52
<b>Πίνακας 5.</b> Πίνακες αποτελεσμάτων μετρήσεων Υγρασίας-Θερμοκρασίας σε δείγματα σιταριού, ρυζιού, βρώμης και φιστικιού. ....	60

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> <i>F. graminearum</i> κονίδια, εικόνα από μικροσκόπιο.....	34
<b>Εικόνα 2.</b> <i>F. culmorum</i> εικόνα από μικροσκόπιο. ....	34
<b>Εικόνα 3.</b> Δείγματα φιστικιού, ρυζιού, βρώμης και σιταριού για ανάλυση HPLC. ....	50



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή είχε ως σκοπό την ανίχνευση και τον προσδιορισμό της μυκοτοξίνης δεσοξυνιβαλενόλης σε δείγματα ρυζιού, βρώμης, αραχίδας (αράπικων φιστικιών) και σιταριού με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης. Η μελέτη αφορούσε την ανάλυση των δειγμάτων αυτών για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της μυκοτοξίνης Δεσοξυνιβαλενόλη. Αναπτύχθηκε ενδοεργαστηριακά επικυρωμένη μέθοδος για το σκοπό αυτό και δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης. Ακολούθησαν δοκιμές ανάκτησης που πραγματοποιήθηκαν για την αξιοπιστία της μεθόδου και του ερευνητή. Μελετήθηκε επίσης η ενεργότητα του νερού, με σκοπό την παρατήρηση των τιμών  $a_w$  και την επίδραση που έχει στα αποτελέσματα των δειγμάτων που αναλύθηκαν με H.P.L.C.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μυκοτοξίνες είναι φυσικά προϊόντα που παράγονται από νηματοειδείς μύκητες και η επίδρασή τους στους ανθρώπους διαφοροποιείται και κυμαίνεται από αρκετά τοξική σε ανοσοκατασταλτική ή καρκινογόνα. Οι μύκητες που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μιας μεγάλης κατηγορίας μυκοτοξινών είναι κυρίως οι *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* και *Claviceps*. Η πρόσληψη μυκοτοξινών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγικότητα, σε βλάβη των οργάνων, και σε ανοσοκαταστολή. Αυτές οι μυκοτοξίνες περιλαμβάνουν την αφλατοξίνη, τη δεσοξυνιβαλενόλη, τη φουμονισίνη, την ωχρατοξίνη, και τη ζεαραλενόνη. Οι τριχοθεσίνες είναι μια κατηγορία μυκοτοξινών που χωρίζονται σε δύο τύπους, τον τύπο Α που περιέχει τους μύκητες *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium roae* και *Fusarium Equiseti* και τον τύπο Β που περιέχει τους μύκητες *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* και *Fusarium cerealis*. Η Δεσοξυνιβαλενόλη παράγεται κυρίως από τον *Fusarium graminearum* και από τον *Fusarium culmorum*. Είναι μια τοξίνη που εμφανίζεται συχνότερα σε κόκκους και όταν προσλαμβάνεται σε υψηλές δόσεις από ζώα προκαλεί ναυτία, εμετό, και διάρροια ενώ όταν προσλαμβάνεται από χοίρους και άλλα ζώα σε μικρές δόσεις μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους και άρνηση τροφής.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας διεξήχθη ανάλυση δειγμάτων σιταριού, βρώμης, φιστικιών και ρυζιού με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης, με σκοπό την ανίχνευση και μέτρηση της μυκοτοξίνης Δεσοξυνιβαλενόλη. Ακόμη παρασκευάστηκαν έξι διαφορετικά πρότυπα διαλύματα (100, 400, 800, 1200, 1600, 2000 ppb) της ίδιας τοξίνης με στόχο την δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης. Επίσης διεξήχθη ενδοεργαστηριακός έλεγχος με την χρήση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM) καθώς και δοκιμές ανάκτησης για την πιστοποίηση της μεθόδου και του εργαστηρίου. Κατά την πορεία των αναλύσεων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε και μέτρηση της ενεργότητας του νερού που η αυξημένη ύπαρξή της οδηγεί στη δημιουργία και ανάπτυξη της Δεσοξυνιβαλενόλης

**Λέξεις κλειδιά:** Δεσοξυνιβαλενόλη, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, HPLC, σιτάρι, βρώμη, φιστίκια, ρύζι.

## **ABSTRACT**

Mycotoxins are natural products produced by filamentous fungi and their effect on humans varies and ranges from quite toxic to immunosuppressant or carcinogenic. The fungi which are responsible for the production of a large class of mycotoxins are mainly *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* and *Claviceps*. The intake of mycotoxins can lead in reduced growth and productivity, in organ damage, and in immunosuppression. These mycotoxins include aflatoxin, deoxynivalenol, fumonisin, ochratoxin, and zearalenone. Trichothecenes are a class of mycotoxins divided into two types, type A containing the fungi *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae* and *Fusarium Equiseti* and type B containing the fungi *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium cerealis*. Deoxynivalenol is mainly produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. It is a toxin that often appears in grains and when ingested in high doses by animals causes nausea, vomiting, and diarrhea but when ingested by pigs and other animals in small doses can cause weight loss and refusal of food.

As part of this study conducted an analysis of samples of wheat, oats, peanuts and rice by the method of High Performance Liquid Chromatography, the purpose was the detection and measurement of the mycotoxin deoxynivalenol. Although they were prepared six different standard solutions (100, 400, 800, 1200, 1600, 2000 ppb) of the same toxin in order to produce a calibration curve. Also conducted laboratory control with the use of certified reference material (CRM) and recovery tests to certify the method and the laboratory. During the course of the sample analyzes also performed measurement of water activity that the increased existence leads to the creation and development of deoxynivalenol.

**Keywords:** deoxynivalenol, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, HPLC, wheat, oats, peanuts, rice.

# 1 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

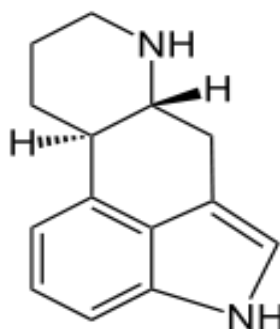
## 1.1 Γενικά

Όλες οι μυκοτοξίνες είναι φυσικά προϊόντα χαμηλού μοριακού βάρους (δηλαδή, μικρά μόρια), που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από νηματοειδείς μύκητες (Alexandra C. et al., 2011, Warth et al., 2012, Nicholson, Centre and U.K., 2004). Οι μυκοτοξίνες είναι δομικά διαφορετικές, προέρχονται από έναν αριθμό βιοσυνθετικών οδών και η επίδρασή τους στους καταναλωτές είναι εξίσου ποικίλη και κυμαίνεται από έντονα τοξική σε ανοσοκατασταλτική ή καρκινογόνα. Η παραγωγή μιας συγκεκριμένης μυκοτοξίνης περιορίζεται σε συγκεκριμένα είδη μυκήτων και, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να περιορίζεται σε συγκεκριμένα στελέχη μέσα σε ένα είδος. (Nicholson, Centre and U.K., 2004). Πολλές από αυτές τις ισχυρές χημικές οργανικές ουσίες μπορεί να βρεθούν στα τρόφιμα και μπορεί να είναι επιβλαβείς αν καταποθούν σε αρκετά υψηλές ποσότητες ή αν καταναλώνονται για μεγάλο χρονικό διάστημα. (Marroquín-Cardona et al., 2014). Ανάλογα με τον ορισμό που χρησιμοποιείται, και αναγνωρίζοντας ότι οι περισσότερες τοξίνες από μύκητες εμφανίζονται σε οικογένειες που συνδέονται χημικά με μεταβολίτες, περίπου 300 έως 400 ενώσεις αναγνωρίζονται πλέον ως μυκοτοξίνες, εκ των οποίων μερικές ομάδες επιστούν την προσοχή ως απειλή για την υγεία των ανθρώπων και των ζώων (Cole and Cox, 1981, Atanda S.A. et al., 2012, Alexandra C. et al., 2011, Nicholson, Centre and U.K., 2004). Ενώ όλες οι μυκοτοξίνες είναι μυκητιακής προέλευσης, δεν είναι όλες τοξικές. (Atanda S.A. et al., 2012). Οι μύκητες που είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή μιας μεγάλης πλειοψηφίας μυκοτοξινών είναι κυρίως οι *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* και *Claviceps* (Geisen, 1998, D'Mello et al., 1998). Η πλειοψηφία αυτών των μυκήτων μολύνουν τα φυτά πριν από τη συγκομιδή και μπορούν να θεωρηθούν ως φυτοπαθογόνα, ενώ άλλοι καθίστανται ενεργοί μετά τη συγκομιδή, όπου οι συνθήκες αποθήκευσης είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη των μυκήτων. (Nicholson, Centre and U.K., 2004). Η ανάπτυξη του μύκητα μπορεί να λάβει χώρα κάτω από μια ποικιλία συνθηκών περιβάλλοντος, τη θερμοκρασία και την υγρασία τόσο πριν όσο και μετά τη συγκομιδή (Binder et al., 2007). Η κατάποση των μυκοτοξινών μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανάπτυξη και παραγωγικότητα, σε βλάβη των οργάνων, και σε ανοσοκαταστολή (CAST, 2003). Επιβλαβείς μυκοτοξίνες που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία είναι η αφλατοξίνη (AF), η δεσοξυριβαλενόλη (DON), η φουμονισίνη (FUM), η ωχρατοξίνη (OCH), και η ζεαραλενόνη (ZEA) (Huwig et al., 2001, Richard, 2007, Marases. et al., 2008, Alexandra C. et al., 2011).

## 1.2 Είδη Μυκοτοξινών

### 1.2.1 Ergot alkaloids

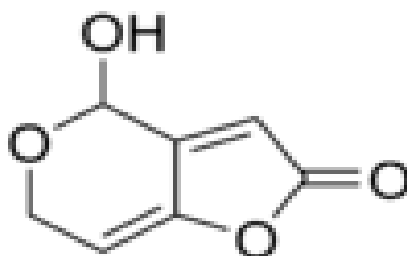
Τα αλκαλοειδή της ερυσιβόδους όλυρας παράγονται από μια σειρά μυκήτων, του γένους *Claviceps* όπως *C. purpurea*, *C. fusiformis*, *C. paspali*, *C. africana*, και *C. lutea* που είναι παθογόνα των φυτών (CAST, 2003), και εισβάλουν στο γυναικείο τμήμα του φυτού ξενιστή και αντικαθιστούν την ωοθήκη με μια μάζα ιστών από μύκητες που ονομάζεται σκληρώτιο. (Richard, 2007, Brera. et al., 2008). Η απομόνωση της εργοτοξίνης από τους Barger G. και Carrin F.H., που ονομάστηκε έτσι γιατί έχει περισσότερες τοξικές επιδράσεις παρά θεραπευτικές όπως η ερυσιβόδους, ήταν το σημείο εκκίνησης για την απομόνωση της εργοταμίνης. Μια από τις παλαιότερες μυκοτοξικές ενώσεις είναι ο Εργοτισμός. Η πρώτη τεκμηριωμένη επιδημία εργοτισμού πιθανόν να συνέβη το 944-945 μ.Χ. όταν περίπου 20.000 άνθρωποι πέθαναν στην Γαλλία από δηλητηρίαση ερυσιβόδους. Τα αλκαλοειδή της ερυσιβόδους αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα των ενώσεων που περιέχουν μύκητες που ευνοείται η ανάπτυξή τους παρουσία αζώτου και χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση τις χημικές ομοιότητές τους: τις clavines (agroclavine, elymoclavine και lysergol), τα λυσεργικά οξέα, τα αμίδια του λυσεργικού οξέος (ergine, methergine, εργονοβίνη, μεθυσεργίδη και LSD) και τα ergopeptines (ergovaline, aergosine, εργοταμίνη και α-εργοκρυπτίνη). Πάνω από 80 διαφορετικά αλκαλοειδή της ερυσιβόδους όλυρας έχουν απομονωθεί και έχουν χρησιμοποιηθεί για θεραπευτικούς και φαρμακευτικούς σκοπούς, όπως η εργονοβίνη (για τη ρύθμιση της οξυτοκίνης), η εργοταμίνη (κύριο συστατικό αναλγητικού για την ημικρανία), η βρωμοκρυπτίνη (που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της νόσου του Πάρκινσον) καθώς και το πιο γνωστό παράγωγο όλης της εργοταμίνης που είναι η ψυχεδελική λυσεργίνη (που κατατάσσεται στα ναρκωτικά, LSD). (Reha'cek and Sajdl, 1990, Brera. et al., 2008).



Σχήμα 1. Χημική δομή Ergot alkaloids

### 1.2.2 Πατουλίνη

Η πατουλίνη είναι λακτόνη πολυκετιδίου που παράγεται από διάφορα είδη μυκήτων των γενών *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*, *Eurpenicillium* και *Paecilomyces* (Atanda S.A. et al., 2012, Nicholson, Centre and UK., 2004, Brera. et al., 2008, Marin et al., 2013, Sewram et al., 2000, Spreijers, 2004, Jones and Toal, 2003, Stinson et al., 1978, Long, 1997, Morales et al., 2007). Ο μύκητας *P. expansum* είναι το είδος με τη μεγαλύτερη γεωργική σημασία. Η πατουλίνη προσβάλλει προϊόντα όπως τα βερίκοκα, τα σταφύλια, τα ροδάκινα, τα αχλάδια, τα μήλα, τις ελιές, τα δημητριακά, και τους χυμούς φρούτων χαμηλής οξύτητας (Atanda S.A. et al., 2012, Nicholson, Centre and U.K., 2004, Sewram et al., 2000, Spreijers, 2004). Η θερμική επεξεργασία μειώνει τα επίπεδα πατουλίνης, ωστόσο δεν εξαλείφεται η παρουσία της κατά τη διαδικασία της παστερίωσης σε ένα χυμό μήλου που έχει μολυνθεί με αυτή. (Stinson et al., 1978, Long, 1997). Παρουσία της σε χυμούς φρούτων και ιδιαίτερα σε χυμούς μήλου αποτελεί κίνδυνο για τον άνθρωπο. Η πατουλίνη λιώνει στους περίπου 110 °C, είναι διαλυτή στο νερό, στη μεθανόλη, στην αιθανόλη, στην ακετόνη, στον οξικό αιθυλεστέρα και λιγότερο διαλυτή στο διαιθυλαιθέρα και στο βενζόλιο. Είναι σταθερή σε όξινα διαλύματα και ευαίσθητη στην αλκαλική υδρόλυση (Brera. et al., 2008).

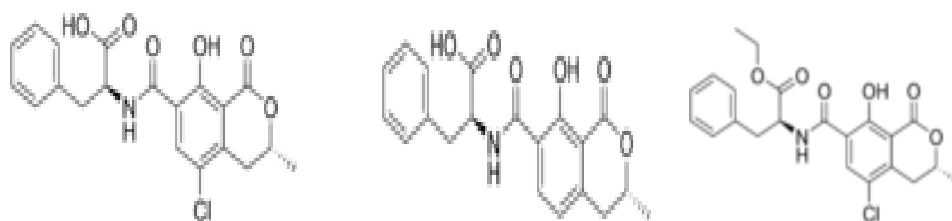


Σχήμα 2. Χημική δομή Πατουλίνης.

### 1.2.3 Ωχρατοξίνες

Οι ωχρατοξίνες παράγονται από διάφορα στελέχη του *P. verrucosum* (CAST, 2003), και *Aspergillus*. (Aish et al., 2004, Atanda S.A. et al., 2012). Προσβάλλουν τρόφιμα όπως τα δημητριακά, τον καφέ, το κακάο, το κρασί, τη μύρα και τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ιδιαίτερα το χοιρινό κρέας. (Bayman and Baker, 2006). Οι περισσότερες καλλιέργειες έχουν μολυνθεί με ωχρατοξίνη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, όταν υπάρχει υψηλή υγρασία και θερμοκρασία (Richard, 2007). Οι

ωχρατοξίνες περιγράφονται ως νεφροτοξικές μυκοτοξίνες, προκαλώντας βλάβες στα νεφρά ατόμων που έχουν εκτεθεί σε αυτές. (Hussein and Brasel, 2001, CAST, 2003, Richard, 2007, Manning and Wyatt, 1984, Lanza, Washburn and Wyatt, 1980). Άλλες επιδράσεις από την κατανάλωση μολυσμένης τροφής με ωχρατοξίνες είναι η μείωση της ανάπτυξης και της αποδοτικότητας των ζωοτροφών, η μειωμένη παραγωγή αυγών σε ωοτόκες όρνιθες, η βλάβη του ήπατος ή ακόμα και θνησιμότητα αν καταναλωθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις (CAST, 2003) και η δημιουργία όγκων σε ανθρώπους (Krogh, 1978). Η ωχρατοξίνη Α παράγεται από τον *A. ochraceus* (Van der Merwe et al., 1965), τον *P. ochraceus verrucosum*, (Cast, 2003). τον *A. circumdati*, τον *A. nigri* και τον *P. nordicum* (EFSA., 2006a) ωστόσο και άλλα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* έχουν δείξει ότι παράγουν τις ωχρατοξίνες Α και C (Bennet and Klich, 2003) και είναι μια άχρωμη κρυσταλλική ένωση που εμφανίζει μπλε φθορισμό κάτω από υπεριώδες φως. (Brera. et al., 2008). Η ωχρατοξίνη Α έχει ένα άτομο χλωρίου συνδεδεμένο στον αρωματικό δακτύλιο, στο οποίο οφείλεται η τοξικότητά της. (Ciegler et al., 1973, Smith and Ross, 1991). Μπορεί να μολύνει ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των σταφυλίων, του καφέ, των προϊόντων σόγιας, το τυρί και το κριθάρι (Richard, 2007) και έχει θεωρηθεί ότι παράγεται σε συνθήκες αποθήκευσης που ευνοούν την ανάπτυξη μούχλας και την παραγωγή τοξινών (Richard, 2007). Αυτή η μυκοτοξίνη είναι μια ισχυρή νεφροτοξίνη και είναι πιθανόν καρκινογόνα για τον άνθρωπο (IARC, 1993a, Aish et al., 2004). Ένας επιπλέον λόγος που την καθιστά σημαντική για την υγεία του ανθρώπου είναι η τυχόν ύπαρξή της στη σκόνη του σπιτιού όπως και σε άλλα αιωρούμενα σωματίδια. (Alexandra C. et al., 2011). Είναι υπεύθυνη για διάφορες νεφροπάθειες, συμπεριλαμβανομένων των ενδημικών νεφροπαθειών στους χοίρους (Jorgensen and Petersen, 2002). Η ωχρατοξίνη Α έχει αποδειχθεί επίσης επιβλαβής για το ήπαρ, ανοσοτοξική και καρκινογόνα σε πειραματικά μοντέλα. (O' Brien and Dietrich, 2005, Pfohl-Leszkwicz et al., 2002).



Σχήμα 3. Ωχρατοξίνες Α, Β, C

#### 1.2.4 Αφλατοξίνες

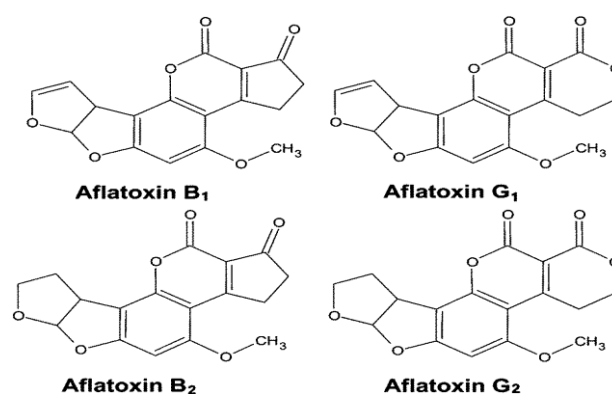
Οι αφλατοξίνες είναι πολυκετιδικές ενώσεις που παράγονται από το μύκητα *Aspergillus*, συμπεριλαμβανομένων των *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. pseudotamarii* και τον *A. flavus*. (Marroquín-Cardona et al., 2014, Alexandra C. et al., 2011, Nicholson, Centre and U.K., 2004, CAST, 2003, Brera. et al., 2008, Richard, 2007, Marin et al., 2013, Sweeney and Dobson, n.d., Dersjant-Li, Versteegen and Gerrits, 2003, Varga et al., 2003a, Moreno and M.S., 1999, Ito et al., 2001, Kurtzman, Horn and Hesseltine, 1987, Payne, 1998, Dragan and Pitot, 1994). Η τοξίνη που παράγεται από το μύκητα *A.flavus* ονομάστηκε αφλατοξίνη και τα τέσσερα διαφορετικά συστατικά τοξίνης που έχουν εντοπιστεί είναι οι B1, B2 που βρίσκονται στα φύλλα και οι G1, G2 που παράγονται από τον *A. parasiticus* και είναι προσαρμοσμένος στο περιβάλλον του εδάφους (EFSA, 2007, Xu et al., 2000, D' Mello and MacDonald, 1997). Αυτές οι τοξίνες διαφοροποιούνται χρωματικά φθορίζοντας όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία, με τις B1, B2 να δίνουν μπλε χρώμα και τις G1, G2 να δίνουν κίτρινο-πράσινο (Qian et al., 1994, Atanda S.A. et al., 2012, Dragan and Pitot, 1994, Agag, 2004, Sargeant, 1963).

Υπάρχουν και δυο άλλοι μεταβολίτες οι M1 και M2 που μπορεί να παραχθούν σε ιστούς και υγρά (όπως το γάλα) των ζώων μετά την υδροξυλίωση από τις αφλατοξίνη B1 και αφλατοξίνη B2 (CAST, 2003, Dersjant-Li, Versteegen and Gerrits, 2003, Richard, 2007, Frobish et al., 1986), όταν καταναλωθούν τα τρόφιμα που έχουν μολυνθεί από αυτές. (O' Brian, Fakhoury and Payne, 2003). Η αφλατοξίνη M1 είναι ηπατοτοξική, αλλά όχι τόσο καρκινογόνα. (Carnaghan, Hartley and O' Kelly, 1963) και έχει βρεθεί σε μεγάλο βαθμό σε μια σειρά από προϊόντα διατροφής, συμπεριλαμβανομένων των παρασκευασμάτων για βρέφη, το γάλα, το τυρί και το γιαούρτι (Galvano, Galofaro and Galvano, 1996).

Ο μύκητας που παράγει την αφλατοξίνη βρίσκεται στο έδαφος ως σαπρόφυτα, αλλά μπορεί να μεταδοθούν στους ιστούς των φυτών, όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές (Gourama and Bullerman, 1995). Οι περίοδοι ξηρασίας σε συνδυασμό με τις υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν την παραγωγή αφλατοξινών (Sanders et al., 1993) που μπορεί να συμβεί σε δύο φάσεις: την ανάπτυξη της μόλυνσης στις καλλιέργειες και την ανάπτυξη της μόλυνσης μετά την ωρίμανση και τη συγκομιδή (Cotty and Jaime-García, 2007). Ακόμη ανάπτυξη των αφλατοξινών και παραγωγή των μυκήτων



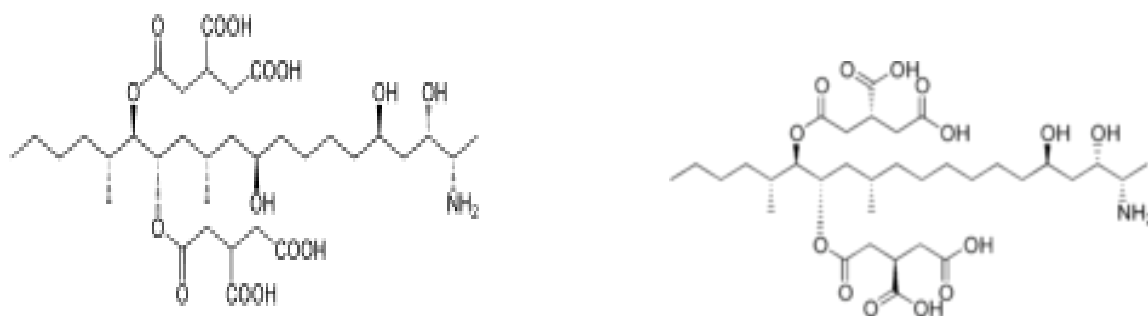
παρατηρείται κατά την αποθήκευση σε υγρασία μεγαλύτερη από 85% και θερμοκρασία πάνω από 25%. (Diener, 1969), γι' αυτό τα σιτηρά θα πρέπει να διατηρούνται σε στεγνό, χωρίς ζημιές και χωρίς έντομα αποθηκευτικό χώρο (Richard, 2007). Η απορρόφηση των αφλατοξινών συμβαίνει μέσω της επένδυσης του εντερικού σωλήνα, όπου αυτό στη συνέχεια κινείται εντός της ροής του αίματος και μεταφέρεται στο ήπαρ. Η κατάποση αφλατοξινών από τα ζώα μπορεί να οδηγήσει σε πολλά προβλήματα, όπως είναι ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, η ηπατική βλάβη και η ανοσοκαταστολή (CAST, 2003). Μπορεί να επηρεάσει επίσης τον άνθρωπο επειδή θεωρείται καρκινογόνα και οδηγεί σε θάνατο όταν καταναλωθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι αφλατοξίνες μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε είδος σε οποιαδήποτε ηλικία, τα προβλήματα είναι όμως μεγαλύτερα σε νεαρά ζώα και σε ορισμένα είδη. (Hussein and Brasel, 2001, Agag, 2004, Richard, 2007, Meissonnier et al., 2008, Thieu, Ogle and Pettersson, 2008). Από αυτές τις έξι μορφές η αφλατοξίνη B1 θεωρείται να είναι η πιο τοξική μετά από οξεία και χρόνια κατάποση και προκαλεί καρκίνο του ήπατος, (Busby and Wogan, 1984), (Squire, 1989, Dragan and Pitot, 1994) και έχει καταχωθεί στην Πρώτη Ομάδα που είναι καρκινογόνα για τον άνθρωπο (IARC, 1993a, IARC, 2012). Η ευαισθησία που παρουσιάζουν τα άτομα και τα ζώα που εκτίθενται στην αφλατοξίνη B1 ποικίλει ανάλογα με τη φυλή, το είδος, την ηλικία, τη δόση, τη διάρκεια της έκθεσης και τη διατροφική κατάσταση (Richard, 2007). Η αφλατοξίνη B1 είναι επίσης ένας ανοσολογικός καταστολέας (Qian et al., 2013, Pestka, 2000, Jiang et al., 2005, Jiang et al., 2008) για την ανάπτυξη ζώων και ανθρώπων. (Harvey et al., 1991, Harvey et al., 1994, Marin et al., 2002, Turner et al., 2007, Mahdari et al., 2010, Gong et al., 2002).



**Σχήμα 4.** Χημική δομή Αφλατοξινών B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>

### 1.2.5 Φουμονισίνες

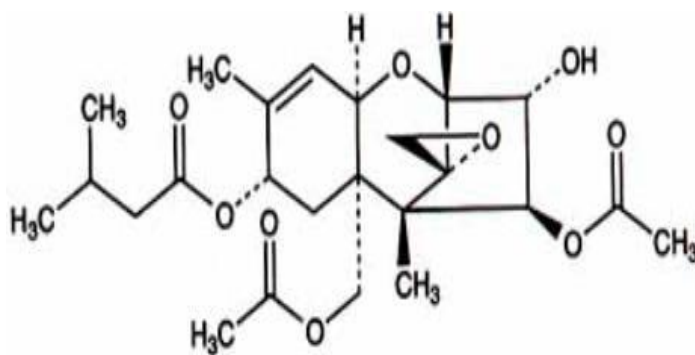
Οι φουμονισίνες παράγονται από τους μύκητες *F. verticillioides* και *F. proliferatum* (Marasas, 1995, Marin et al., 2004, Richard, 2007) και σε πολύ χαμηλά επίπεδα από *Alternaria*. Άλλα είδη μυκήτων όπως *F. napiforme*, *F. dlamini* και *F. nygamai* παράγουν επίσης φουμονισίνες (EFSA, 2008). Αναπτύσσονται καλύτερα όταν οι καλλιέργειες υποβάλλονται σε στρες ξηρασίας και ακολουθούν υψηλές θερμοκρασίες και σε υγρά κλίματα και προσβάλλουν τρόφιμα όπως το καλαμπόκι και άλλα δημητριακά όπως το σόργο και το ρύζι (Marin, Sanchis and Magan, 1995, CAST, 2003, Dersjant-Li, Versteegen and Gerrits, 2003, Richard, 2007). Οι φουμονισίνες σχηματίζονται στον αραβόσιτο πριν από τη συγκομιδή ή κατά τη διάρκεια του πρώιμου σταδίου της αποθήκευσης. Τρεις μορφές των φουμονισινών είναι γνωστές και περιλαμβάνουν τη φουμονισίνη B1, B2, B3 και B4 (Nelson, Desjardins and Plattner, 1993). Η φουμονισίνη B1 είναι η πιο κοινή και επιβλαβής, νεφροτοξική και ηπατοτοξική σε διάφορα είδη και έχει χαρακτηριστεί καρκινογόνα για τον άνθρωπο (IARC, 2002, JECFA, 2012, Hussein and Brasel, 2001). Η έκθεση σε φουμονισίνη B1 έχει συσχετιστεί με ηπατικά προβλήματα και καρκίνο του οισοφάγου σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου (Alizadeh et al., 2012, Chu and Li, 1994, Persson et al., 2012, Rheeder et al., 1998), έχει επίσης ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου για ανωμαλίες του νευρικού σωλήνα (NTDs) (Gelineau-van Waes et al., 2009, Missmer et al., 2006, Suarez et al., 2012). Οι φουμονισίνες είναι εξαιρετικά υδατοδιαλυτές επειδή δεν έχουν αρωματική δομή ή ένα αναλυτικό χρωμοφόρο για εύκολη αναλυτική ανίχνευση και εμπλέκονται σε νόσους των συστημάτων οργάνων όπως ο εγκέφαλος, οι πνεύμονες, τα νεφρά και το ήπαρ (CAST, 2003) καθώς και σε καρκίνο του οισοφάγου από μολυσμένο αραβόσιτο (Nelson, Desjardins and Plattner, 1993)



Σχήμα 5. Χημική δομή Φουμονισινών B1 και B2.

### 1.2.6 Τοξίνη T2

Ανήκει στην ομάδα των τριχοθεσινών και παράγεται από τους μύκητες του γένους *F. sporotrichioides*. Αυτή η μυκοτοξίνη μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη χαμηλού επιπέδου πολλών καλλιεργειών όπως του καλαμποκιού, του σιταριού, του κριθαριού, του ρυζιού, της σίκαλης και της βρώμης. Η T2 τοξίνη σε περίπτωση κατάποσης διαταράσσει τη σύνθεση των πρωτεϊνών και του νουκλειικού οξέος. Ακόμη παρατηρείται απώλεια βάρους, ανοσοκαταστολή και βλάβες στο δέρμα (Richard, 2007).



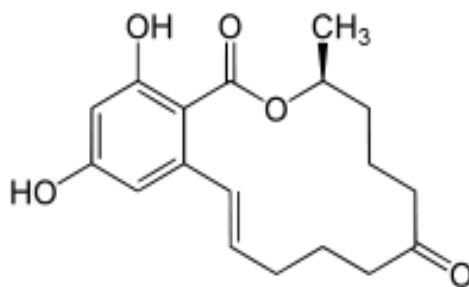
Σχήμα 6. Χημική δομή τοξίνης T2

### 1.2.7 Ζεαραλενόνη

Η ζεαραλενόνη είναι μια οιστρογονική μυκοτοξίνη μη στεροειδής, φαινολική λακτόνη πεσοκυκλικού οξέως (Diekman and Green, 1992) που παράγεται από διάφορα είδη του γένους *Fusarium* (Goertz et al., 2010, Marques et al., 2008, SCOOP, 2003) και συγκεκριμένα το *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. sacchari*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* και *F. incarnatum* (CAST, 2003, EFSA, 2011a). Αυτά τα είδη μπορούν να παράγουν μικρές ποσότητες αρκετών σχετικών μεταβολιτών, η  $\alpha$ -zearalenol και η  $\beta$ -zearalenol είναι τα πιο σημαντικά παράγωγα (Richardson, Hagler and Mirocha, 1985). Αυτή η μυκοτοξίνη είναι μια λευκή κρυσταλλική ένωση η οποία εμφανίζει μπλε-πράσινο φθορισμό όταν διεγείρεται από υπεριώδες φως με μεγάλο μήκος κύματος (360 nm) και έναν πιο έντονο πράσινο φθορισμό όταν διεγείρεται με υπεριώδες φως μικρού μήκους κύματος (260 nm). Είναι διαλυτή στο νερό, ελαφρώς

διαλυτή στο εξάνιο και περισσότερο διαλυτή στο βενζόλιο, στο ακετονιτρίλιο, στο διχλωρομεθάνιο, στη μεθανόλη, στην αιθανόλη και στην ακετόνη (Brera. et al., 2008).

Η ανάπτυξη των μυκήτων που παράγουν την ζεαραλενόνη εμφανίζεται κυρίως σε εύκρατες συνθήκες και τα υψηλά επίπεδά της στον τομέα των σιτηρών συνδέονται κυρίως με υγρό ήπιο καιρό και ακατάλληλη αποθήκευση σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας. Μολύνει συνήθως καλαμπόκι, σιτάρι, κριθάρι σόργο και σίκαλη (CAST, 2003). Όταν μολυνθεί ο σπόρος αναπτύσσεται συχνά ένας ροζ χρωματισμός που ο μύκητας παράγει ταυτόχρονα με την τοξίνη (Richard, 2007). Αυτή η μυκοτοξίνη είναι σε μια μη ταξινομημένη θέση ως καρκινογόνα για τον άνθρωπο έχει οιστρογονική δραστηριότητα μαζί με αναβολικές επιδράσεις (IARC, 1993b). Επιδρά στο αναπαραγωγικό και στο ουροποιητικό σύστημα και έχει συνδεθεί με τόνωση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του μαστού σε ανθρώπους που έχουν υποδοχείς απόκρισης οιστρογόνων (Hussein and Brasel, 2001, Fink-Gremmels, 2006).



**Σχήμα 7.** Χημική δομή Ζεαραλενόνης

## 1.2.8 Άλλες τοξίνες

### 1.2.8.1 Citrinin

Είναι μυκοτοξίνη η οποία παράγεται από τον *A. ochraceus*, *P. citrinum* και άλλων ειδών τα οποία μολύνουν σιτηρά. Προκαλεί νεφροπάθειες σε ζώα και έχει ενοχοποιηθεί ως αιτία νεφροπαθειών στους ανθρώπους. Συχνά συνυπάρχει με την Ωχρατοξίνη, με την οποία έδειξε συνεργιστική δράση (Vrabcheva et al., 2000, Marquardt, 1996).

#### **1.2.8.2 Κυκλοπιαζονικό οξύ**

Το κυκλοπιαζονικό οξύ παράγεται κυρίως από τον *P. cyclospium*. Είναι διαλυτό στο χλωροφόρμιο και στο διμεθυλοσουλφοξείδιο. Θεωρείται μια ισχυρή νευροτοξίνη που μπορεί να αποβεί μοιραία σε περίπτωση κατάποσης ή εισπνοής. Ωστόσο το κυκλοπιαζονικό οξύ είναι τοξικό όταν βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις (Brera. et al., 2008).

#### **1.2.8.3 Sterigmatocystin**

Παράγεται κυρίως από τον μύκητα *A. versicolor*. Έχει αναφερθεί για την εμφάνισή του σε μυχλιασμένα σιτηρά, πράσινα κουκιά, στον καφέ και στο τυρί (Brera. et al., 2008).

#### **1.2.8.4 Μονιλιφορμίνη**

Η Μονιλιφορμίνη σχηματίζεται σε σιτηρά από τα είδη *Fusarium* όπως από τον *F. Avenaceum*, *F. subglutinans* και *F. proliferatum*. Είναι μια ιοντική ένωση που σχηματίζει άλατα νατρίου και καλίου και είναι διαλυτό σε νερό και πολικούς διαλύτες. Αυτή η μυκοτοξίνη δεν έχει λάβει ακόμα πολύ προσοχή διότι δεν φαίνεται να είναι καρκινογόνα και σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να είναι απαραίτητη για να προκαλέσει σημαντικές τοξικολογικές αντιδράσεις (Brera. et al., 2008).

#### **1.2.8.5 Gliotoxin**

Είναι μια ανοσοκατασταλτική τοξίνη που παράγεται από τον *A. fumigatus* και είναι υπεύθυνη για την αναπνευστική ασθένεια γνωστή ως ασπεργίλλωση σε γαλοπούλες. Η ένωση αυτή ανήκει σε μια ομάδα μυκήτων, που είναι μεταβολίτες και μερικοί από αυτούς τοξικοί, που ονομάζεται epiolythiodioxopiperazines. Αυτή η τοξίνη εμφανίζει ανοσοκατασταλτική δραστηριότητα έναντι ορισμένων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (Brera. et al., 2008).

#### 1.2.8.6 Citreoviridin

Είναι μια ισχυρή νευροτοξίνη που αρχικά απομονώθηκε από καλλιέργειες που λήφθηκαν από το ρύζι που σχετίζονταν με μια ασθένεια που ονομάζεται καρδιακή beriberi που συνέβαινε για τρεις αιώνες στην Ιαπωνία. Η τοξίνη αυτή παράγεται από τους μύκητες *P. citreoviride*, *P. toxicarium* και *P. ochrosalmoneum*. Ο μύκητας αυτός ευνοείται από χαμηλές θερμοκρασίες και προκαλεί παράλυση, δύσπνοια, καρδιαγγειακές διαταραχές και απώλεια της όρασης σε πειραματόζωα (Ueno, 1974).

#### 1.2.8.7 Tremorgenic mycotoxins

Αυτές οι τοξίνες παράγονται από ένα ευρύ φάσμα μυκήτων που ανήκουν στα γένη *Penicillium*, *Aspergillus* και *C. acremonium* (Steyn and Vleggaar, 1985). Βάση της χημικής ομοιότητας, τουλάχιστον 20 μυκοτοξίνες έχουν αναγνωρισθεί ως tremorgens (ενώσεις ικανές να επάγουν σοβαρό μυϊκό τρόμο σε ένα ή περισσότερα σπονδυλωτά). Αυτές οι τοξίνες μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις ομάδες: τα penitremms, την ομάδα fumitremorgen verruculogen, τα paspalines και την ομάδα tryptoquivaline. Τα είδη *Penicillium* παράγουν τις πιο tremorgenic μυκοτοξίνες (Mantle and Penny, 1981). Άλλες αξιοσημείωτες tremorgenic μυκοτοξίνες είναι οι Lolitrem A-F. Η Lolitrem B είναι ένα ισχυρό νευροτοξικό και γενικά θεωρείται ότι είναι το κυρίαρχο αλκαλοειδές ενδόφυτο (Gallagher et al., 1984). Η δηλητηρίαση με τις μυκοτοξίνες αυτές προκαλούν σύνδρομα που έχουν τεκμηριωθεί σε πολλά ζώα, συμπεριλαμβανομένων των σκύλων βοοειδών, προβάτων, κουνελιών, πουλερικών και τρωκτικών (Hocking, Holds and Tobin, 1998, Puls and Ladyman, 1988).

#### 1.2.8.8 Penicillic acid

Το penicillic acid είναι μια πολυκετιδική μυκοτοξίνη που παράγεται από διάφορα είδη *Aspergillus* και *Penicillium*, με ιδιαίτερη έμφαση στο *P. cyclospium* και στο *P. canescens*. Αυτή η μυκοτοξίνη έχει αναφερθεί ότι δημιουργεί καρκίνο του ήπατος

σε ορισμένα είδη ζώων όπως επίσης έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την καρδιά (Brera. et al., 2008).

#### **1.2.8.9 Roquefortine**

Οι Roquefortines A, B και C είναι νευροτοξικοί μεταβολίτες του *P. roqueforti* (El-Banna, Pitt and Leistner, 1997) που είναι μια από τις ισχυρότερες μυκοτοξίνες που είναι ασταθής και ταχέως αλλοιώσιμη (Wagener, Davis and Diener, 1980).

#### **1.2.8.10 3-Nitropropionic acid**

Το 3-νιτροπροπιονικό οξύ είναι μια γνωστή νευροτοξίνη δευτερογενούς μεταβολίτη που παράγεται από πολλά είδη *Aspergillus* της οικογένειας *leguminosae* (Brera. et al., 2008).

#### **1.2.8.11 Fusaproliferin**

Είναι μια τοξική μυκοτοξίνη που έχει απομονωθεί από το *F. proliferatum*, ένα διαδεδομένο παθογόνο των σιτηρών. Το 1995, ερευνητές στην Ιταλία ανέφεραν μια προηγουμένως άγνωστη τοξίνη, την fusaproliferin, που παράγεται από τον *F. proliferatum* και τον *F. subglutinans* (Logrieco et al., 1996), (Manetti et al., 1995, Ritieni et al., 1995). Ο *F. proliferatum* έχει ανιχνευθεί σε δείγματα ζωοτροφών που σχετίζεται με την άρνηση των ζωοτροφών, αλλά δεν υπάρχει άμεση απόδειξη ότι προκαλεί τα συμπτώματα της άρνησης τροφής (Munkvold et al., 1998).

#### **1.2.8.12 Alternaria toxins**

Οι μυκοτοξίνες *Alternaria* περιλαμβάνουν ένα μικρό ποσοστό από τις περισσότερες από 70 φυτοτοξίνες που παράγονται από αυτό το γένος και έχουν χαρακτηριστεί χημικές και ότι δρουν ως μυκοτοξίνες σε ανθρώπους και ζώα. Ανήκουν σε τρεις διαφορετικές δομικές ομάδες: τα παράγωγα του dibenzopyrone, alternariol,

alternariol monomethyl ether και altenuene. Ορισμένες τοξίνες προκαλούν τοξικές επιδράσεις σε ζώα (EFSA, 2011b).

### 1.3 Μυκοτοξίνες: Επιπτώσεις στην υγεία

Οι επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των μυκοτοξινών και των ανθρώπινων βιοσυστημάτων μπορεί να κυμαίνεται από οξείες και χρόνιες επιδράσεις και μπορεί να τις αντλήσει από διάφορες πηγές έκθεσης και συγκεκριμένα δερματικής επαφής, εισπνοής και την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων, το τελευταίο είναι το πιο σημαντικό και το πιο διευρυμένο. Οι επιπτώσεις των μυκοτοξινών εξαρτώνται από τη δόση και από την αλληλεπίδραση άλλων τοξικών ή μη-τοξικών παραγόντων. Για τις μυκοτοξίνες, καθώς και για άλλες τοξικές ουσίες, η συστηματική αξιολόγηση των επιπτώσεων στην υγεία του ανθρώπου πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας αξιολόγησης των κινδύνων που αποτελείται από τον εντοπισμό, την τοξικολογική και επιδημιολογική εκτίμηση και το χαρακτηρισμό του κινδύνου (Kuiper-Goodman, 2004). Κατά τη διάρκεια των προηγούμενων αιώνων η παρουσία των μυκοτοξινών, κυρίως των αφλατοξινών και των τριχοθεσινών σε τρόφιμα, έχει αναφερθεί ότι προκαλεί περιοδικά, ξέσπασμα οξείας δηλητηρίασης, ακόμη και θάνατο (Azziz-Baumgartner et al., 2005). Τα πρώιμα συμπτώματα της οξείας ηπατοτοξικότητας από μια αφλατοξίνη περιλαμβάνουν ανορεξία, κακουχία και χαμηλό πυρετό, ενδεχομένως να μετατραπεί σε έμετο, κοιλιακό άλγος, ίκτερος, ηπατική ανεπάρκεια και θάνατο (CAST, 2003). Ακόμη έχουν αναφερθεί αρκετές επιδημικές εκρήξεις που αποδίδονται σε μολυσμένα τρόφιμα από τριχοθεσίνες (Desjardins, 2003). Με την εξέταση της συνολικής χαμηλής συχνότητας των κρουσμάτων οξείας δηλητηρίασης και την παγκόσμια αναφορά στο υψηλό ποσοστό εμφάνισης μυκοτοξινών σε χαμηλή συγκέντρωση σε τρόφιμα, μπορεί να συναχθεί ότι είναι πιθανό ο πληθυσμός σε όλο τον κόσμο να εκτίθενται σε χαμηλές δόσεις μυκοτοξινών για μεγάλες χρονικές περιόδους και κατά συνέπεια, ότι οι περισσότερες από τις τοξικές επιδράσεις που ασκούνται από μυκοτοξίνες είναι χρόνιες. Η ευρεία ποικιλία χημικών ενώσεων που ομαδοποιούνται κάτω από τον κοινό όρο των μυκοτοξινών τα καθιστά υπεύθυνα για ένα ευρύ φάσμα χρόνιων τοξικών επιδράσεων και κυμαίνονται από το καλά τεκμηριωμένο καρκινογόνο στη λιγότερο διερευνημένη ανοσοκατασταλτική δράση. Ένα κρίσιμο και συχνά αμφιλεγόμενο σημείο είναι η καταλληλότητα του προσδιορισμού ενός ορίου δόσης με βάση το μηχανισμό δράσης της



τοξίνης. Πρέπει να καθοριστεί κατώτερο όριο δόσης για τις γονιδιοτοξικές μυκοτοξίνες. Η τοξικολογία των μυκοτοξινών μπορεί να αναθεωρηθεί μέσω της επίδρασής τους στα βιολογικά συστήματα / όργανα όπως η αξιολόγηση από τον Richard (Richard, 1998) και Fung et al. (Fung and Clark, 2004). Το μεγαλύτερο μέρος της τοξικολογικής αξιολόγησης βασίζεται σε μελέτες / παρατηρήσεις σχετικά με την πειραματική / εκτροφή ζώων.

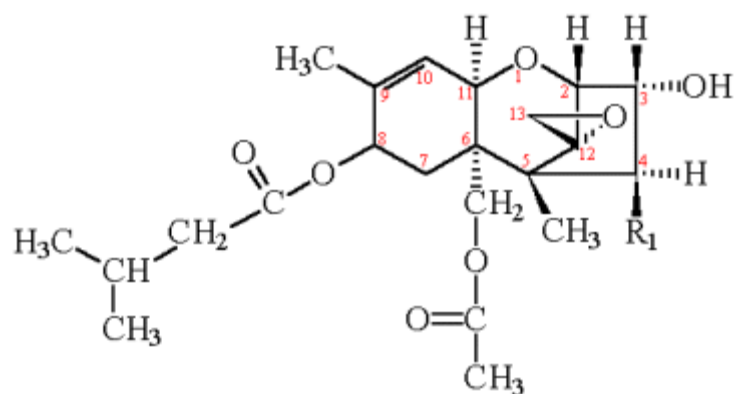
## 2 ΔΕΣΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ

### 2.1 Εισαγωγή

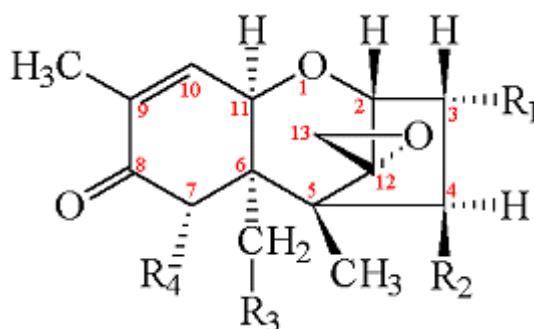
Οι τριχοθεσίνες είναι ενώσεις που παράγονται από διάφορα γένη μυκήτων (π.χ. *Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Vertimonosporium*) (Smith et al., 1994, Thrane et al., 2004, Trapp et al., 1998). Έχουν αναγνωριστεί πάνω από 180 και είναι δομικά διαφορετικές (Brown et al., 2001). Είναι διαχωρισμένες σε 4 τάξεις που διακρίνονται ανάλογα με την παρουσία μιας πλευρικής αλυσίδας στον C<sub>7</sub>, οι δύο από τις τάξεις αυτές διακρίνονται στον τύπο A που περιλαμβάνει τις τοξίνες T-2, HT-2, τη διακετοξυσκιρπενόλη ή ανγκουϊδίνη (DAS) και neosolaniol (NEO) και στον τύπο B που περιλαμβάνει τις τοξίνες δεσοξυνιβαλενόλη ( στο εξής ως DON) (επίσης γνωστή ως vomitoxin), τα παράγωγα της DON 3-ακέτυλο (3-ADON) και 15-ακέτυλο (15-ADON), τη νιβαλενόλη (MEMA) και την 4-ακέτυλο MEMA (επίσης γνωστή ως fusarenon-X). Οι παραγωγοί των τριχοθεσινών του τύπου A είναι οι μύκητες *F. sporotrichioides*, *F. poae* και *F. equiseti* ενώ οι παραγωγοί των τριχοθεσινών του τύπου B είναι οι μύκητες *F. graminearum*, *F. culmorum* και *F. cerealis* που συχνά συνδέονται με μολυσμένα φυτικά προϊόντα. Οι τριχοθεσίνες της ομάδας A είναι διαλυτές σε οξικό αιθυλεστέρα, ακετόνη, χλωροφόρμιο, διχλωρομεθάνιο και διαιθυλαιθέρα ενώ οι τριχοθεσίνες της ομάδας B είναι εξαιρετικά υδροξυλιωμένες, σχετικά πολικές και είναι διαλυτές σε μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και αιθανόλη (Brega. et al., 2008). Επιπλέον, οι τριχοθεσίνες είναι ισχυροί αναστολείς της ευκαρυωτικής πρωτεϊνικής σύνθεσης και έχουν συσχετιστεί με πολλές ασθένειες (Joffe, 1986). Η Δεσοξυνιβαλενόλη παράγεται κυρίως από τον *F. graminearum* και από τον *F. culmorum*, είναι μη-φθορίζον (Richard, 2000), περιέχει μια κύρια και δύο δευτερεύουσες υδροξυλομάδες και είναι διαλυτή σε νερό και πολικούς διαλύτες όπως μεθανόλη και ακετονιτρίλιο (Brega. et al., 2008). Είναι μια τοξίνη που έχει εντοπιστεί συχνότερα σε κόκκους και όταν προσλαμβάνεται σε υψηλές δόσεις από ζώα προκαλεί ναυτία, εμετό, και διάρροια ενώ όταν προσλαμβάνεται από χοίρους και άλλα ζώα σε μικρές δόσεις μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους και άρνηση τροφής (Miller et al., 2001)

## 2.2 Χημική Δομή

Οι τριχοθεσίνες είναι μια ομάδα από δομικά στοιχεία και σχετίζονται με τις μυκοτοξίνες με ποικίλους βαθμούς κυτταροτοξικής δραστηριότητας. Έχουν μια σεσκιτερπενοειδή δαχτυλική δομή και μπορούν να ταξινομηθούν σύμφωνα με την παρουσία ή απουσία της χαρακτηριστικής λειτουργικής ομάδας (World Health Organization, 1990). Όλες οι τριχοθεσίνες περιέχουν εποξειδικές ομάδες στις θέσεις C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub> οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις τοξολογικές τους δραστηριότητες. Διακρίνονται από την παρουσία ή απουσία μιας καρβονυλομάδας στη θέση C<sub>8</sub> (Daniel, 2003). Οι τριχοθεσίνες τύπου Β περιλαμβάνουν και τη δεσοξυνιβαλενόλη (DON ή Vomitoxin), που χημικά περιγράφεται ως 12,13-epoxy-3α,7α,15-trihydroxytrichothec-9-en-8-one, με χημικό τύπο C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> και μοριακή μάζα 296,32 g · mol<sup>-1</sup> (Vesonder, Ciegler and Jensen, 1973) και η οποία διαθέτει τα ακετυλιωμένα παράγωγα 3-ακετυλοδεσοξυνιβαλενόλη (3ADON) και 15-ακετυλοδεσοξυνιβαλενόλη (15ADON) (Desjardins, 2006). Η DON περιέχει μια κύρια και δύο δευτερεύουσες υδροξυλομάδες και είναι διαλυτή σε πολικούς διαλύτες όπως μεθανόλη και ακετονιτρίλιο. Σε αντίθεση με πολλές άλλες τριχοθεσίνες η DON περιέχει στο μόριο της ένα συζευγμένο σύστημα καρβονυλίου και αυτό οδηγεί σε κάποια απορρόφηση υπεριώδους ακτινοβολίας που βοηθά την ανίχνευσή της με μεθόδους TLC ή HPLC (Brera. et al., 2008). Επίσης, η DON επηρεάζει το μεταβολισμό των φυτών στο σιτάρι, διότι οδηγεί στην αναστολή της βλάστησης και μειώνει την ανάπτυξη των φυτών. Αυτή η μυκοτοξίνη μπορεί επίσης να μετατραπεί σε ένα είδος «μασκοφόρου μυκοτοξίνης» με το όνομα δεοξυνιβαλενόλη-3-γλυκοσίδιο (D3G), ως αποτέλεσμα της αποτοξίνωσης του φυτού. Στο φυτό αρχίζει να αναπτύσσεται ο μηχανισμός αποτοξίνωσης που η DON είναι γλυκοζυλιωμένη σε 3-β-D-glucopyranosil-4-deoxynivalenol (D3G) και αποθηκεύεται στο εσωτερικό του κενοτοπίου ή στο κυτταρικό τοίχωμα, για την καταπολέμηση αυτής της κατάστασης (Poppenberger et al., 2003, Berthiller et al., 2009). Το προϊόν αυτό είναι γνωστό ως μυκοτοξίνη «μάσκα», επειδή ένα ή περισσότερα μόρια γλυκόζης προσδένονται στην DON η οποία μειώνει την τοξικότητα στο φυτό και την καθιστά ανίκανη να ανιχνεύεται με τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης. Η D3G είναι λιγότερο δραστική ως αναστολέας της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών από την DON (Poppenberger et al., 2003). Παρακάτω παρουσιάζονται οι βασικές δομές των τριχοθεσινών.



Σχήμα 8. Χημική δομή τριχοθεσινών Τύπου Α

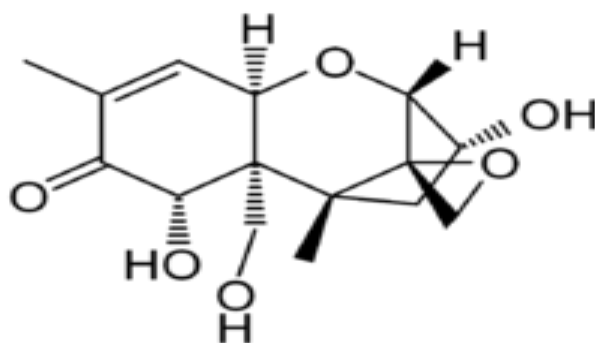


Σχήμα 9. Χημική δομή τριχοθεσινών Τύπου Β

### 2.3 Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Οι τριχοθεσίνες είναι σταθερές στους 120 °C, μέτρια σταθερές στους 180 °C, και αποσυντίθενται μέσα σε 30-40 λεπτά στους 210 °C. Η DON έχει μια 12,13-εποξυ ομάδα, τρεις λειτουργίες OH, και μια *άλφα,βήτα* -ακόρεστη κετο-ομάδα. Η σχετική μοριακή της μάζα είναι 296,32 g · mol<sup>-1</sup>. Κρυσταλλώνεται ως άχρωμες βελόνες, είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες (σταθερή στους 120°C, μετρίως σταθερή στους 180 °C) (EFSA., 2004c), ενώ το σημείο τήξης της κυμαίνεται από 151-153 °C. Η *άλφα, βήτα* ακόρεστη κετο-λειτουργία της έχει ως αποτέλεσμα την απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) μικρού μήκους κύματος, αλλά το φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας της DON δεν είναι χαρακτηριστικό. Καθώς είναι ένα είδος Β τριχοθεσίνης, η DON είναι διαλυτή στο νερό, ακόμα και σε πολικούς διαλύτες όπως στην υδατική μεθανόλη, στο υδατικό

ακετονιτρίλιο και στον οξικό αιθυλεστέρα. Η DON είναι σταθερή σε οργανικούς διαλύτες (Shepherd and Gilbert, 1988), αλλά ο οξικός αιθυλεστέρας και το ακετονιτρίλιο είναι οι πλέον κατάλληλοι διαλύτες, ιδιαίτερα για μακροχρόνια αποθήκευση (Pettersson, 2000). Η χημική της δομή απεικονίζεται στο ακόλουθο σχήμα.



**Σχήμα 10.** Συντακτικός τύπος Δεσοξυνιβαλενόλης

## 2.4 Τοξικότητα

Οι τριχοθεσίνες χαρακτηρίζονται από μια αρκετά παρόμοια χημική δομή, που παρουσιάζει ένα διπλό δεσμό μεταξύ C<sub>9</sub> και C<sub>10</sub> και μια λειτουργική ομάδα με αλκοολούχες και εστερομάδες μεταξύ C<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>, θέσεις οι οποίες είναι υπεύθυνες για την τοξικότητά τους (Ito et al., 2001). Τοξικοδυναμικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι τριχοθεσίνες λειτουργούν ως αναστολείς της ευκαρυωτικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν την 60S υπομονάδα του ριβοσώματος και να αλληλεπιδρά με το ένζυμο πεπτιδυλοτρανσφεράση. Αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε διάφορους βαθμούς στην αναστολή του πεπτιδικού δεσμού που σχηματίζεται ανάλογα με τη χημική δομή της τριχοθεσίνης (Cundliffe and Davies, 1977).

Η DON από μόνη της αλλά και οι μεταβολίτες της, ανταγωνίζονται με τα οιστρογόνα του σώματος για τις θέσεις δέσμευσης των υποδοχών οιστρογόνου και μολύβδου, μέσω της επίδρασης του RNA και της πρωτεϊνικής σύνθεσης, σε μια απορρύθμιση των οιστρογονικών επιδράσεων. Κλινικά αυτό οδηγεί σε hyperestrogenism και σε αναπαραγωγικές διαταραχές (Doll et al., 2003, Bauer et al., 1987, EFSA, 2004d).

Η μελέτη και η εκτίμηση των πειραματικών δεδομένων οδήγησε την Ευρωπαϊκή Ένωση στον καθορισμό των μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων της Δεσοξυνιβαλενόλης σε ορισμένα τρόφιμα όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 1.** Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα Δεσοξυνιβαλενόλης για ορισμένες τροφές.

Τρόφιμα	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)
Μη μεταποιημένα δημητριακά εκτός του σκληρού σίτου, της βρώμης και του αραβοσίτου.	1250
Μη μεταποιημένος σκληρός σίτος και βρώμη.	1750
Μη μεταποιημένος αραβόσιτος.	1750
Δημητριακά που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, άλευρα δημητριακών (συμπεριλαμβανομένων του αλευριού αραβοσίτου, του σιμιγδαλιού αραβοσίτου και του χονδραλεσμένου αραβοσίτου, πίτουρα ως τελικό προϊόν που διατίθεται στην αγορά για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και φύτρα.	750
Ζυμαρικά (ξηρά).	750
Ψωμί (συμπεριλαμβανομένων των μικρών αρτοσκευασμάτων), γλυκίσματα αρτοποιίας, μπισκότα, σνακ δημητριακών και δημητριακά για πρωινό.	500
Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά.	200

## 2.5 Φυσικές πηγές μόλυνσης

Η μόλυνση με μυκοτοξίνες συχνά είναι μια προσθετική διαδικασία, αρχής γενομένης από το πεδίο και την αύξηση στη διάρκεια την συγκομιδής, κατά την ξήρανση και την αποθήκευση (Wilson and Adramson, 1992). Ο Christensen (1974) χώρισε τους διαιρούμενους μύκητες που δημιουργούν αποικίες σιτηρών σε δύο ομάδες, τους μύκητες στον αγρό και τους μύκητες στην αποθήκευση. Οι μύκητες της αποθήκευσης είναι εκείνοι που θα μπορούσαν να αναπτυχθούν σε περιεκτικότητες υγρασίας σε ισορροπία με σχετική υγρασία 70% έως 90%, όπου δεν υπάρχει ελεύθερο ύδωρ. Σε αυτή την κατάταξη ταξινομήθηκαν ως μύκητες αγρού οι *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* και *Helminthosporium*, ενώ ως μύκητες αποθήκευσης οι *Aspergillus* και *Penicillium*. Η κατάταξη αυτή βασίζεται σε μελέτες που έγιναν σε εύκρατα κλίματα. Ωστόσο, κάτω από ζεστά, υγρά τροπικά και υποτροπικά κλίματα ή ακόμα και σε εύκρατα κλίματα, στα οποία η καλλιεργητική περίοδος είναι ασυνήθιστα ζεστή και ξηρή, τα είδη *Aspergillus* και *Penicillium* μπορούν να μολύνουν τους σπόρους στον αγρό (Wilson and Adramson, 1992).

Πολλά είδη του γένους *Fusarium*, επίσης μολύνουν τους κόκκους στον αγρό όπως και κατά την αποθήκευση. Οι περιβαλλοντολογικές συνθήκες είναι εξαιρετικά σημαντικές στην προ της συγκομιδής μόλυνση από μυκοτοξίνες των σιτηρών και των ελαιούχων σπόρων. Η ανάπτυξη των φυτών και η υγεία τους καθώς και η ανταγωνιστικότητα των μυκοτοξιγενών μυκήτων, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία και την υγρασία. Ζημιές από έντομα και πουλιά συμβάλλουν επίσης στη μόλυνση από μυκοτοξίνες στον αγρό, ενώ διάφοροι παράγοντες είναι αυτοί που επηρεάζουν τη μόλυνση από μυκοτοξίνες κατά την αποθήκευση των δημητριακών, περιλαμβανομένων της ενεργότητας νερού ( $a_w$ ), το υπόστρωμα του εξαερισμού και της θερμοκρασίας, τις συγκεντρώσεις ενοφθαλμίσματος, μικροβιακών αλληλεπιδράσεων, μηχανικές βλάβες και προσβολή εντόμων (Ominski et al., 1994). Η θερμοκρασία, η κατανομή και η διαθεσιμότητα του νερού είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες που καθορίζουν την αποίκιση των αποθηκευμένων σπόρων από μύκητες (Wilson and Adramson, 1992). Η υγρασία στους κόκκους μπορεί να εκφράζεται ως επί τοις εκατό υγρασία ή ως ενεργότητα νερού ( $a_w$ ). Η ενεργότητα του νερού ορίζεται ως ο λόγος της τάσης των ατμών του προϊόντος, προς εκείνη του καθαρού νερού. Σύμφωνα με τις απαιτήσεις τους σε υγρασία, οι μύκητες χωρίζονται σε τρεις κύριες ομάδες: των υδροφύτων, οι οποίοι αναπτύσσονται σε σχετική υγρασία 90-100% (βακτήρια και πολλές ζύμες), μεσόφυτων, οι οποίοι αναπτύσσονται σε σχετική υγρασία 80-90% (*A. flavus*, *A. candidus*) και των ξηρόφυτων, οι οποίοι έχουν

κατώτερο όριο σχετικής υγρασίας 70% (τα μέλη της ομάδας *Eurothium* και *A. restrictus*) (Shapira, Jerusalem. and Paster, 2004). Τα υποστρώματα με χαμηλή ενεργότητα νερού έχουν μικρό διαθέσιμο νερό για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μυκήτων. Η ενεργότητα του νερού συσχετίζεται περίπου με την ισορροπία σε σχέση με την υγρασία στα αποθηκευμένα προϊόντα. Λίγοι μύκητες αναπτύσσονται σε  $a_w$  τιμές κάτω από 0,70, καθώς η περιεκτικότητα σε νερό αυξάνεται στο υπόστρωμα παραπάνω από 0.70 οι περισσότεροι ξηροφυτικοί μύκητες είναι σε θέση να αναπτυχθούν. Η παραγωγή νερού με μεταβολικές διεργασίες αυτών των ξηροφυτικών μυκήτων οδηγεί σε ένα πιο υγρό υπόστρωμα και σε ένα που μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη ενός ευρύτερου φάσματος ειδών μυκήτων. Ως εκ τούτου, σε πολλές περιπτώσεις οι σπόροι μπορεί να έχουν μολυνθεί με περισσότερους από έναν μύκητα (Wilson and Payne, 1994).

Μία από τις πιο κυρίαρχες και οικονομικά σημαντικές μυκοτοξίνες που επηρεάζουν τα δημητριακά μικρών κόκκων, είναι η DON. Σχηματίζεται λόγω της παρουσίας των φυτικών παθογόνων μυκήτων *F. graminearum* και *F. culmorum*, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την ασθένεια που είναι γνωστή ως Fusarium Head Blight (FHB) (Wegulo, 2012). Η γεωγραφική κατανομή αυτών των μυκήτων επηρεάζεται από το κλίμα. Ο *F. culmorum* εμφανίζεται πιο συχνά στην Ευρώπη, ενώ ο *F. graminearum* είναι κοινή στην Ευρώπη και στην Βόρειο Αμερική (Wegulo, 2012, Simsek et al., 2012). Η συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου έντασης του FHB με συσσώρευση DON την άνοιξη στο σιτάρι χρησιμοποιώντας μια μετά-ανάλυση έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες (Paul, Lipps and Madden, 2005). Οι πιο σημαντικοί περιβαλλοντολογικοί παράγοντες που προκαλούν αύξηση του FHB και της βιοσύνθεσης της DON είναι η διαθεσιμότητα του νερού και η θερμοκρασία (Schmidt-Heydt et al., 2011). Οι ελάχιστες τιμές ενεργότητας νερού για την ανάπτυξη και την παραγωγή της DON φαίνεται να περιορίζεται σε  $a_w$  0,93 και θερμοκρασία 25 °C (Schmidt-Heydt et al., 2011, Hope, Aldred and Magan, 2005). Επίσης, υψηλότερη σοβαρότητα της νόσου θα συμβεί εάν το σιτάρι έχει εκτεθεί σε παρατεταμένες περιόδους υγρασίας, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής της DON (Wegulo, 2012). Από την άλλη, η αύξηση του *Fusarium* και της παραγωγής της DON εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, για παράδειγμα, στο σιτάρι υψηλότερη ζημιά επέρχεται κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας (άνθηση) και λίγο μετά την ανθοφορία, όπως ακόμα η λοίμωξη μπορεί επίσης να συνεχιστεί κατά το πρώτο στάδιο της ωρίμανσης των σιτηρών (Wegulo, 2012, Muhovski, Batoko and Jacquemin, 2012). Επιπλέον οι καιρικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης του σιταριού είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει το



φορτίο του *Fusarium* και της DON, γεγονός που αντικατοπτρίζει τη σημασία της επιβίωσης του πρωτογενές εμβολίου που υπάρχει στο έδαφος και στα συντρίμια των καλλιεργειών κατά τη διάρκεια του χειμώνα (Landschoot et al., 2012). Ακόμη, η αμειψισπορά, η αζωτούχος λίπανση και η διαχείριση των ζιζανίων διαμορφώνουν τη δομή του βιοκόσμου του εδάφους και την επιρροή της επιβίωσης του *Fusarium* (Landschoot et al., 2012, Bernhofs et al., 2012, Lemmens et al., 2004).

Η DON απαντάται (παγκοσμίως) σε σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη και σε καλαμπόκι και λιγότερο συχνά σε ρύζι, σόργο και σίτο (CAST, 2003). Η μόλυνση των κόκκων δημητριακών με DON αποτελεί ένα ιδιαίτερο πρόβλημα για την άλεση αλεύρων και για τη βιομηχανία αρτοποιίας και ως κάποιο βαθμό για τη βιομηχανία ζυθοποιίας. Οι Versoender et al. (1982) απέδειξαν ότι τα στελέχη των μυκήτων *F. graminearum* και *F. culmorum* παράγαν βέλτιστες τιμές DON σε 29-30% και 25-26 °C, αντίστοιχα σε ραγισμένο υγρό αραβόσιτο (30% περιεκτικότητα σε νερό = 0,99  $a_w$ ). Για την παραγωγή της τοξίνης έχει σημαντική επιρροή το περιβαλλοντολογικό στρες και συχνά είναι άσχετο με την συνολική βιομάζα των μυκήτων (Sanchis, University of Lleida and Magan, 2004, Bhat, Rai and Karim, 2010, Bhat and Vasanthi, 2003, Thompson and Henke, 2000, Wagacha and Muthomi, 2008, Degraeve et al., 2016).

Η επίδραση των αβιοτικών παραγόντων στην παραγωγή μυκοτοξινών, έχει πρόσφατα αναθεωρηθεί (Wegulo, 2012, Merhej, Richard-Forget and Barreau, 2011). Παρακάτω αναφέρονται οι περιβαλλοντολογικές επιπτώσεις στη βιοσύνθεση της DON.

#### ❖ pH

Ένα χαμηλό εξωκυτταρικό pH έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή τριχοθεσινών (Gardiner et al., 2009). Δεδομένου ότι οι πληροφορίες σχετικά με το εξωκυττάριο του pH κατά τη διάρκεια της μόλυνσης του σιταριού από τον *F. graminearum* και κατά την αποθήκευση σιτηρών παραμένει σπάνια, είναι πολύ δύσκολο να τοποθετηθούν τα αποτελέσματα για τις επιδράσεις του σε ένα φυσιολογικό πλαίσιο. Πιθανώς το pH επηρεάζει την παραγωγή της DON κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μόλυνσης (Audenaert, Vanheule and Haesaert, 2013).

#### ❖ $a_w$ και θερμοκρασία

Η διαθεσιμότητα του ελεύθερου νερού ( $a_w$ ) και η θερμοκρασία επώασης θα καθορίσει αν θα υπάρξει μια απόφυση του *F. graminearum*, ιδίως κατά την αποθήκευση των κόκκων σιταριού μετά τη συγκομιδή. Επιπλέον, τα τοξινογενή αποτελέσματα της ανάπτυξης των μυκήτων εξαρτάται επίσης από την τιμή  $a_w$  και τη θερμοκρασία. Πράγματι, οι υψηλές τιμές  $a_w$  αυξάνουν την παραγωγή της DON σε μολυσμένες παρτίδες σιταριού (Ramirez, Chulze and Magan, 2006), καθώς και η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης από 15 °C έως 30 °C (Magan et al., 2010).

#### ❖ Ανθρωπογενείς παράγοντες που επηρεάζουν το περιεχόμενο της DON μετά τη συγκομιδή.

Μετά τη συγκομιδή, οι σπόροι συχνά αποθηκεύονται για κάποιο χρονικό διάστημα σε σιλό πριν την τελική χρήση ως ανθρώπινη ή ζωική τροφή. Αν και η παραγωγή της DON κατά την αποθήκευση είναι, παρά τις εξαιρέσεις, σπάνια, έχουν αναφερθεί οι επιδράσεις της μεταβολής των συνθηκών αποθήκευσης για την απόφυση των μυκήτων και την παραγωγή της. Ως αντιμυκητιακά μέτρα που έχουν προταθεί είναι η τροποποιημένη ατμόσφαιρα αποθήκευσης και τα χημικά συστήματα διατήρησης και βιοελέγχου με βακτήρια γαλακτικού οξέως (Magan et al., 2010). Λεπτομερή στοιχεία σχετικά με την επίδραση των μέτρων αυτών στην παραγωγή της DON εξακολουθούν να λείπουν. Χημικές ενώσεις, όπως τα αντιοξειδωτικά και τα αιθέρια έλαια που εφαρμόζονται κατά την αποθήκευση των κόκκων σιταριού έχουν σαφώς μια πολύ μεταβλητή επίδραση στα επίπεδα της (Audenaert et al., 2012).

## 2.6 Μύκητας

Οι μύκητες μπορούν να επιτεθούν σε σπόρους στον αγρό πριν τη συγκομιδή, είτε στο στάδιο μετά τη συγκομιδή κατά την αποθήκευση. Σε γενικές γραμμές, οι μύκητες που εισβάλουν στους πυρήνες στον αγρό αναφέρονται ως μύκητες αγρού, καθώς και εκείνοι που πολλαπλασιάζονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης αναφέρονται ως μύκητες αποθήκευσης. Η διαίρεση βασίζεται στην οικολογία των μυκήτων, δηλαδή στις συνθήκες ανάπτυξης, της οποίας η απαίτηση σε νερό φαίνεται να είναι ο πιο σημαντικός

παράγοντας. Όλοι οι μύκητες του αγρού απαιτούν μια περιεκτικότητα σε υγρασία η οποία είναι σε ισορροπία με τη σχετική υγρασία, πάνω δηλαδή από 90% (Sinha and Muir, 1973)

Αν και υπάρχουν δεκάδες είδη *Fusarium*, ένας μάλλον περιορισμένος αριθμός είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες μολύνσεις των τροφίμων και των ζωοτροφών από μυκοτοξίνες (Marasas, Nelson and Toussoun, 1984b). Από τα είδη *Fusarium* τα πιο ανησυχητικά είναι εκείνα που παράγουν μυκοτοξίνες σε σιτάρι, καλαμπόκι, ρύζι, κριθάρι, βρώμη και άλλα δημητριακά, ότι είναι βασικές τροφές των ανθρώπων και τα συστατικά των ζωοτροφών (Campbell et al., 2000). Ο *F. graminearum* αναπτύσσεται καλύτερα σε θερμοκρασία 25 °C και σε μία δράση του νερού πάνω από 0.88. Ο *F. culmorum* αναπτύσσεται καλύτερα στους 21 °C και σε μία δράση του νερού πάνω από 0,87. Ο *F. graminearum* εμφανίζεται ως μια ροζ προς κόκκινη μούχλα των καρπών και παρουσιάζει σοβαρές λοιμώξεις στο καλαμπόκι στις φλούδες και στον κορμό. Σχετικά με τα κατάλληλα μέσα καλλιέργειας, ο *F. graminearum* παράγει γρήγορα έντονη ανάπτυξη του μυκηλίου, η οποία συνήθως γίνεται με κίτρινες ή ροζ αποχρώσεις. Το είδος αυτό μπορεί να διακριθεί από τα μεγάλα, ευθεία, πολυκυψελιδικά σπόρια που παράγονται στο μυκήλιο. Πολλά στελέχη του *F. graminearum* αυτογονιμοποιούνται και παράγουν μαύρα-μπλε καρποφόρα όργανα (περιθήκια) του *Gibberella* στην επιφάνεια του μέσου καλλιέργειας και μολύνουν τους ιστούς του φυτού (Marasas, Nelson and Toussoun, 1984b, Nelson, Toussoun and Marasas, 1983). Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες από μικροσκόπιο του *F. graminearum* (Εικόνα 1) και του *F. culmorum* (Εικόνα 2).



**Εικόνα 1.** *F. graminearum* κονίδια, εικόνα από μικροσκόπιο.



**Εικόνα 2.** *F. culmorum* εικόνα από μικροσκόπιο.

## 2.7 Υγεία

Οι τριχοθεσίνες προκαλούν ιστολογικές βλάβες σε πειραματόζωα, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής νέκρωσης σε ενεργούς διαιρούμενους ιστούς του εντερικού βλεννογόνου, στο μυελό των οστών, στη σπλήνα, στους όρχεις και στις ωθήκες (Ciegler, 1978, Niyo et al., 1988a, Niyo et al., 1988b). Ως εκ τούτου μακροφάγα, λεμφοκύτταρα και ερυθροκύτταρα μπορεί να μειωθούν με την παρατεταμένη έκθεση σε τριχοθεσίνες (Segal et al., 1983). Αρκετές μυκοτοξίνες ερεθίζουν το δέρμα. Οι δερματικές δοκιμασίες έχουν χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί ποιοτικά η βιολογική δραστηριότητα αυτής της κατηγορίας μυκοτοξινών (Bamburg et al., 1968, Gilgan, Smalley and Strong, 1966). Ο Ueno (1984a) καθόρισε την ελάχιστη αποτελεσματική δόση για τη δερματική τοξικότητα 18 τριχοθεσινών και σύγκρινε σχέσεις δομής-δραστηριότητας (Ueno, 1974). Οι τριχοθεσίνες παρουσίασαν πολύ χαμηλή τοξικότητα δια του δέρματος (Ueno, 1984a).

Η DON συνδέεται έμμεσα με νεφροπάθεια, η οποία έχει μελετηθεί σε ποντίκια (Dong and Pestka, 1993), (Dong, Sell and Pestka, 1991, Greene et al., 1994a, Greene, Azcona-Olivera and Pestka, 1994b, Greene et al., 1995, Pestka and Casale, 1989). Προκαλεί έμετο σε υψηλές οξείες δόσεις, ενώ, σε χαμηλότερες δόσεις, προκαλεί την άρνηση τροφής. Αυτή η τοξίνη θεωρείται μια από τις λιγότερο τοξικές τριχοθεσίνες όσο αφορά τη θνησιμότητα. Ωστόσο, έχει ανορεκτικές και εμετικές ικανότητες (Forsyth et al., 1977, Pestka, Lin and Miller, 1987a, Prelusky and Trenholm, 1993, Vesonder and Hesseltine, 1981). Οι χοίροι εμφανίζουν οξεία τοξικότητα και φαίνεται να είναι τα είδη που είναι πιο ευαίσθητα στην επίδραση της DON, με συμπτώματα όπως εμετό, διάρροια, μυϊκή αδυναμία, τρέμουλο και κώμα που παρατηρείται μετά από 24 ώρες μετά από διαιτητικές δόσεις τόσο χαμηλές όσο 2 mg/kg. Σε αρουραίους που τρέφονται με 10 mg/kg σωματικού βάρους DON, δεν υπάρχουν ενδείξεις τοξικότητας όπως άρνηση τροφής, εμετό ή ασυνήθιστη συμπεριφορά. Τα κοτόπουλα φαίνεται να είναι λιγότερο ευαίσθητα από τους χοίρους. Στις όρνιθες ωοπαραγωγής με συγκεντρώσεις έως 5 mg/kg DON στη διατροφή τους εμφανίζετε μείωση του βάρους των αυγών και του πάχους του κελύφους. Πολλαπλές τερατογόνες επιδράσεις παρατηρήθηκαν σε δόσεις των 2,5 και 5 mg/kg σωματικού βάρους, ενώ σκελετικές δυσμορφίες εμφανίστηκαν στο 1, 1,5 και 5 mg/kg σωματικού βάρους. Οι απορροφήσεις στα 10 και 15 mg/kg σωματικού βάρους ήταν 100% και 80% (CAST, 2003). Οι τοξικές επιδράσεις της DON προκαλούν διάρροια, εμετό, γαστρεντερική φλεγμονή και νέκρωση του εντερικού σωλήνα, του μυελού των οστών και των λεμφικών ιστών. Προκαλεί την αναστολή της πρωτεΐνης, τη σύνθεση του DNA και του RNA και την αναστολή της

μιτοχονδριακής λειτουργίας. Επίσης, έχει επιπτώσεις στην κυτταρική διαίρεση και την ακεραιότητα της μεμβράνης και επάγει την απόπτωση (Pestka, 2010). Ανάλογα με την δόση που προσλαμβάνεται η DON μπορεί να τονώσει ή να καταστείλει τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο στο αγρόκτημα όσο και στα πειραματόζωα (Pestka, 2010, Lutz et al., 2003, Cowger and Arellano, 2013).

### 3 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

#### 3.1 Ιστορία

Η χρωματογραφία ως φυσικοχημική τεχνική για το διαχωρισμό σύνθετων μιγμάτων ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20ου αιώνα από τον Ιταλορώσο βοτανολόγο Tswet M.S. Την ονόμασε χρωματογραφία ως μεταγλώττιση της Ελληνικής λέξης “χρωματικό γράψιμο”, αν και σε όλες του τις εκδόσεις ανέφερε ότι η προέλευση του ονόματος για τη νέα τεχνική βασίστηκε σε μια πολύχρωμη εικόνα του πρώτου διαχωρισμού φυτικών χρωστικών ουσιών και ενσωμάτωσε το όνομά του στο όνομα της τεχνικής που εφευρέθηκε.

Η χρωματογραφική τεχνική δεν εκτιμήθηκε από τους επιστήμονες τη στιγμή της ανακάλυψης, καθώς μετά από σχεδόν 10 χρόνια ο Palmer L.S. στις ΗΠΑ και ο Dhere C. στην Ευρώπη δημοσίευσαν ανεξάρτητα την περιγραφή μιας παρόμοιας διαδικασίας διαχωρισμού. 25 χρόνια αργότερα το 1931 ο Lederer διάβασε το βιβλίο του Palmer L.S. και αργότερα βρήκε μια πρωτότυπη έκδοση του Tswet M.S. και δημοσίευσε ένα έγγραφο για τον καθαρισμό ξανθοφυλλών σε στήλη προσρόφησης  $\text{CaCO}_3$ , ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε από τον Tswet M.S.. Το 1941 ο Martin A.J.P. και ο Synge R.L.M. στο Πανεπιστήμιο του Cambridge στο Ηνωμένο Βασίλειο ανακάλυψαν τμήμα της χρωματογραφίας, για την οποία τους απονεμήθηκε βραβείο Noble το 1952. Τον ίδιο χρόνο, ο Martin και ο Synge δημοσίευσαν ένα κείμενο, το οποίο έθεσε ένα γερό θεμέλιο για την ταχεία ανάπτυξη χρωματογραφικών τεχνικών που ακολούθησαν μετά.

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε από τον Tswet με τη μορφή χρωματογραφίας υγρού-στερεού (LSC), αλλά η ανάπτυξή της συνεχίστηκε για πάνω από 50 χρόνια κυρίως με τη μορφή της αέρια χρωματογραφίας και μερικώς ως χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και υγρού-υγρού. Η αναγέννηση της υγρής χρωματογραφίας στη σύγχρονη μορφή της και την πάρα πολύ γρήγορη ανάπτυξή της έχει οδηγήσει αυτή να είναι η κυρίαρχη αναλυτική τεχνική του 21ου αιώνα, η οποία μπορεί να αποδοθεί στο μεγαλύτερο μέρος της στην πρωτοποριακή εργασία του καθηγητή Horvath C. στο Πανεπιστήμιο του Yale.

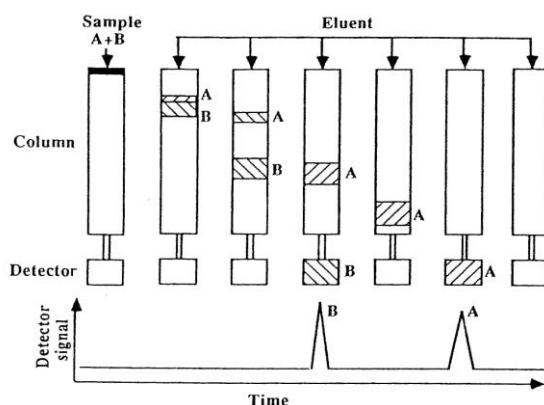
Στα μέσα της δεκαετίας του 1960 ο καθηγητής Horvath C., ο οποίος προηγουμένως εργάστηκε για την ανάπτυξη στηλών ανοιχτού σωλήνα πορώδους στοιβάδας για την αέρια χρωματογραφία, αποφάσισε να χρησιμοποιήσει για την υγρή χρωματογραφία μικρά γυάλινα σφαιρίδια με πορώδη στρώση στην επιφάνειά τους για να διευκολύνουν τη

μεταφορά μάζας ανάμεσα στη υγρή φάση και στην επιφάνεια. Οι στήλες πληρώνονται με σφαιρίδια αναπτύσσοντας μια σημαντική αντίσταση στην ροή του υγρού και ο καθηγητής Horvath αναγκάστηκε να φτιάξει ένα όργανο που να επιτρέπει την ανάπτυξη μιας συνεχούς ροής του υγρού διαμέσου της στήλης. Αυτή ήταν η προέλευση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και το πραγματικό όνομα γι' αυτή την τεχνική διαχωρισμού εισήχθη από τον καθηγητή Horvath το 1970 στο 21<sup>ο</sup> Συνέδριο Pittsburgh στο Cleveland, όπου έδωσε αυτό το τίτλο στην ομιλία του. Ο πρώτος διαχωρισμός με μια χημικά τροποποιημένη επιφάνεια με υγρό έκλουσης, ο οποίος ονομάστηκε αργότερα “αντίστροφης φάσης”, εφευρέθηκε επίσης από τον καθηγητή Horvath (Kazakevich and Lobrutto, 2007).

### 3.2 Χρωματογραφική Διαδικασία

Η χρωματογραφία βασίζεται στην κατανομή ενός μίγματος ουσιών μεταξύ δύο φάσεων, της στατικής, η οποία διατηρείται ακίνητη με τη μορφή μιας πληρωμένης στήλης με πολύ μικρά πορώδη σωματίδια, και της κινητής, η οποία βρίσκεται σε συνεχή ροή περνώντας από τη στήλη μέσω αντλίας. Το μίγμα προστίθεται σε μικρό όγκο στην κινητή φάση στην κεφαλή της στήλης και εισάγεται στη στατική.

Οι δυο φάσεις επιλέγονται κατάλληλα έτσι ώστε ουσίες να ανιχνεύονται. Έτσι οι ουσίες που κατακρατούνται ισχυρά από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά την ροή της κινητής φάσης, ενώ αυτές που κατακρατούνται ασθενέστερα κινούνται πιο γρήγορα και αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 11)



**Σχήμα 11.** Απεικόνιση της διαδικασίας διαχωρισμού στη χρωματογραφία.

Το ηλεκτρικό σήμα που συνδέεται με το διαχωρισμό και φτάνει στον ανιχνευτή καταγράφοντάς το ως συνάρτηση με το χρόνο ονομάζεται χρωματογράφημα και οι κορυφές που περιέχει οφείλονται στις διαχωρισμένες ουσίες που εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους (Weston and Brown, 1997, Skoog, Holler and Nieman, 2002, Moldoveanu and David, 2012).

### 3.3 Είδη Υγρής Χρωματογραφίας

Στην υγρή χρωματογραφία υπάρχουν τέσσερα βασικά είδη τα οποία είναι :

- Χρωματογραφία κατανομής

Ο διαχωρισμός βασίζεται στην κατανομή των συστατικών του δείγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται κυρίως σε μη ιοντικές ενώσεις. Η χρωματογραφία κατανομής αποτελείται από τη χρωματογραφία υγρού-υγρού, όπου η στατική φάση κατακρατείται με φυσική προσρόφηση και από τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης όπου δεσμεύεται χημικά με το υλικό πλήρωσης.

- Χρωματογραφία προσρόφησης

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την προσρόφηση στη στατική φάση βάσει της οποίας τα συστατικά του δείγματος χωρίζονται ανάλογα με την πολικότητα. Είναι χρωματογραφία υγρού-στερεού και ως στατική φάση χρησιμοποιείται η πυριτία ( $\text{SiO}_2$ ) και η αλουμίνα.

- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με την ανταλλαγή των ιόντων της διαλυμένης ουσίας και των ιόντων που είναι συνδεδεμένα στη στατική φάση. Χρησιμοποιείται σε οποιοδήποτε δείγμα που μπορεί να αποκτήσει φορτίο στο διάλυμά του και εξαρτάται πολύ από το pH και την ιοντική ικανότητα της κινητής φάσης.

- Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με βάση το μοριακό υδροδυναμικό όγκο ή μέγεθος του δείγματος και οφείλεται στον αποκλεισμό των μορίων στους πόρους του υλικού πλήρωσης λόγω της στερεοχημικής τους παρεμπόδισης. Τα μόρια με μεγαλύτερη διάμετρο από τους πόρους του υλικού πλήρωσης εκλύονται πρώτα και δεν υφίστανται καμία κατακράτηση, ενώ τα μικρότερα τελευταία.

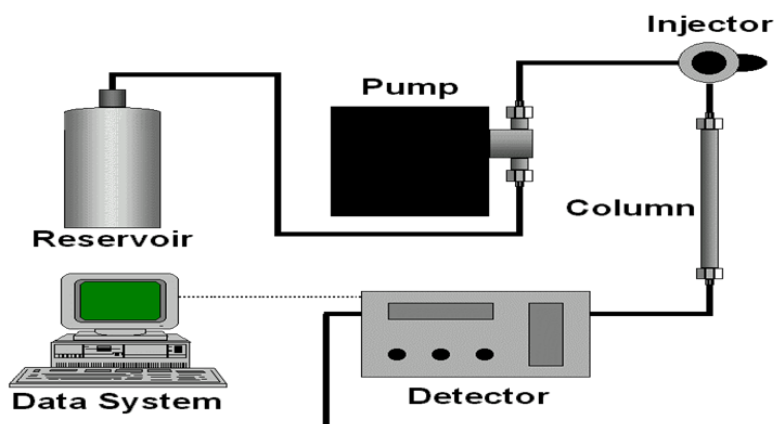


Ένας ακόμη διαχωρισμός γίνεται με βάση την πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης σε χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης η στατική φάση είναι πολική, ενώ η κινητή φάση μη πολική. Συνήθως ως στατική φάση χρησιμοποιείται η silica και ως κινητή το εξάνιο, το χλωροφόρμιο, ο διαιθυλαιθέρας, το μεθυλοχλωρίδιο και τα μίγματα τους. Αντιθέτως στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή φάση πολική. Ως στατική φάση χρησιμοποιείται μη πολικός υδρογονάνθρακας C<sub>18</sub> και C<sub>8</sub> και ως κινητή η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Ο διαχωρισμός του δείγματος γίνεται με βάση τη σειρά πολικότητας των ουσιών του. Στην κανονική φάση εκλύεται πρώτο το λιγότερο πολικό και στην αντίστροφη φάση το πιο πολικό (Weston and Brown, 1997, Skoog, Holler and Nieman, 2002, Bidlingmeyer, 1993).

### 3.4 Οργανολογία

Τα τμήματα που περιλαμβάνει ένα υγροχρωματογραφικό σύστημα υψηλής απόδοσης είναι (Σχήμα 12) :

- Φιάλες διαλυτών
- Απαερωτής
- Αντλία
- Σύστημα έγχυσης
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτής
- Καταγραφέας – μονάδα επεξεργασίας δεδομένων



Σχήμα 12. Σχηματική διάταξη ενός χρωματογραφικού συστήματος.

### 3. Φιάλες Διαλυτών

Ένα σύστημα HPLC μπορεί να αποτελείται από μία ή περισσότερες φιάλες διαλυτών που αποτελούν την κινητή φάση, ανάλογα με το αν πρόκειται για ισοκρατική, κατά την οποία χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης, είτε για βαθμιδωτή έκλυση όπου σε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιούνται δύο ή τρεις διαλύτες μεταβαλλόμενης σύστασης. Πρόκειται για γυάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία τα οποία πρέπει να είναι καθαρά και αδρανή για τους διαλύτες. (Moldoveanu and David, 2012, Skoog, Holler and Nieman, 2002).

### 4. Απαερωτής

Ο απαερωτής είναι ένα χρήσιμο σύστημα του εξοπλισμού καθώς απομακρύνει το διαλυμένο οξυγόνο που βρίσκεται στους διαλύτες και παρεμποδίζει το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και στον ανιχνευτή. Οι φυσαλίδες επηρεάζουν τον όγκο έγχυσης και τη λειτουργία του ανιχνευτή και προκαλούν διεύρυνση της κορυφής (Moldoveanu and David, 2012, Skoog, Holler and Nieman, 2002).

### 5. Αντλία

Το σύστημα άντλησης θα πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά :

- να διατηρεί την ταχύτητα ροής ανάμεσα στον ανιχνευτή, τη χρωματογραφική στήλη και στο σύστημα έγχυσης η οποία είναι συνήθως από 0,1 έως 10 ml/min,
- να δημιουργεί υψηλή πίεση έως 6000 psi,
- να είναι κατασκευασμένο από αδρανή χάλυβα, βαλβίδες υψηλής ακρίβειας και κεραμικά έμβολα ώστε να αντέχει στις υψηλές πιέσεις,
- να είναι απαλλαγμένο από παλμούς ροής,
- να έχει ακρίβεια και επαναληψιμότητα ροής 0,5%.

(Moldoveanu and David, 2012, Skoog, Holler and Nieman, 2002).

## 6. Σύστημα Έγχυσης

Η λειτουργία του συστήματος έγχυσης είναι να επιτρέπει την εισαγωγή ακριβούς ποσότητας του δείγματος στη χρωματογραφική στήλη και να τοποθετεί σε υψηλής πίεσης ροή το δείγμα ώστε να διέλθει ομοιογενές από τη στήλη. Ο όγκος του δείγματος που μπορεί να εισάγει είναι από μερικές δεκάδες μl έως 500 μl. (Ahuja and Dong, 2005, Skoog, Holler and Nieman, 2002, Bidlingmeyer, 1993).

## 7. Χρωματογραφική Στήλη

Ο διαχωρισμός του δείγματος πραγματοποιείται στη χρωματογραφική στήλη, η οποία είναι κατασκευασμένη από σωλήνα ανοξειδωτού χάλυβα πληρωμένη με πολύ μικρά πορώδη σωματίδια. Ουσιαστικά η στήλη συγκρατεί τη στατική φάση μέσα και αφήνει να διέλθει η κινητή μαζί με το δείγμα. Η εσωτερική της διάμετρος είναι 4 έως 10 mm και συνήθως πριν από τη στήλη παρεμβάλλεται μια προ-στήλη η οποία απομακρύνει συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση μη αντιστρεπτά.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης είναι σημαντικό για τον επιτυχή διαχωρισμό του δείγματος. Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα υλικά, όπως πολυμερή, άνθρακας, αλουμίνα κ.α. ανάλογα με το είδος της χρωματογραφίας. Το πιο διαδεδομένο υλικό είναι το διοξείδιο του πυριτίου (silica) το οποίο είναι υψηλής αντοχής και αυτό του επιτρέπει την ροή υγρών με μεγάλο ιξώδες, αλλά είναι διαλυτό σε αλκαλικά διαλύματα (Kazakevich and Lobrutto, 2007, Skoog, Holler and Nieman, 2002, Suzanne, 2010).

## 8. Ανιχνευτής

Ένας ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

1. Ικανοποιητική ευαισθησία
2. Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα
3. Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους
4. Μικρή κλίμακα θερμοκρασιών λειτουργίας

5. Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής
6. Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
7. Παρόμοια απόκριση προς όλες τις διαχωριζόμενες ουσίες ή εξαιρετικά προβλέψιμη και εκλεκτική απόκριση για μία ή περισσότερες ομάδες ενώσεων
8. Να μην καταστρέφει το δείγμα
9. Να έχει τον ελάχιστο δυνατό εσωτερικό όγκο για να περιορίζεται η διεύρυνση των κορυφών

### **Οι κυριότεροι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται είναι:**

#### **1. Ανιχνευτές απορρόφησης**

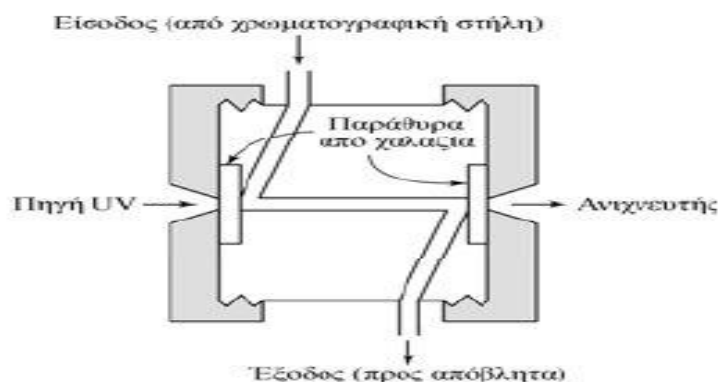
Υπάρχουν δύο είδη που είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης υπεριώδους (UV) και οι ανιχνευτές απορρόφησης υπερύθρου (IR).

Οι ανιχνευτές UV χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν ουσίες που απορροφούν σε αυτά τα μήκη κύματος. Η απορρόφηση ακτινοβολίας από μια χημική ένωση εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας και τις ομάδες της χημικής ένωσης. Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο, ανάλογα με την ενέργεια (συχνότητα) που αλληλεπιδρά με τα ηλεκτρόνια, προκαλεί τη διέγερση και μεταφορά τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, ή ακόμα προκαλεί δόνηση ή περιστροφή μοριακών δεσμών ορισμένων ομάδων της ένωσης.

Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα χωρίζεται στις περιοχές:

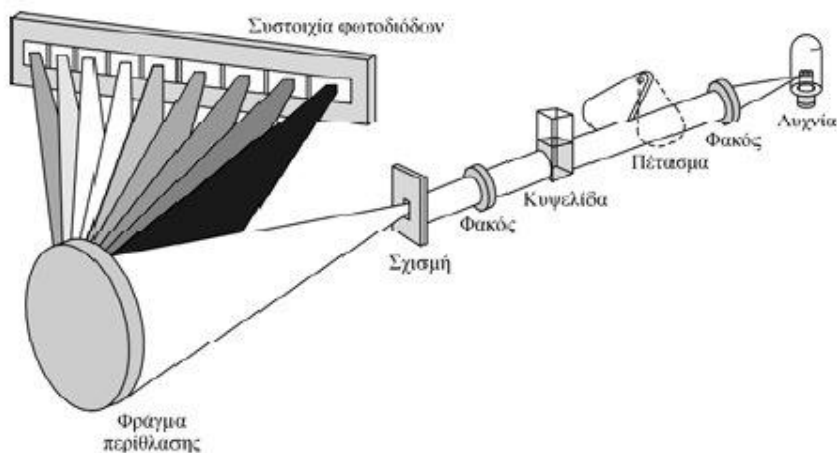
- Υπερύθρου (IR) 2500-50000 nm
- Έγγυς IR 800-2500 nm
- Ορατό Vis 400-800 nm (λάμπα W)
- Υπεριώδους UV 190-400 nm (λάμπα D2 ή Hg)

Αποτελείται από τη λυχνία, το φίλτρο, την κυψελίδα και ένα μεταλλάκτη. Χρησιμοποιούν ως πηγή φωτός λυχνία υδραργύρου, δευτερίου ή βολφραμίου και με το φίλτρο καθορίζουν τη γραμμή έντασης που συνήθως είναι στα 254 nm. Επίσης χαρακτηρίζονται από καλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα και η κυψελίδα ροής σχήματος Z που χρησιμοποιεί είναι όγκου 1-10 μl όπως φαίνεται στο Σχήμα 13.



**Σχήμα 13.** Κυψελίδα σχήματος Z

Ένας ακόμη ανιχνευτής UV είναι ο ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (Diode Array Detector – DAD) (Σχήμα 14), ο οποίος δίνει τη δυνατότητα να σαρώνει το σύνολο του φάσματος του UV επανειλημμένα κατά τη διάρκεια της έκλουσης και να ταυτοποιεί τις ουσίες που μπορεί να εκλύονται μαζί σε μια κορυφή.



**Σχήμα 14.** Σύστημα DAD

Οι ανιχνευτές απορρόφησης IR λειτουργούν όπως του UV. Διαφέρουν όμως στο ότι λειτουργούν σε διαφορετικά μήκη κύματος και ότι τα παράθυρα των κυψελίδων είναι κατασκευασμένα από χλωριούχο νάτριο ή φθοριούχο ασβέστιο. Το μειονέκτημα είναι η χαμηλή διαπερατότητα των διαλυτών που χρησιμοποιούνται, όπως το νερό και οι αλκοόλες που απορροφούν στην περιοχή του υπερύθρου.

## 2. Ανιχνευτής φθορισμού

Ένας κοινός ανιχνευτής φθορισμού περιλαμβάνει μία πηγή φωτός, είτε υδραργύρου είτε αερίου ξένου, ένα μονοχρωμάτορα ή ένα φίλτρο, ένα φωτοπολλαπλασιαστή και μία κυψελίδα ροής όγκου 1-10 μl. Το πλεονέκτημά του είναι η μεγάλη ευαισθησία που διαθέτει σε σχέση με τους άλλους ανιχνευτές. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό ουσιών που φθορίζουν.

## 3. Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης

Ο ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector, RI) ανιχνεύει τη διαφορά ανάμεσα στο δείκτη διάθλασης της καθαρής κινητής φάσης και του εκλούσματος της στήλης. Για να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία θα πρέπει να ελέγχεται η θερμοκρασία του οργάνου και η σύσταση της κινητής φάσης και να υπάρχει μεγάλη διαφορά μεταξύ των δεικτών διαθλάσεως της κινητής φάσης και του εκλούσματος.

## 4. Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής

Ως ηλεκτροχημικός ανιχνευτής αναφέρεται ο αμπερομετρικός, ο κουλομετρικός, ο πολαρογραφικός και ο αγωγιμομετρικός ανιχνευτής. Ένας τέτοιος ανιχνευτής μετράει το ρεύμα που σχετίζεται με τη αναγωγή ή την οξείδωση του διαλύματος και των ηλεκτρονίων που δημιουργούνται κατά τη χημική αντίδραση που λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Επίσης ανιχνεύει ηλεκτρενεργές ουσίες και διακρίνεται από μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.

## 5. Ανιχνευτής σκέδασης φωτός μετά από εξάτμιση

Ο ανιχνευτής σκέδασης φωτός μετά από εξάτμιση (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) χρησιμοποιεί τρία βασικά στάδια τη νεφελοποίηση, την εξάτμιση και την ανίχνευση. Αρχικά το έκλουσμα μετατρέπεται σε νέφος μικροσταγονιδίων, το οποίο μεταφέρεται μέσω σωλήνα, όπου η κινητή φάση εξατμίζεται και τέλος ακτινοβολείται μέσω λέιζερ και το σκεδαζόμενο φως ανιχνεύεται. Μπορεί να ανιχνεύσει οτιδήποτε είναι λιγότερο πτητικό από την κινητή φάση.

(Kazakevich and Lobrutto, 2007, Skoog, Holler and Nieman, 2002, Remington, 2005, Fallon, Booth and Bell, 1987, Lindsay and Barnes, 1992).

## 9. Καταγραφές – Μονάδα Επεξεργασίας Δεδομένων

Ο καταγραφέας λαμβάνει το ηλεκτρονικό σήμα που εκπέμπει ο ανιχνευτής, το καταγράφει και το αποθηκεύει. Ο καταγραφέας και η μονάδα επεξεργασίας δεδομένων αποτελούνται από έναν υπολογιστή και δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να ελέγχει και να προγραμματίζει τη διαδικασία ανάλυσης, όπως είναι η ρύθμιση της ταχύτητας ροής, του όγκου έγχυσης του δείγματος, του χρόνου επεξεργασίας του δείγματος, τη μέγιστη πίεση των αντλιών και διάφορες άλλες παραμέτρους. Επίσης δίνεται η δυνατότητα για την περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων, όπως είναι ο διαχωρισμός των κορυφών, η μέτρηση εμβαδού κορυφών και η αναγνώριση των κορυφών από τους χρόνους κατακράτησης τους έτσι ώστε να ληφθεί το αποτέλεσμα (Moldoveanu and David, 2012).

## 4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 HPLC Ανάλυση

Χρησιμοποιώντας τον αυτόματο δειγματολήπτη γίνεται ένεση όγκου 100 µl από το φιαλίδιο το οποίο περιέχει το προς ανάλυση δείγμα. Η ροή ρυθμίζεται στο 1 µl/ ml. Η κινητή φάση είναι Μεθανόλη/Νερό (30/70 v/v). Το μήκος κύματος ξεκινάει στα 190 nm και τελειώνει στα 800 nm.

### 4.2 Συσκευές και όργανα

1. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, H.P.L.C) (Shimadzu, LC-A series, Kyoto, Japan). Ο υγρός χρωματογράφος αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα:
2. Μονάδας εισαγωγής δείγματος:
  - Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
  - Αυτόματος δειγματολήπτης
3. Στήλη χρωματογραφίας (Mycotox C<sub>18</sub>). Η αναλυτική στήλη είναι μεταλλική ανάστροφης φάσης από ανοξείδωτο χάλυβα, με μήκος 25 cm, εσωτερική διάμετρο 4,6 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης είναι 5 µm.
4. Ανιχνευτής Ορατού-Υπεριώδους (UV) (Shimadzu, SPD-M2A IVDD).  
Στην έξοδο της στήλης συνδέεται ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους με μήκος κύματος που ξεκινά από 190 nm και τελειώνει στα 800 nm.
5. Σύστημα επεξεργασίας δεδομένων:
  - Υπολογιστής. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή ο οποίος είναι συνδεδεμένος με τον ανιχνευτή.
  - Λογισμικό. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας Shimadzu, το LCsolution.
6. Αναδευτήρας (Vortex, Athal, LMS Model VTX-3000 L Mixer Uzusio).
7. Σύστημα καθαρού και υπερκάθαρου νερού (3D, ELGA, Purelab Ultra Mk2).
8. Πλυντήριο καθαρισμού και απολύμανσης (Miele Professional, G7883).
9. Μύλος άλεσης (Hawo's Oktagon 1).



10. Λουτρό υπερύχων (Bransonic Ultrasonic cleaner, 2510E-MTH).
11. Ομογενοποιητής (IKA, T25 digital Ultra Turrax).
12. Εξατμιστής (Rotary Evaporator), (Labortechnik AGE, Buchi CH-9230, Type R-210).
13. Ζυγός ακριβείας (Mettler Toledo, AB204-5).

### 4.3 Αντιδραστήρια

Όλοι οι διαλύτες πρέπει να είναι κατάλληλοι για HPLC ανάλυση. Το νερό που χρησιμοποιείται είναι τριπλά απεσταγμένο ή κατάλληλο για HPLC ανάλυση.

1. Μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )  $\geq 99.9\%$
2. Νερό κατάλληλο για HPLC ανάλυση.
3. Διάλυμα ανασύστασης [Μεθανόλη:Νερό ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ) (15/85 v/v)]
4. Κινητή φάση [Μεθανόλη:Νερό ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ) (30/70 v/v)].
5. Πιστοποιημένο υλικό αναφοράς: Διάλυμα Δεσοξυνιβαλενόλης (DON) 50,7  $\mu\text{g}/\text{L}$  σε μεθανόλη 100% της εταιρίας Trilogy Analytical Laboratory.
6. Κινητή φάση [Μεθανόλη:Νερό, ( $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ) (30/70 v/v)]

Λαμβάνουμε 300 ml μεθανόλη και 700 ml νερό με τη χρήση ογκομετρικών φιαλών των 200 ml τύπου A, ( $\pm$ ) 0.15, 100 ml τύπου A ( $\pm$ ) 0.100 και των 500 ml τύπου A ( $\pm$ ) 0,25, αντίστοιχα. Τα προσθέτουμε σε κατάλληλα γυάλινα δοχεία διαλυτών και τα μεταφέρουμε στο λουτρό υπερύχων για 20 min.

### 4.4 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

Ο εργαστηριακός εξοπλισμός περιλαμβάνει:

1. Ογκομετρικές φιάλες τύπου A.
2. Ογκομετρικοί κύλινδροι τύπου B.
3. Ποτήρια ζέσεως (της εταιρίας ILMABOR TGI).
4. Στατώ στήριξης των στηλών ανοσοσυγγένειας.
5. Γυάλινες σύριγγες που προσδένονται στις στήλες ανοσοσυγγένειας.
6. Πλαστικές σύριγγες για την άσκηση πίεσης στις στήλες ανοσοσυγγένειας.
7. Μηχανικές πιπέτες (της εταιρίας GILSON-PIPETMAN)

8. Γυάλινες φλάσκες (της εταιρίας Witeg) που συνδέονται με τον Εξατμιστή.
9. Στήλες ανοσοσυγγένειας ειδικές για Δεσοξυνιβαλενόλη (DONPREP της εταιρείας R-Biopharm RHONE LTD).

#### 4.5 Παρασκευή Πρότυπων Διαλυμάτων Δεσοξυνιβαλενόλης

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα, από το πρότυπο διάλυμα Δεσοξυνιβαλενόλης Trilogy Mycotoxin Standard, σύμφωνα με τη μέθοδο παρασκευής πρότυπων διαλυμάτων που περιγράφεται στο έντυπο το οποίο συνοδεύει το πρότυπο διάλυμα Δεσοξυνιβαλενόλης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων ήταν αυτή των διαδοχικών αραιώσεων ενώ οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 2.** Συγκεντρώσεις πρότυπων διαλυμάτων Δεσοξυνιβαλενόλης

Πρότυπα διαλύματα	Συγκέντρωση (ppb)
1	100
2	400
3	800
4	1200
5	1600
6	2000

#### 4.6 Πειραματική διαδικασία

1. Ζυγίζονται 25 gr αλεσμένο δείγμα σε ένα ποτήρι ζέσεως 1 L.
2. Προσθέτονται 200 ml νερό και πραγματοποιείται ομογενοποίηση σε υψηλή ταχύτητα για 2 min.
3. Διηθείται το δείγμα σε διηθητικό χαρτί Whatman No. 113 ή No 4. και συλλέγεται το διήθημα σε ποτήρι ζέσεως.

4. Λαμβάνονται 2 ml από το φιλτραρισμένο δείγμα με πιπέτα και εισάγονται στη στήλη ανοσοσυγγένειας με σταθερή ροή 2 ml/min με, με τη βοήθεια σύριγγας ή με τη βαρύτητα.
5. Εκπλένεται η στήλη ανοσοσυγγένειας με 10 ml με νερό με ροή 5 ml/min.
6. Εκλούεται η Δεσοξυνιβαλενόλη από τη στήλη με 1,5 ml μεθανόλη με ταχύτητα 1 σταγόνα/sec ή με τη βαρύτητα. Κατά τη διάρκεια της έκλουσης αναστρέφεται η ροή τρεις φορές με τη βοήθεια σύριγγας (backflush). Το έκλουσμα συλλέγεται σε γυάλινη φιάσκα.
7. Εξατμίζεται το έκλουσμα μέχρι ξηρού στους 55 °C.
8. Πραγματοποιείται ανασύσταση με 1 ml διαλύματος (μεθανόλη/νερό) (15/85 v/v) και τοποθετείται στον αναδευτήρα (Vortex) για 20 sec.
9. Με τον αυτόματο δειγματολήπτη εισάγονται 100 μl από το ανώτερο διάλυμα στον υγρό χρωματογράφο HPLC-UV.

Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται τα δείγματα ρυζιού, φιστικιού, βρώμης και σιταριού, καθώς και στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η ονομασία των δειγμάτων αυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση τους με HPLC.



**Εικόνα 3.** Δείγματα φιστικιού, ρυζιού, βρώμης και σιταριού για ανάλυση HPLC.

**Πίνακας 3.** Δείγματα ρυζιού, φιστικιού, βρώμης και σιταριού που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση με HPLC.

Σιτάρι	Βρώμη	Ρύζι	Φιστίκια
Σιτάρι (1)	Βρώμη (1)	Ρύζι (1)	Άψητα χωρίς κέλυφος
Σιτάρι (2)	Βρώμη (2)	Ρύζι (2)	Άψητο κελυφωτό (1)
Σιτάρι (3)	Βρώμη (3)	Ρύζι (3)	Άψητο κελυφωτό (2)
Σιτάρι (4)	Βρώμη (4)	Ρύζι (4)	Ψημένο κελυφωτό (1)
Σιτάρι (5)	Βρώμη (5)	Ρύζι (5)	Ψημένο κελυφωτό (2)
Σιτάρι (6)	Βρώμη (6)	Ρύζι (6)	Ψημένο συσκευασμένο κελυφωτό
Σιτάρι (7)	Βρώμη (7)	Ρύζι (7)	Κελυφωτό (1)
Σιτάρι (8)	Βρώμη (8)	Ρύζι (8)	Κελυφωτό (2)
Σιτάρι (9)	Βρώμη (9)	Ρύζι (9)	Κελυφωτό Κίνας
Σιτάρι (10)	Βρώμη (10)	Ρύζι (10)	
Σιτάρι (11)	Βρώμη (11)	Ρύζι (11)	
Σιτάρι (12)	Βρώμη (12)	Ρύζι (12)	
Σιτάρι (13)	Βρώμη (13)	Ρύζι (13)	
Σιτάρι (14)	Βρώμη (14)	Ρύζι (14)	
Σιτάρι (15)	Βρώμη Ζωοτροφή	Ρύζι ακατέργαστο	

## 5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

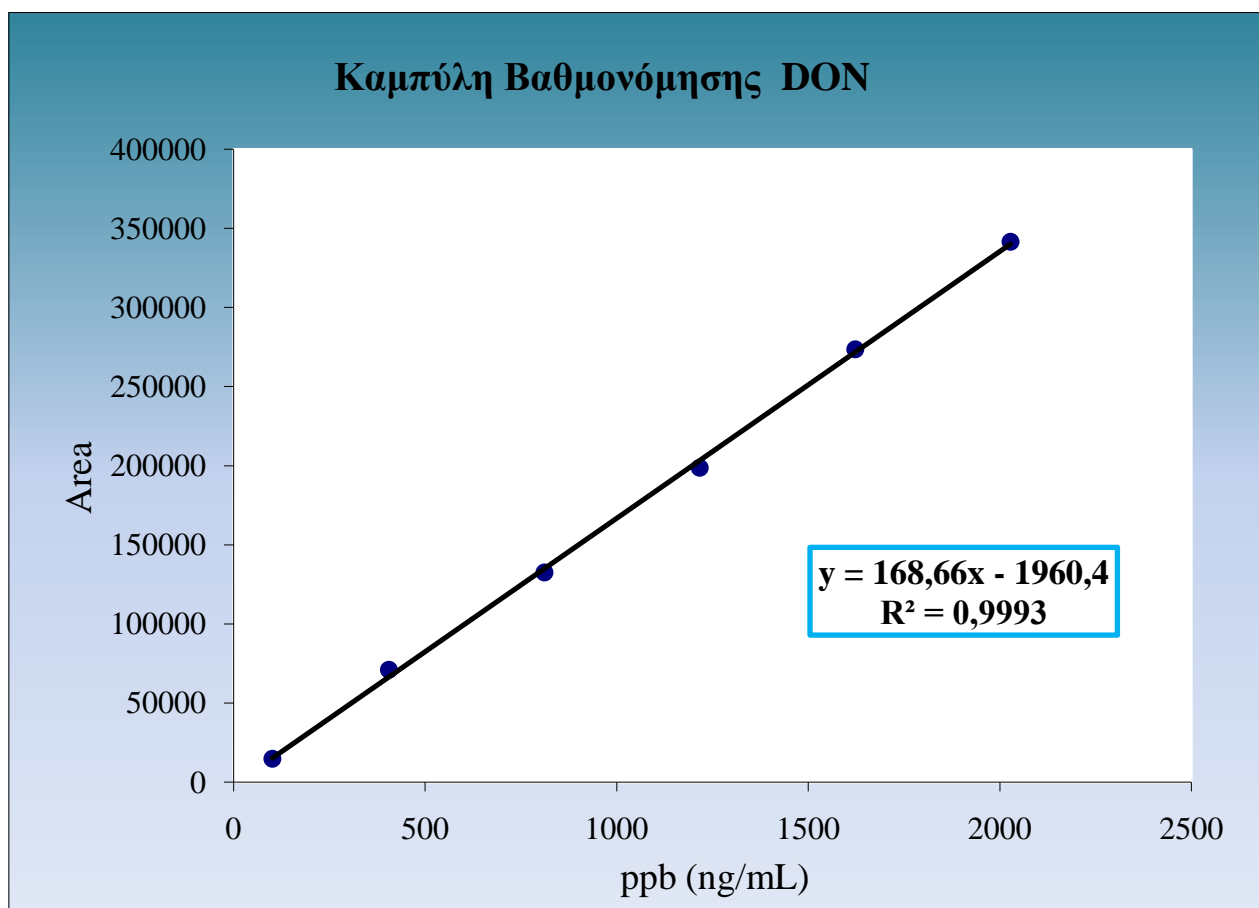
### 5.1 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης το πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα Δεσοξυनिβαλενόλης (Trilogy mycotoxin standard) 50.000 ppb σε μεθανόλη 100% της εταιρίας Trilogy Analytical Laboratory. Από το εταιρικό διάλυμα παρασκευάστηκε stock διάλυμα των 2.500 ppb όγκου 5 ml και από το stock παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σε συγκεντρώσεις 100, 400, 800, 1.200, 1.600 και 2.000 ppb. Η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Για κάθε μια από της ανωτέρω συγκεντρώσεις πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα όπως προσδιορίστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 4.** Περιέχονται οι τιμές των συγκεντρώσεων Δεσοξυनिβαλενόλης και των εμβαδών κορυφής για τα πρότυπα διαλύματα Δεσοξυनिβαλενόλης.

Συγκέντρωση (ppb)	Εμβαδό (Area)	Μέσος Όρος Εμβαδών
100	14266	14585
	14904	
400	74299	70792
	67285	
800	131928	132409
	132890	
1200	202114	198630,5
	195147	
1600	277528	273527
	269526	
2000	324832	341504
	358176	

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 4 διαπιστώνεται ότι οι μετρήσεις παρουσιάζουν πολύ καλή επαναληψιμότητα. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τις τιμές του Πίνακα 4 κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης. Η καμπύλη αυτή περιγράφει τις τιμές των εμβαδών των κορυφών έναντι των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων DON (Σχήμα 15). Η ευθεία αποτελείται από έξι σημεία και είναι της μορφής  $y=ax+\beta$ .



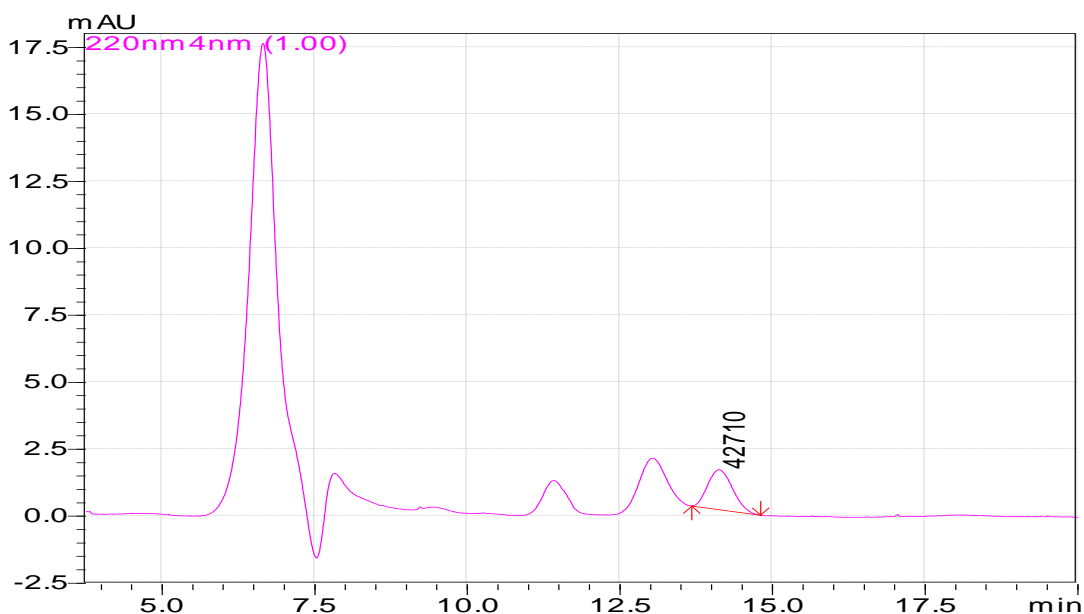
**Σχήμα 15.** Καμπύλη βαθμονόμησης της μυκοτοξίνης DON

Όπως φαίνεται και από την καμπύλη βαθμονόμησης ο συντελεστής συσχετισμού ( $R^2 = 0,999$ ) στην ευθεία των ελαχίστων τετραγώνων πλησιάζει την τιμή της μονάδας, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχει καλή γραμμικότητα.

## 5.2 Έλεγχος ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας με τη χρήση Πιστοποιημένων Υλικών Αναφοράς, CRM.

Το πιστοποιημένο υλικό αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν αλεσμένο ρύζι από την εταιρία R Biorharm και η συγκέντρωσή του σε DON ήταν 2.800 ppb.

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του δείγματος CRM σε DON η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε για τα άγνωστα δείγματα ρυζιού. Επειδή η ποσότητα του δείγματος CRM ήταν 6,12 gr έπρεπε να τροποποιηθεί η ποσότητα νερού που προστέθηκε. Συνεπώς αντί για 200 ml νερό προστέθηκαν 100 ml νερό. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες της διήθησης, του φιλτραρίσματος, του καθαρισμού, η προετοιμασία ανάλυσης και τελικά της χρωματογραφικής ανάλυσης με τον ίδιο τρόπο όπως στα άγνωστα δείγματα. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της ανάκτησης της Δεσοξυνιβαλενόλης σε δείγμα από αλεσμένο ρύζι συγκέντρωσης 2.800 ppb (CRM).



**Σχήμα 16.** Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της ανάκτησης της Δεσοξυνιβαλενόλης σε δείγμα από αλεσμένο ρύζι συγκέντρωσης 2.800 ppb (CRM).

### 5.3 Δοκιμές ανάκτησης.

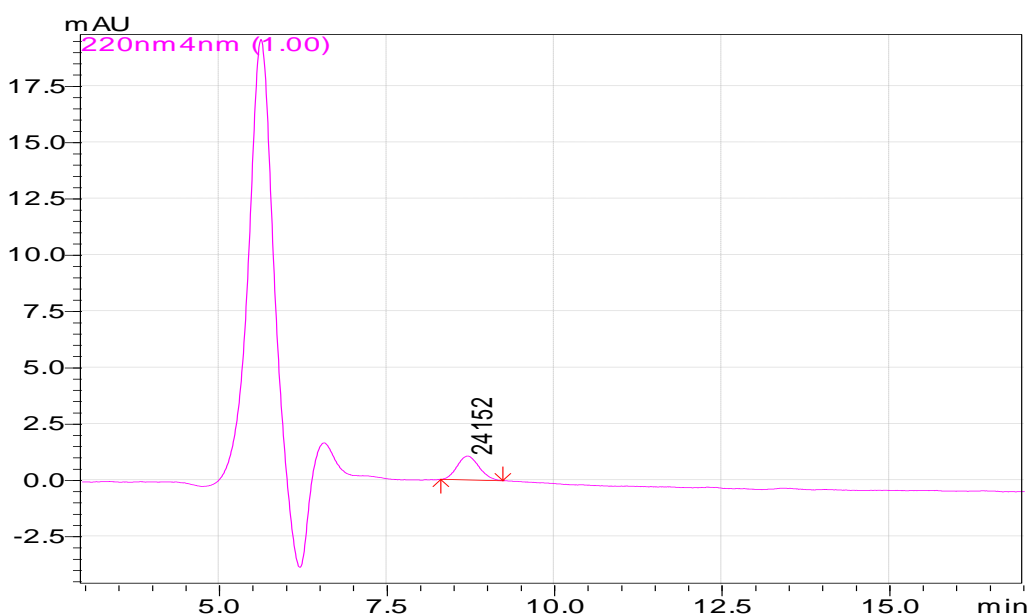
Για τη δοκιμή της ανάκτησης λήφθηκε δείγμα ρυζιού, το οποίο δεν περιείχε δεσοξυνιβαλενόλη μετά από έλεγχο που πραγματοποιήθηκε. Το δείγμα ρυζιού μολύνθηκε με ποσότητα 375 ppb και 750 ppb από το αρχικό πρότυπο (50,7 μg/L σε 10 ml μεθανόλη) πραγματοποιώντας τρεις επαναλήψεις για την κάθε επιμόλυνση.

Για τη δοκιμή της ανάκτησης η διαδικασία ήταν η ακόλουθη. Αρχικά αλέθεται το δείγμα ρυζιού και ζυγίζεται έτσι ώστε να ληφθούν δύο ποτήρια ζέσεως του 1 L με 25 gr αλεσμένο ρύζι. Στη συνέχεια μολύνονται με την αντίστοιχη γνωστή συγκέντρωση προτύπων. Κατά την επιμόλυνση θα πρέπει το πρότυπο να μεταφερθεί σε όλη την ποσότητα του δείγματος και γι' αυτό το δείγμα ανακατεύεται ήρεμα με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου για περίπου 2 min. Εν συνεχεία η προετοιμασία τους είναι παρόμοια με αυτή που ακολουθείται για τα άγνωστα δείγματα. Για να υπολογιστεί η συγκέντρωση DON στα δείγματα ρυζιού θα χρησιμοποιηθεί η εξίσωση:

$$C_{DON} = (4 * Area + 1960.4) / 168.66$$

όπου Area: το εμβαδόν της κορυφής της DON από το χρωματογράφημα.

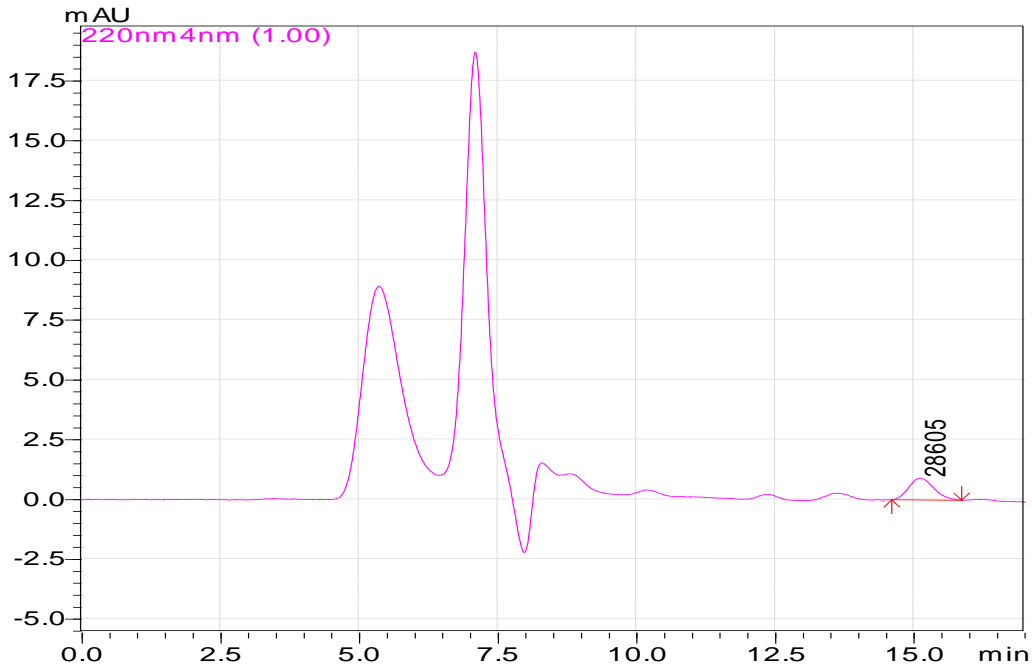
Στο Σχήμα 17 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε ρύζι στα 750 ppb.



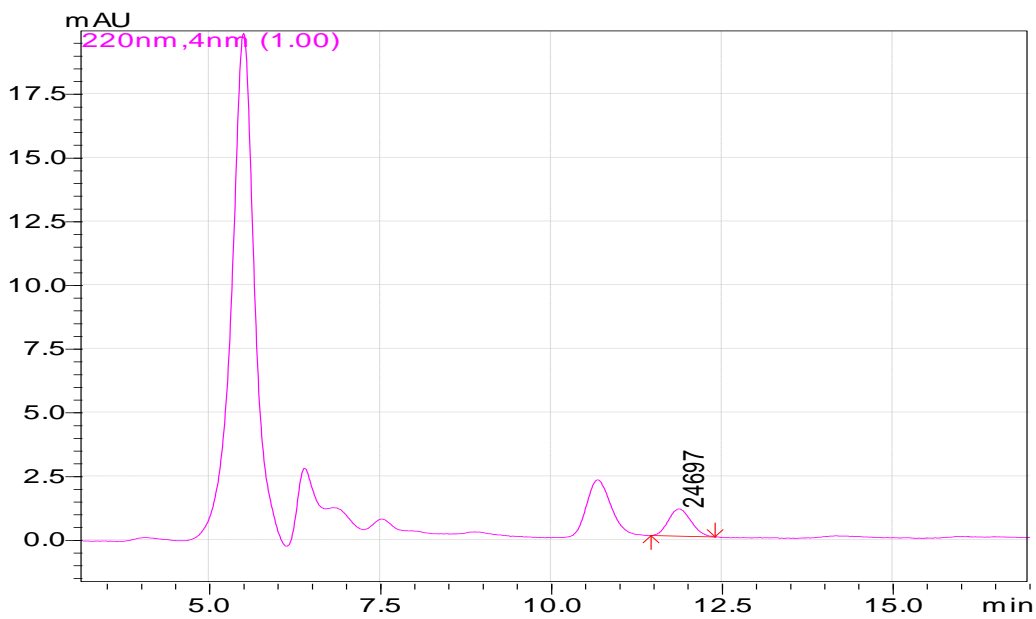
**Σχήμα 17** Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε ρύζι στα 750 ppb.



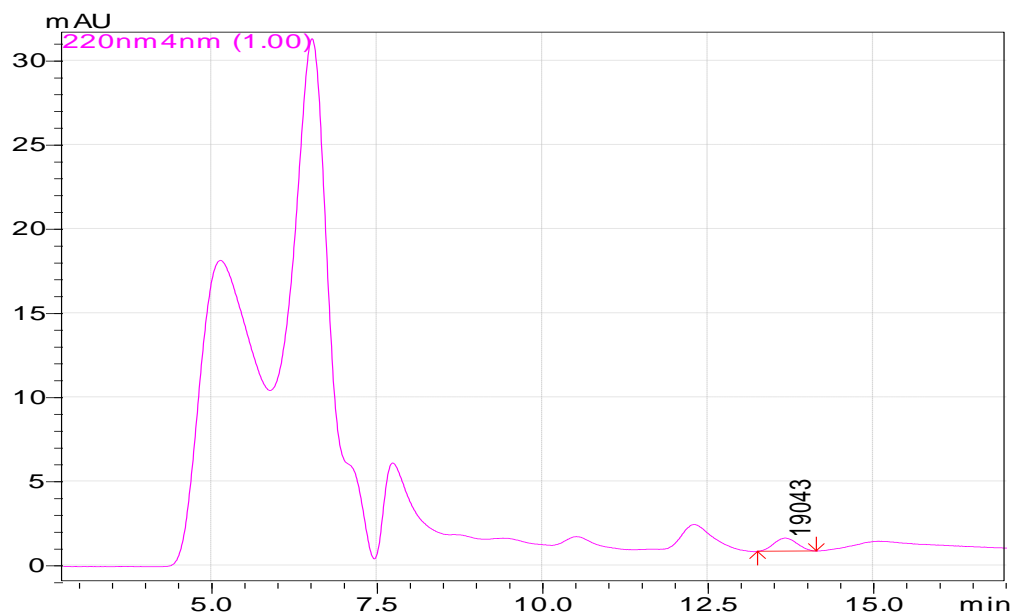
Αντίστοιχη διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για δείγματα βρώμης, σιταριού και φιστικιών των οποίων τα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στα Σχήματα 18, 19 και 20 αντίστοιχα.



**Σχήμα 18** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Σ. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε βρώμη στα 750 ppb.



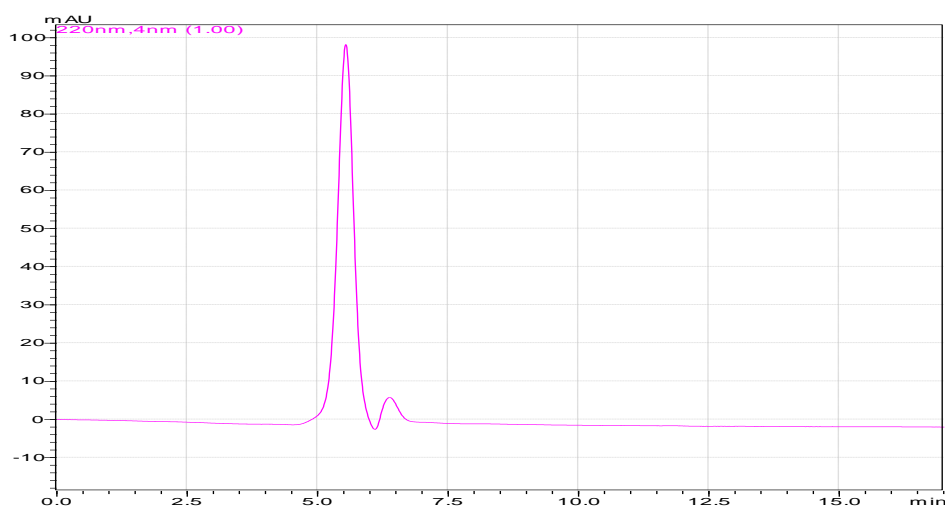
**Σχήμα 19** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Σ. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε σιτάρι στα 750 ppb.



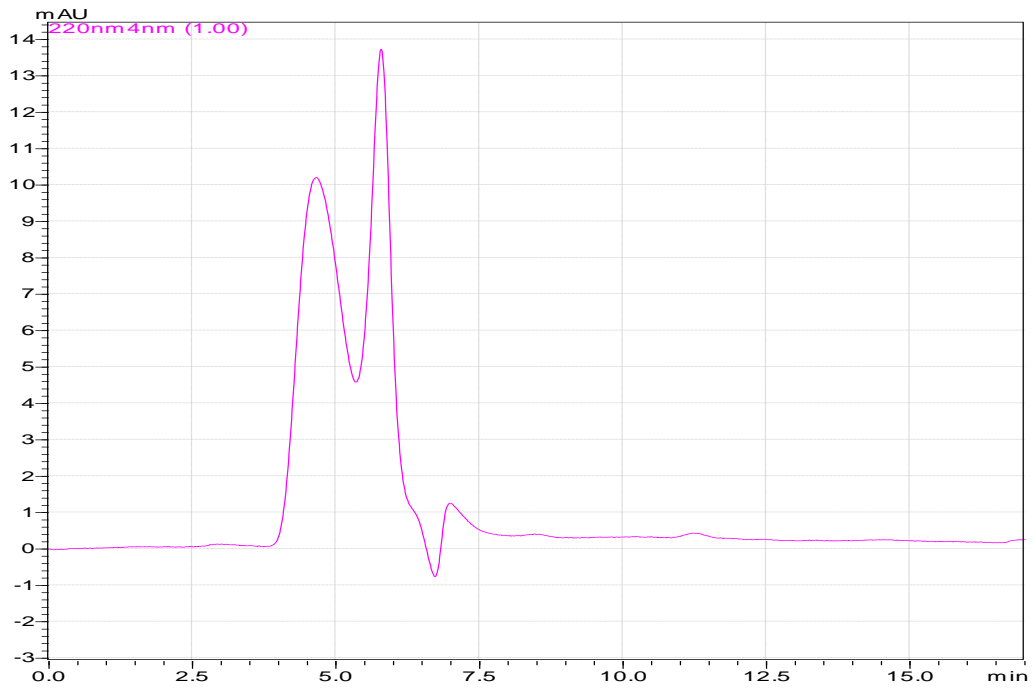
**Σχήμα 20** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Κ. για τον προσδιορισμό ανάκτησης DON σε φιστίκια στα 750 ppb.

#### 5.4 Παράθεση χρωματογραφημάτων των δειγμάτων που αναλύθηκαν.

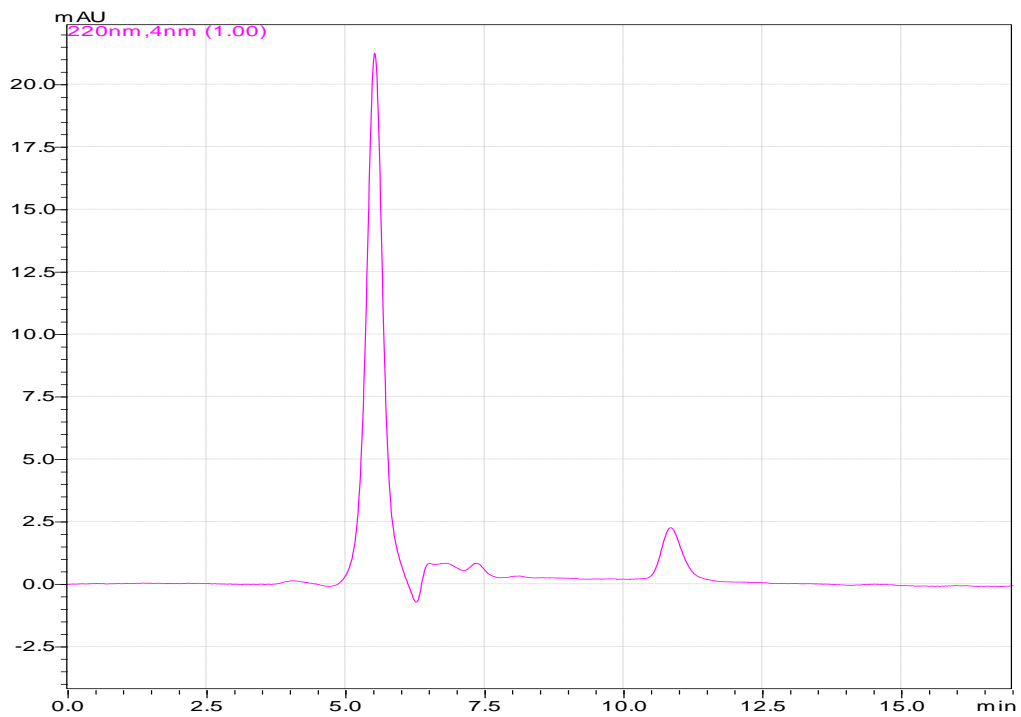
Η διαδικασία ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα ξεχωριστά έδειξε ότι τα δείγματα ρυζιού, βρώμης, σιταριού και φιστικιού δεν περιείχαν δεσοξυνιβαλενόλη, τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται ενδεικτικά στα Σχήματα 21, 22, 23 και 24.



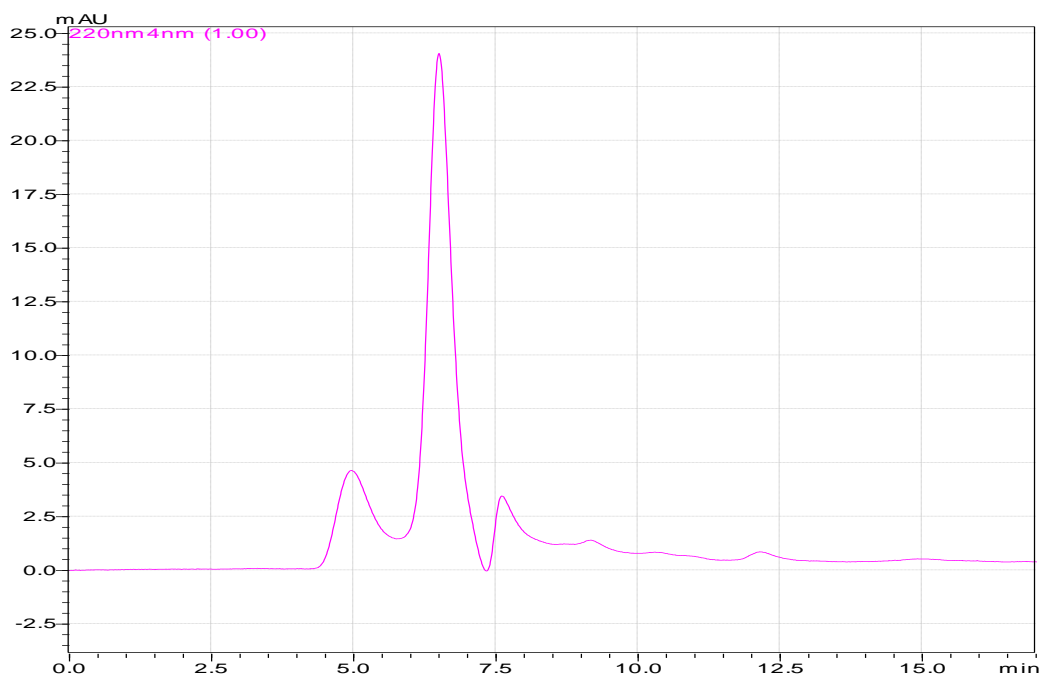
**Σχήμα 21** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Κ. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα ρυζιού.



**Σχήμα 22** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Σ. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα βρώμης.



**Σχήμα 23** Χρωματογράφημα Η.Ρ.Λ.Σ. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα σιταριού



**Σχήμα 24** Χρωματογράφημα H.P.L.C. για τον προσδιορισμό της DON σε δείγμα φιστικιού.

Στο συνολικό αριθμό των δειγμάτων που αντιστοιχούν σε 15 δείγματα ρυζιού, 15 δείγματα βρώμης, 15 δείγματα σιταριού και 9 δείγματα φιστικιών δεν ανιχνεύτηκε περιεκτικότητα DON.

### 5.5 Ενεργότητα νερού ( $a_w$ )

Ως ενεργότητα νερού ορίζεται η παράμετρος που εκφράζει την ποσότητα νερού στο τρόφιμο που είναι διαθέσιμη για τις ανάγκες αύξησης των μικροοργανισμών και θεωρείται δείκτης της ισχύος δέσμευσης νερού από τα συστατικά του τροφίμου. Η  $a_w$  είναι σημαντική για την ανάπτυξη της DON, αφού η δημιουργία της εξαρτάται τόσο από αυτήν όσο και από τη θερμοκρασία. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας του νερού ή αλλιώς της υγρασίας επί % στα δείγματα ρυζιού, βρώμης, σιταριού και φιστικιού δείχνουν ότι οι τιμές της κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα κατάλληλα για τη διατήρηση των προϊόντων χωρίς τον κίνδυνο ανάπτυξης της DON και αυτό δικαιολογεί και την απουσία DON στα τυφλά δείγματα. Για τη μέτρηση της ενεργότητας του νερού χρησιμοποιήθηκε το όργανο Hygrolab της Rotronic. Τα αποτελέσματα μετρήσεων Υγρασίας-Θερμοκρασίας σε δείγματα σιταριού, βρώμης, ρυζιού και φιστικιού παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

**Πίνακας 5.** Πίνακες αποτελεσμάτων μετρήσεων Υγρασίας-Θερμοκρασίας σε δείγματα σιταριού, ρυζιού, βρώμης και φιστικιού.

Είδος	Δείγματα	Υγρασία % (Humidity)	Θερμοκρασία °C
Σιτάρι	Σιτάρι (1)	59,4	13,95
	Σιτάρι (2)	58,8	14,1
	Σιτάρι (3)	58,6	14,3
	Σιτάρι (4)	58,9	14,45
	Σιτάρι (5)	59,1	14,75
	Σιτάρι (6)	58,5	15,05
	Σιτάρι (7)	57,4	15,45
	Σιτάρι (8)	56,6	15,6
	Σιτάρι (9)	57	15,65
	Σιτάρι (10)	57	15,7
	Σιτάρι (11)	59,1	15,75
	Σιτάρι (12)	59	15,75
	Σιτάρι (13)	60,9	15,85
	Σιτάρι (14)	59,3	16,2
	Σιτάρι (15)	58,8	15,95

Είδος	Δείγματα	Υγρασία % (Humidity)	Θερμοκρασία °C
Βρώμη	Βρώμη (1)	62,3	17,6
	Βρώμη (2)	61,2	17,5
	Βρώμη (3)	61	17,55
	Βρώμη (4)	60,5	17,4
	Βρώμη (5)	60,7	17,45
	Βρώμη (6)	60,8	17,3
	Βρώμη (7)	60,3	17,35
	Βρώμη (8)	59,5	17,35
	Βρώμη (9)	60,7	17,65
	Βρώμη (10)	60,1	17,1
	Βρώμη (11)	60,4	17,15
	Βρώμη (12)	59,8	17,2
	Βρώμη (13)	62,3	17,3
	Βρώμη (14)	59,9	17,65
	Βρώμη Ζωοτροφή	60,7	17,65

Είδος	Δείγματα	Υγρασία % (Humidity)	Θερμοκρασία °C
Ρύζι	Ρύζι (1)	58,5	16,35
	Ρύζι (2)	58,0	16,4
	Ρύζι (3)	59,6	16,6
	Ρύζι (4)	60,9	16,9
	Ρύζι (5)	60,5	16,95
	Ρύζι (6)	60,7	16,95
	Ρύζι (7)	61,7	17
	Ρύζι (8)	59,5	16,45
	Ρύζι (9)	58,5	16,45
	Ρύζι (10)	58,3	16,5
	Ρύζι (11)	58,1	16,55
	Ρύζι (12)	57,8	16,6
	Ρύζι (13)	59,8	16,7
	Ρύζι (14)	59,7	16,75
	Ρύζι ακατέργαστο	62,0	17,1

Είδος	Δείγματα	Υγρασία % (Humidity)	Θερμοκρασία °C
Φιστίκι	Άψητα χωρίς κέλυφος	61	13,9
	Άψητο κελυφωτό (1)	60,6	13,45
	Άψητο κελυφωτό (2)	61,1	13,75
	Ψημένο κελυφωτό (1)	61	13,25
	Ψημένο κελυφωτό (2)	60,1	13,15
	Ψημένο συσκευασμένο κελυφωτό	59,8	12,95
	Κελυφωτό (1)	59,9	13,6
	Κελυφωτό (2)	59,9	13,7
	Κελυφωτό Κίνας	60,9	13,85

## 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ

Από την ανάλυση των δειγμάτων και τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι στα δείγματα δεν ανιχνεύτηκε δεσοξυνιβαλενόλη. Σύμφωνα με έρευνες που έχουν γίνει από τους Scott (1989), Tanaka et al. (1988) και Pan et al (2009) η δημιουργία της DON σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις καιρικές συνθήκες κατά την διάρκεια της συγκομιδής. Αυτό σημαίνει ότι κατά τη συγκομιδή, την αποθήκευση και τη μεταφορά των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν οι κανόνες που θεσπίζει η Ευρωπαϊκή Ένωση και το HACCP δηλαδή η Ανάλυση Κινδύνου και Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου, κάτι που εξασφαλίζει ότι τα προϊόντα που καταναλώνουμε δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Σύμφωνα με τους Degraeve et al. (2016), οι μύκητες του αγρού όπως είναι και ο *Fusarium* αναπτύσσονται λόγω των υψηλών θερμοκρασιών και υγρασίας, λόγω κακής γονιμότητας του εδάφους, την ξηρασία και την καταστροφή από έντομα, μουσώνες και βροχές εκτός εποχής κατά τη συγκομιδή, ενώ κατά την αποθήκευση η παραγωγή της DON είναι σπάνια αλλά στη δημιουργία της μπορεί να συμβάλλουν η ακατάλληλη μεταφορά των τροφίμων καθώς και οι πρακτικές ξήρανσης που χρησιμοποιούνται. Τα αποτελέσματα από τις δοκιμές ανάκτησης σε ποσοστό επί % που πραγματοποιήθηκαν με τεχνητή επιμόλυνση ποσότητας 375 ppb αντιστοιχούν για το ρύζι στο 69,7%, για το σιτάρι στο 78,66%, για τη βρώμη στο 107% και για τα φιστίκια στο 72,45%, ενώ με τεχνητή επιμόλυνση ποσότητας 750 ppb αντιστοιχούν για το ρύζι στο 78,9%, για το σιτάρι στο 79,64%, για τη βρώμη στο 95,89% και για τα φιστίκια στο 75,35%. Οι τιμές των ποσοστών ανάκτησης των δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν είναι αποδεκτές από τον Κανονισμό 401/2006, βάση του οποίου έγιναν και οι δοκιμές ανάκτησης και ο οποίος δέχεται ανακτήσεις από 60-110% για συγκεντρώσεις DON από 100 ppb έως και 500 ppb και ανακτήσεις από 70-120% για συγκεντρώσεις DON πάνω από 500 ppb. Για τον έλεγχο ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας με τη χρήση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς, CRM συγκέντρωσης 2.800 ppb που πραγματοποιήθηκε, το αποτέλεσμα αντιστοιχεί σε ποσοστό ανάκτησης 72%. Ακόμη, τα αποτελέσματα των μετρήσεων ενεργότητας νερού δείχνουν ότι οι τιμές τις  $a_w$  είναι μειωμένες, κάτι που σημαίνει ότι δεν ευνοήθηκε η ανάπτυξη της DON στα δείγματα που εξετάστηκαν.

Επιπλέον έρευνα θα μπορούσε να είναι ο έλεγχος των ίδιων δειγμάτων με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης με σκοπό την ανίχνευση άλλων τοξινών πέρα

της δεσοξυνιβαλενόλης. Επίσης, η μελέτη των ίδιων δειγμάτων σε συνθήκες οι οποίες δεν πληρούν τους κανόνες συντήρησης και κατανάλωσης των τροφίμων όπως και η διεύρυνση των τροφίμων που παρουσιάζουν μόλυνση από δεσοξυνιβαλενόλη. Περεταίρω έρευνα θα μπορούσε ακόμα να αποτελέσει ο έλεγχος της συσκευασίας τους με σκοπό την παράταση της ημερομηνίας λήξης χωρίς ωστόσο την αλλοίωση των οργανοληπτικών συστατικών των τροφίμων. Τέλος, συνίσταται η ακτινοβολήση με ακτίνες γ ή χ, μολυσμένων τροφίμων από δεσοξυνιβαλενόλη με σκοπό την πιθανότητα μείωσης ή εξάλειψής της.



## BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Agag, B.I. (2004) 'Mycotoxins in foods and feeds: aflatoxin ', *Ass. Univ. Bull. Environ. Res.*, pp. 173-205.
- Ahuja, S. and Dong, M.W. (2005) *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC.*, Elsevier.
- Aish, J.L., Rippon, E.H., Barlow, T. and Hattersley, S.J. (2004) 'Ochratoxin A.', in Megan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, Boca Raton: CRC Press.
- Alexandra C., Chaytor, J.A.H., Eric van Heughten., M Todd See. and Kim., S.W. (2011) 'Occurrence and Decontamination of Mycotoxins in Swine Feed', *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, pp. 723 - 738.
- Alizadeh, A.M., Rohandel, G., Roudbarmohammadi, S., Roudbory, M., Sohanaki, H., Ghiasin, S.A., Taherkhani, A., Semnani, A. and Aghasi, M. (2012) 'Fumonisin B1 contamination of cereals and risk of esophageal cancer in high risk area in northeastern Iran.', *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, pp. 2625-2628.
- Atanda S.A., Aina J.A., Agoda S.A., Usanga O.E. and Pessu P.O. (2012) 'Mycotoxin Management in Agriculture: a Review', *Journal of Animal Science Advances*, pp. 250-260.
- Audenaert, K., Monbaliu, S., Deschuyffeleer, N., Maene, P., Vekeman, F., Haesaert, G., De Saeger, S. and Eeckhout, M. (2012) 'Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium* spp. in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis.', *Food Control.*, pp. 515-521.
- Audenaert, K., Vanheule, A.H.M. and Haesaert, G. (2013) 'Deoxynivalenol: A Major Player in the Multifaceted Response of *Fusarium* to Its Environment.', *Toxins*, pp. 1-19.
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Schurz Rogers, H., Kieszak, S., Njapau, H., Schleicher, R., McCoy, L.F., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C., L., S. and Group., T.A.I. (2005) 'Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak.', *Health Perspect*, p. 1779.
- Bamburg, J.R., Marasas, W.F., Smalley, E.B. and Strong, F.M. (1968) 'Toxic compounds from *Fusarium* and other Hypomycetes.', *Biotech. Bioengin.*, pp. 445-455.
- Bauer, J., Heinritzi, K., Gareis, M. and Gedek, B. (1987) 'Veränderungen am Genitaaltrakt des weiblichen Schweines nach Verfütterung praxisrelevanter Zearalenonmengen.', *Tierarztl Prax.*, pp. 33-36.
- Bayman, P. and Baker, J.L. (2006) 'Ochratoxins: a global perspective.', *Mycopathologia*, pp. 215-223.
- Bennet, J.W. and Klich, M. (2003) 'Mycotoxins', *Clin. Microbiol. Rev.*, pp. 497-516.

- Bennett, J.W. (1987) 'Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathology', *Mycopathl.*, pp. 3-5.
- Bernhoft, A., Torp, M., Clasen, P.E., Loes, A.K. and Kristoffersen, A.B. (2012) 'Influence of agronomic and climatic factors on Fusarium infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway.', *Food Add. Contam.*, pp. 1129-1140.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G. and Krska, R. (2009) 'Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. ', *Anal. Bioanal. Chem.*
- Bhat, R., Rai, R.V. and Karim, A.A. (2010) 'Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns.', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp. 57-81.
- Bhat, R.V. and Vasanthi, S. (2003) 'Mycotoxin food safety risks in developing countries. Food safety in food security and Food Trade. Vision 2020 for Food.', *Agriculture and Environment*, pp. 3-17.
- Bidlingmeyer, B.A. (1993) *Practical HPLC Methodology and Applications.*, Wiley-Interscience.
- Binder, E.M., L.M., T., Chin, L.J., Handl, J. and Richard, J. (2007) 'Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients.', *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 265-282.
- Boichenko, L.V., Boichenko, D.M., Vinokurova, N.G., Reshetilova, T.A. and Arinbasarov, M.U. (2001) 'Screening for ergot alkaloid producers among microscopic fungi by means of the polymerase chain reaction.', *Microbiol.*, pp. 306-310.
- Brera., C., Santis., B.D., Bebegnach., F. and Miraglia., M. (2008) 'Mycotoxins', *Comprehensive Analytical Chemistry*.
- Brown, D.W., McCormick, S.P., Alexander, N.J., Proctor, R.H. and Desjardins, A.E. (2001) 'A genetic and biochemical approach to study trichothecene diversity in *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium graminearum*.' in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food*.
- Busby, W.F. and Wogan, G.N. (1984) 'Aflatoxins', in Searle, G.C. *Chemical Carginogens*, Washington (DC): American Chemical Society.
- Campbell, H., Choo, T.M., Vigier, B. and Underhill, L. (2000) 'Mycotoxins in barley and oat samples from eastern Canada.', *Can. J. Plant Sci.*, pp. 977-980.
- Carnaghan, R.B.A., Hartley, R.D. and O' Kelly, J. (1963) 'Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins.', *Nature*, pp. 1101-1102.
- CAST (2003) 'Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems.', *Council for Agric. Sci. Technol.*

- Christensen, C.M. (1974) 'Storage of Cereal Grains and their Products.', *American Association of Cereal Chemists*.
- Chu, F.S. and Li, G.Y. (1994) 'Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the people's republic of china in regions with high incidences of esophageal cancer.', *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 847-852.
- Ciegler, A. (1978) 'Trichothecenes: Occurrence and toxicoses.', *J. Food Prot.*, pp. 399-403.
- Ciegler, A., Fennell, D.I., Sansing, G.A., Detroy, R.W. and Benntt, G.A. (1973) *Appl. Microbiol.*
- Cole, R.J. and Cox, R.H. (1981) 'Handbook of toxic fungal metabolites', *Academic Press, New York*.
- Cotty, P.J. and Jaime-Garcia, R. (2007) 'Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination', *Int. J. Food Microbiol.*, pp. 109-115.
- Cowger, C. and Arellano, C. (2013) 'Fusarium graminearum infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes.', *Phytopathology.*, pp. 460-471.
- Cundliffe, E. and Davies, J.E. (1977) 'Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins.', *Antimicrob. Agents Chemother.*, pp. 491-499.
- D' Mello, J.P.F. and MacDonald, A.M.C. (1997) 'Mycotoxins', *Anim. Feed Sci. Technol.*, pp. 155-166.
- Daniel, L.S. (2003) 'Trichothecenes in the environment: relevance to human health.', *Toxicology Letters*, pp. 97-107.
- Degraeve, S., Madege, R.R., Audenaert, K., Kamala, A., Ortiz, J., Kimanya, M., Tiisekwa, B., De Meulenaer, D. and Haesaert, G. (2016) 'Impact of local pre-harvest management practices in maize on the occurrence of Fusarium species and associated mycotoxins in two agro-ecosystems in Tanzania.', *Food Control*, pp. 225-233.
- Dersjant-Li, Y., Verstegen, M.W.A. and Gerrits, W.J.J. (2003) 'The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry.', *Nutr. Res. Rev.*, pp. 223-239.
- Desjardins, A.E. (2003) 'Trichothecenes: From yellow rain to green wheat.', *ASM News*, p. 182.
- Desjardins, A.E. (2006) 'Fusarium mycotoxins', *Genetics and Biology*.
- Diekman, M.A. and Green, M.L. (1992) *J. Anim. Sci.*
- Diener, U.L. (1969) *L. Stored Prod.*, p. 251.

- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijkma, A. and Placinta, C.M. (1998) 'Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens', *Eur. J. Plant Path.*, pp. 741-751.
- Doll, S., Danickle, S., Ueberschar, K.H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Ganter, M., Klobasa, F. and Flachowsky, G. (2003) 'Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets.', *Arch. Anim. Nutr.*, pp. 311-334.
- Dong, W. and Pestka, J.J. (1993) 'Persistent dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse following with drawal of dietary vomitoxin (deoxynivalenol).', *Fund. Appl. Toxicol.*, pp. 38-47.
- Dong, W., Sell, J.E. and Pestka, J.J. (1991) 'Quantitative assessment of mesangial immunoglobulin A (IgA) accumulation, elevated circulating IgA immune complexes, and hematuria during vomitoxin-induced IgA nephropathy.', *Fund. Appl. Toxicol.*, pp. 197-207.
- Dragan, Y.P. and Pitot, H.C. (1994) 'Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer.', in Eaton, D.L. and Groopman, J.D. *The Toxicology of Aflatoxins.*, London: Academic Press.
- EFSA (2004d) 'Opinion of the scientific panel on the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed.', *EFSA J.*, pp. 1-35.
- EFSA, E.F.S.A. (2007) 'Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumers health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products.', *EFSA J.*, pp. 1-127.
- EFSA, E.F.S.A. (2008) 'Guidance Document for the use of the Concise European Food Consumption Database in Exposure Assessment', p. 54.
- EFSA, E.F.S.A. (2011a) 'Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food', *EFSA J.*
- EFSA, E.F.S.A. (2011b) 'Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in food and feed.', *EFSA J.*, p. 2407.
- EFSA. (2004c) 'Opinion of the scientific panel on contaminants in food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed', *EFSA J.*, pp. 1-41.
- EFSA., E.F.S.A. (2006a) 'Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food.', *EFSA J.*, pp. 1-56.
- El-Banna, A.A., Pitt, J.I. and Leistner, L. (1997) *Syst. Appl. Microbiol.*

- Fallon, A., Booth, R.F.G. and Bell, L.D. (1987) *Applications of HPLC in Biochemistry*, Elsevier.
- Fink-Gremmels, J. (2006) 'Moulds and mycotoxins as undesirable substances in animal feeds.', in *The Mycotoxin Factbook*, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands edition, Barug, D.; Bhatnagar, D.; van Egmond, H.P.; van der Kamp J.W.; van Osenbruggen W.A.; Visconti, A..
- Forsyth, D.M., Yoshizawa, T., Morooka, N. and Tuite, J. (1977) 'Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine.', *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 547-552.
- Frobish, R.A., Bradley, B.D., Wagner, D.D., Long-Bradley, P.E. and Hairston, H. (1986) 'Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grain.', *J. Food Prot.*, pp. 781-785.
- Fung, F. and Clark, R.F. (2004) *J. Toxicol.*, p. 217.
- Gallagher, R.T., Hawkes, A.D., Steyn, B.S. and Vleggaar, R. (1984) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 614.
- Galvano, F., Galofaro, V. and Galvano, G. (1996) 'Occurrence and stability of aflatoxin M1 in milk and milk products: A worldwide review.', *J. Food Prot.*, pp. 1079-1090.
- Gardiner, D.M., Osborne, S., Kazan, K. and Manners, J.M. (2009) 'Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*.' *Microbiol. Sgm.*, pp. 3149-3156.
- Geisen, R. (1998) 'PCR methods for the detection of mycotoxin-producing fungi, in Bridge P D, Arora D K, Reddy C A and Elander R P, Applications of PCR in Mycology', *Wallingford, CAB International*, pp. 243-266.
- Gelineau-van Waes, J., Voss, K.A., Stevens, V.L., Speer, M.C. and Riley, R.T. (2009) 'Maternal fumonisin exposure as risk factor for neural tube defects.', *Adv. Food Nutr.*, pp. 145-181.
- Gilgan, M.W., Smalley, E.B. and Strong, F.M. (1966) 'Isolation and partial characterization of a toxin from *Fusarium tricinctum* on moldy corn.', *Arch. Biochem. Biophys.*, pp. 1-3.
- Goertz, A., Zuehlke, S., Spiteller, M., Steiner, U., Dehne, H.W., Waalwijk, C., de Vries, I. and Oerke, E.C. (2010) 'Fusarium species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany.', *Eur. J. Plant Pathol.*, pp. 101-111.
- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Hall, A.J. and Wild, C.P. (2002) 'Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study.', *B.M.J.*, pp. 20-21.
- Gourama, H. and Bullerman, L.B. (1995) 'Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review', *J. Food Prot.*, pp. 1395-1404.

- Greene, D.M., Azcona-Olivera, J.I., Murtha, J.M. and Pestka, J.J. (1995) 'Effects of dihydrotestosterone and estradiol on experimental IgA nephropathy induced by vomitoxin.', *Fund. Appl. Toxicol.*, pp. 107-116.
- Greene, D.M., Azcona-Olivera, J.I. and Pestka, J.J. (1994b) 'Vomitoxin (deoxynivalenol)-induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: dose response and male predilection.', *Toxicology*, pp. 245-260.
- Greene, D.M., Bondy, G.S., Azcona-Olivera, J.I. and Pestka, J.J. (1994a) 'Role of gender and strain in vomitoxin-induced dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the mouse.', *J. Toxicol. Envir. Hlth.*, pp. 37-50.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E. and Elissalde, M.H. (1994) 'Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing borrows from aflatoxicosis', *L. Vet. Diag. Invest.*, pp. 88-92.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Elissalde, M.H. and Huff, W.E. (1991) 'Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate.', *Am. J. Vet. Res.*, pp. 152-156.
- Hocking, A.D., Holds, K. and Tobin, N.F. (1998) *Aust. Vet. J.*, p. 82.
- Hope, R., Aldred, D. and Magan, N. (2005) 'Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain.', *Lett. Appl. Microbiol.*, pp. 295-300.
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M. (2001) 'Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals.', *Toxicology*, pp. 101-134.
- Huwig, A., Freimud, S., Kappeli, O. and Dutler, H. (2001) 'Mycotoxin detoxification of animal feed by different absorbents.', *Toxicol. Lett.*, pp. 179-188.
- IARC, I.A.f.R.o.C. (1993a) 'Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.', *IARC*.
- IARC, I.A.f.R.o.C. (1993b) 'Toxins derived from *Fusarium graminearum*: zearalenol, nivalenol and fusarenone', *X. WHO, IARC, Lyon, France*.
- IARC, I.A.f.R.o.C. (2002) 'Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, nephthalene and styrene.', *IARC*.
- IARC, I.A.f.R.o.C. (2012) 'Chemical agents and related occupations: A review oh human carcinogens', *IARC*.
- Ito, Y., Peterson, S.W., Wicklow, D.T. and Goto, T. (2001) '*Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*.'', *Mycological Res.*, pp. 233-239.

- JECFA, J.F.E.C.o.F.A. (2012) 'Safety evaluation of certain food additives and contaminants.', *WHO/FAO Food Additives*.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Ellis, W.O., Wang, J.S., Phillips, T.D. and Williams, J.H. (2005) 'Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians.', *Int. Immunol.*, pp. 807-814.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Ellis, W.O., Wang, J.S., Phillips, T.D. and Williams, J.H. (2008) 'Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease.', *Clin. Dev. Immunol.*
- Joffe, A.Z. (1986) 'Fusarium Species their Biology and Toxicology', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food*, New York: John Wiley & Sons.
- Jones, B.D. and Toal, M.E. (2003) 'Mycotoxins in food: a UK regulatory perspective', *Aspects Appl. Biol.*, pp. 1-9.
- Jorgensen, K. and Petersen, A. (2002) 'Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs.', *Food Addit. Contam.*, pp. 562-567.
- Kazakevich, Y. and Lofbrutto, R. (2007) *HPLC For Pharmaceutical Scientists*, Wiley-Interscience.
- Krogh, P. (1977) 'Causal association of mycotoxic nephropathy', *Acta Pathol. et Microbiol. Scand.*, pp. 1S-28S.
- Krogh, P. (1978) 'Causal association of mycotoxic nephropathy', *Acta. Pathol. et Microbiol. Scand.*, pp. 1S-28S.
- Krogh, P., Hald, B., Plestina, R. and Ceovic, S. (1977) 'Balkan (endemic) nephropathy and foodborne ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs.', *Acta Pathol. Microbiol. Scand.B.*, pp. 238-240.
- Kuiper-Goodman, T. (2004) 'Risk assessment and risk management of mycotoxins in food', in N., M. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food Detection and Control.*, Cambridge: Woodhead Publishing.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W. and Hesseltine, C.W. (1987) 'Aspergillus nomius, a new aflatoxin-producing species related to Aspergillus flavus and Aspergillus tamarii.', *Antonie van Leeuwenhoek*, pp. 147-158.
- Landschoot, S., Waegeman, W., Audenaert, K., Vandepitte, J., Beatens, J.M., De Baets, B. and Haesaert, G. (2012) 'An empirical analysis of explanatory variables affecting Fusarium head blight infection and deoxynivalenol content in wheat.', *J. Plant Pathol.*, pp. 135-147.
- Lanza, G.M., Washburn, K.W. and Wyatt, R.D. (1980) 'Variation with age in response of broilers to aflatoxin', *Poult. Sci.*, pp. 282-288.

- Lemmens, M., Haim, K., Lew, H. and Ruckenbauer, P. (2004) 'The effect of nitrogen fertilization on Fusarium head blight development and deoxynivalenol contamination in wheat.', *L. Phytopathol.*, pp. 1-8.
- Lindsay, S. and Barnes, J. (1992) *High Performance Liquid Chromatography.*, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons.
- Logrieco, A., Moretti, A., Fornelli, F., Fogliano, V., Ritieni, A., Caiaffa, M.F., Randazzo, G., Bottalico, A. and Macchia, L. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 3378.
- Long, T. (1997) 'Fate of patulin in fermentation products.', *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (UK)*.
- Lutz, M.P., Feichtinger, G., Defago, G. and Duffy, B. (2003) 'Mycotoxigenic Fusarium and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1.', *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 3077-3084.
- Magan, N., Aldred, D., Mylona, K. and Lambert, R.J.W. (2010) 'Limiting mycotoxins in stored wheat.', *Food Add. Contam.*, pp. 644-650.
- Mahdari, R., Nikniaz, L., Arefhosseini, S.R. and Vahed, J.M. (2010) 'Determination of aflatoxin M1 in breast milk samples in Tabriz-Iran', *Matern. Child Health J.*, pp. 141-145.
- Manetti, C., Fogliano, V., Ritieni, A., Santini, A., Randazzo, G., Logrieco, A., Mannina, L. and Segre, A.L. (1995) *Struct. Chem.*, p. 183.
- Manning, R.O. and Wyatt, R.D. (1984) 'Effect of cold acclimation of broiler chicks on susceptibility to acute aflatoxicosis.', *Poult. Sci.*, p. 63.
- Mantle, P.G. and Penny, R.H.C. (1981) *Vet. Annu.*
- Marasas, W.F.O. (1995) 'Fumonisin: their implications for human and animal health.', *Nat. Toxins* 3, pp. 193-198.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. (1984b) 'Toxigenic Fusarium Species: Identity and Mycotoxicology.', *The Pennsylvania State University Press*.
- Marasas, W.F., Gelderblom, W.C.A., G.S., S. and Vismer, H.F. (2008) 'Mycotoxins: a global problem', *Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*, pp. 29-39.
- Marin, S., Magan, N., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2004) 'Fumonisin-producing strains fusarium: a review of their ecophysiology.', *J. Food Protect.*, pp. 1792-1805.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. and Sanchis, V. (2013) 'Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment', *Food and Chemical Toxicology*, pp. 218-237.



- Marin, S., Sanchis, V. and Magan, N. (1995) 'Water activity, temperature and pH. Effects on growth of fusarium moniforme and fusarium proliferatum isolates from maize', *Can. J. Microbiol.*, pp. 1063-1070.
- Marin, D.E., Taranu, I., Bunaciu, R.P., Pascale, F., Tudor, D.S., Avram, N., Sacra, M., Curen, I., Criste, R.D., Suta, V. and Oswald, I.P. (2002) 'Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin', *J. Anim. Sci.*, pp. 1250-1257.
- Marquardt, R.R. (1996) *Anim. Feed Sci. Technol.*
- Marques, M.F., Martins, H.M., Costa, J.M. and Bernardo, F. (2008) 'Co-occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in crops marketed in Portugal.', *Food Addit. Contam. Part B*, pp. 130-133.
- Marroquín-Cardona, A.G., Johnson, N.M., Phillips, T.D. and Hayes, A.W. (2014) 'Mycotoxins in a changing global environment – A review', *Food and Chemical Toxicology*, pp. 220-230.
- Meissonnier, G.M., Pinton, P., Laffitte, J., Cossalter, A., Gong, Y.Y., Wild, C.P., Bertin, G., Galtier, P. and Oswald, I.P. (2008) 'Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression.', *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, pp. 142-149.
- Merhej, J., Richard-Forget, F. and Barreau, C. (2011) 'Regulation of trichothecene biosynthesis in Fusarium:Recent advances and new insights.', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, pp. 519-528.
- Miller, J.D., Apsimon, J.W., Blackwell, B.A., Greenhalgh, R. and Taylor, A. (2001) 'Deoxynivalenol: a 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance.', in Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L. and Burgess, L.W. *Fusarium*, APS.
- Missmer, S.A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, J.A.H., Rothman, K.J. and Hendricks, K.A. (2006) 'Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border.', *Environ. Health Perspect.*, pp. 237-241.
- Moldoveanu, S. and David, V. (2012) *Essentials in Modern HPLC Separations*, Elsevier.
- Morales, H., Sanchis, V., Rovira, A., Ramos, A.J. and Marin, S. (2007) 'Patulin accumulation in apples during postharvest: effect of controlled atmosphere storage and fungicide treatments.', *Food Control*, pp. 1443-1448.
- Moreno, O.J. and M.S., K. (1999) 'Aflatoxins in maize: The problem and genetic solutions', *Plant Breed*, pp. 1-16.

- Muhovski, Y., Batoko, H. and Jacquemin, J.M. (2012) 'Identification, characterization and mapping of differentially expressed genes in a winter cultivar (Centenaire) resistant to Fusarium graminearum infection.', *Mol. Biol. Reports.*, pp. 9583-9600.
- Munkvold, G.P., Stahr, H.M., Logrieco, A., Moretti, A. and Ritieni, A. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 3923.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E. and Plattner, R.D. (1993) 'Fumonisin, mycotoxins produced by Fusarium species: biology, chemistry and significance', *Ann. Rev. Phytopath.*, pp. 233-252.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. (1983) 'Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification.', *The Pennsylvania State University Press*.
- Nicholson, P., Centre, J.I. and U.K. (2004) 'Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants.', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in food: Detection and control*, Boca Baton Boston: CRC Press.
- Nicholson, P., Centre, J.I. and U.K. (2004) 'Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in food*.
- Niyo, K.A., Richard, J.L., Niyo, Y. and Tiffany, L.H. (1988a) 'Effects of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of Aspergillus fumigatus conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic, serum biochemical, and pathologic changes in rabbits.', *Am. J. Vet. Res.*, pp. 1766-1773.
- Niyo, K.A., Richard, J.L., Niyo, Y. and Tiffany, L.H. (1988b) 'Pathologic, hematologic, serologic, and mycologic changes in rabbits given T-2 mycotoxin orally and exposed to aerosols of Aspergillus fumigatus conidia.', *Am. J. Vet. Res.*, pp. 2151-2160.
- O' Brian, G.R., Fakhoury, A.M. and Payne, G.A. (2003) 'Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus.', *Fun. Gen. Biol.*, pp. 118-127.
- O' Brien, E. and Dietrich, D.R. (2005) 'Ochratoxin A: the continuing enigma.', *Toxicol.*, pp. 33-60.
- Ominski, K.H., Marquardt, R.R., Sinha, R.N. and Adramson, D. (1994) 'Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi.', in Miller, J.D. and Trenholm, H.L. *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*, Eagan Press.
- Pan, D., Graneri, J. and Bettucci, L. (2009) 'Correlation of rainfall and levels of deoxynivalenol in wheat from Uruguay, 1997-2003', *Food Additives and Contaminants: Part B*, pp. 162-165.
- Park, D.L., Lee, L.S. and Pohland, A.E. (1988) 'Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation.', *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, pp. 685-703.

Paul, P.A., Lipps, P.E. and Madden, L.V. (2005) 'Relationship between visual estimates of fusarium head blight intensity and deoxynivalenol accumulation in harvest wheat grain: A meta-analysis.', *Phytopathology.*, pp. 1225-1236.

Payne, G.A. (1998) 'Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops', in Sinha, K.K. and Bhatnagar, D. *Mycotoxins in Agriculture and Food Safety*, New York: Marcel Dekker, Inc.

Persson, E.C., Sewram, V., Evans, A.A., London, W.T., Volkwyn, Y., Shen, Y.J., Van Zyl, J.H., Dawsay, S.M., Qiao, Y.L., McGlynn, K.A. and Abnet, C.C. (2012) 'Fumonisin B1 and risk of hepatocellular carcinoma in two Chinese cohorts.', *Food chem. Toxicol.*, pp. 679-683.

Pestka, G.S. (2000) 'Immunomodulation by fungal toxins', *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, pp. 109-143.

Pestka, J.J. (2010) 'Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol.', *World Mycotoxin*, pp. 323-347.

Pestka, J.J. and Casale, W. (1989) 'Naturally occurring fungal toxins.', in Simmons, M.S. and Nriagu, J. *Food Contamination from Environmental Sources.*, John Wiley and Sons.

Pestka, J.J., Lin, W.S. and Miller, E.R. (1987a) 'Emetic activity of the trichothecene 15-acetyldeoxynivalenol in swine.', *Food Chem. Toxicol.*, pp. 855-858.

Pettersson, H. (2000) 'Department of Animal Nutrition and Management at the Agricultural University.'

Pfohl-Leskowicz, A. and Manderville, R.A. (2007) 'Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans', *Mol. Nutr. Food Res.*, pp. 61-99.

Pfohl-Leskowicz, A., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. and Castegnaro, M. (2002) 'Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins.', *Food Additives and Contaminants*, pp. 282-302.

Pohland, A.E., Nesheim, S. and Friedman, L. (1992) 'Ochratoxin A, a review', *Pure Appl. Chem.*, pp. 1029-1046.

Poppenberger, B., Berthiller, F., Lucyshyn, D., Sieberer, T., Schuhmacher, R., Krska, R., Kuchler, K., Glossl, J., Luschnig, C. and Adam, G. (2003) 'Detoxification of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol by a UDP-glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*.', *J. Biol. Chem.*

Prelusky, D.B. and Trenholm, H.L. (1993) 'The efficacy of various classes of anti-emetics in preventing deoxynivalenol-induced vomitoxigenesis in swine.', *Natural Toxins.*, pp. 296-302.

Puls, R. and Ladyman, E. (1988) *Can. Vet. J.*, p. 569.

- Qian, G.S., Ross, R.K., Yu, M.C., Yuan, J.M., Gao, Y.T., Henderson, B.E., Wogan, G.N. and Groopman, J.D. (1994) 'A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China.', *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, pp. 3-10.
- Qian, G., Tang, L., Guo, X., Wang, F., Massey, M.E., Su, J., Guo, T.L., Williams, J.H., Phillips, T.D. and Wang, J.S. (2013) 'Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male f344 rats.', *J. Appl. Toxicol.*
- Ramirez, M.L., Chulze, S. and Magan, N. (2006) 'Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain.', *Int. J. Food Microbiol.*, pp. 291-296.
- Reha'cek, Z. and Sajdl, P. (1990) 'Ergot alkaloids', *Elsevier Science*.
- Remington, J.P. (2005) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.*, 21<sup>st</sup> edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Van Schalkwyl, D.J. (1998) 'Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei.', *Phytopathology*, pp. 353-357.
- Richard, J.L. (1998) 'Mycotoxins, toxicity and metabolism in animals.', in Van Egmond, H., Brera, C. and Gilbert, J. *A systems approach overview: Mycotoxins and Phytotoxins- Developments in Chemistry.*, Colorado: Toxicology and Food Safety.
- Richard, J.L. (2000) 'Mycotoxins-an overview', pp. 1-48.
- Richard, J.L. (2007) 'Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview.', *Int. J. Food Microbiol.*, pp. 3-10.
- Richardson, K.E., Hagler, W.M. and Mirocha, C.J. (1985) 'Production of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol and  $\beta$ -zearalenol by *Fusarium* spp. in rice culture.', *J. Agric. Food Chem.*, pp. 862-866.
- Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., Scarallo, A., Logrieco, A., Moretti, A., Mannina, L. and Bottalico, A. (1995) *Nat. Toxins*, p. 17.
- Sanchis, V., University of Lleida, S. and Magan, N. (2004) 'Environmental conditions affecting mycotoxins.', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food*, CRC Press.
- Sanders, T.H., Cole, R.J., Blankenship, P.D. and Dorner, J.W. (1993) 'Aflatoxin contamination of peanuts from plants drought stressed in pod or root zones.', *Peanut Sci.*, pp. 5-8.
- Sargeant, K.C.R.B.A.A.R. (1963) 'Chemistry and origin of aflatoxins.', *Chemical Ind. London.*, pp. 53-55.

- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R. and Magan, N. (2011) 'Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species.', *J. R. Soc. Interface.*, pp. 117-126.
- SCOOP (2003) 'Sub-task Zearalenone', in Vidnes, A., Bergsten, C. and Paulsen, B. *Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by population of EU Member States.*, SCOOP European Project.
- Scott, P. (1989) 'The natural occurrence of trichothecines', in Basley, V. *Trichothecines mycotoxins: patho-physiologic effects.*, CRL Press.
- Segal, R., Milo-Goldzweig, A., Joffe, Z. and Yagen, B. (1983) 'Trichothecene-induced hemolysis. 1. The hemolytic activity of T-2 toxin.', *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, pp. 343-349.
- Sewram, V., Nair, J.J., Nieuwoudt, T.W., Leggott, N.L. and Shephard, G.S. (2000) 'Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.', *J. Chromatog.*, pp. 365-374.
- Squire, R.A. (1989) 'Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach', *Science*, pp. 887-891.
- Shapira, R., Jerusalem, T.H.U.o. and Paster, N. (2004) 'Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food.*, The Volcani Center.
- Shepherd, M.J. and Gilbert, J. (1988) 'Long-term storage stability of deoxynivalenol standard reference solutions.', *J. Agric. Food Chem.*, pp. 305-308.
- Simsek, S., Burgess, K., Whitney, K.L., Gu, Y. and Qian, S.Y. (2012) 'Analysis of Deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in wheat.', *Food Control.*, pp. 287-292.
- Sinha, R.N. and Muir, W.E. (1973) 'Grain storage.', *Part of a System, Westport.*
- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A. (2002) *Principles of instrumental Analysis.*
- Smith, J.E., Lewis, C.W., Anderson, J.G. and Solomons, G.L. (1994) 'Mycotoxins in human nutrition and health.', *Science Research and Development.*
- Smith, J.E. and Ross, K. (1991) 'The toxigenic *Aspergilli*.', in Smith, J.E. and Anderson, R.A. *Micotoxins and Animal Foods*, Boca Raton: CRC Press.
- Speijers, G.J.A. (2004) 'Patulin.', in Magan, N. and Olsen, M. *Mycotoxins in Food: Detection and Control.*, Boca Raton: CRC Press.
- Steyn, P.S. and Vlegaar, R. (1985) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*

- Stinson, E.E., Osman, S.F., Huhtanen, C.N. and Bills, D.D. (1978) *Appl. Environ. Microbiol.*, p. 620.
- Suarez, L., Felkner, M., Brender, J.D., Canfield, M., Zhu, H. and Hendricks, K.A. (2012) 'Neural tube defects on the Texas-Mexico border: what we've learned in the 20 years since the Brownsville cluster.', *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, pp. 882-892.
- Suzanne, N.S. (2010) *Food Analysis.*, 4<sup>th</sup> edition, Springer.
- Sweeney, M.J. and Dobson, A.D.W. (n.d) 'Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species', *International Journal of Food Microbiology*, pp. 141-158.
- Tanaka, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U., Sugiera, Y. and Ueno, Y. (1988) 'Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone', *J. Agricult. Food Chem.*, pp. 979-983.
- Thieu, N.Q., Ogle, B. and Pettersson, H. (2008) 'Efficacy of bentonite clay in ameliorating aflatoxicosis in piglets fed aflatoxin contaminated diets.', *Trop. Anim. Health Prod.*, pp. 649-656.
- Thompson, C. and Henke, S.E. (2000) 'Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species.', *Journal of Wildlife Diseases.*, pp. 172-179.
- Thrane, U., Adlerb, A., Clasenc, P.E., Galvanod, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F. and Ritieni, A. (2004) *Int. J. Food Microbiol.*, p. 257.
- Trapp, S.C., Hohn, T.M., McCormik, S. and Jarvis, B.B. (1998) 'Characterization of the gene cluster for biosynthesis of macrocyclic trichothecene in *Myrothecium roridum*.', in Magan, N. and Elson, M. *Mycotoxins in Food*.
- Turner, P.C., Collinson, A.C., Cheung, Y.B., Gong, Y., Hall, A.J., Prentice, A.M. and Wild, C.P. (2007) 'Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants.', *Int. J. Epidemiol.*, pp. 1119-1125.
- Ueno, Y. (1974) 'Mycotoxins: Citreoviridin from *Penicillium citreoviride* Biourge', *Elsevier, New York*.
- Ueno, Y. (1984a) 'Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes.', *Fund. Appl. Toxicol.*, pp. 124-132.
- Van der Merwe, K.J., Steyne, P.S., Fourie, L.F., Scott, D.B. and Theron, J.J. (1965) 'Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*', *Willh. Nature*, pp. 1112-1113.
- Varga, J., Rigo, K., Teren, J. and Mesterhazy, A. (2001) 'Recent advances in ochratoxin reaserch II. Biosynthesis, mode of action and control of ochratoxins.', *Cer. Res. Comm.*, pp. 93-100.

- Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J. and Kozakiewicz, Z. (2003a) 'Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins', *Food Tech. Biotech.*, pp. 29-36.
- Versonder, R.F., Ellis, J.J., Kwolek, W.F. and DeMarini, D.J. (1982) 'Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and NRRL 6101', *Environmental Microbiology*, pp. 967-970.
- Vesonder, R.F., Ciegler, A. and Jensen, A.H. (1973) 'Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn.', *Appl. Microbiol.*, pp. 1008-1010.
- Vesonder, R.F. and Hesseltine, C.W. (1981) 'Vomitoxin: Natural occurrence on cereal grains and significance as a refusal of emetic factor to swine.', *Process Biochem.*, pp. 12-15.
- Vrabcheva, T., Usleber, E., Dietrich, R. and Martlbauer (2000) *J. Agric. Food Chem.*
- Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. (2008) 'Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies.', *International Journal of Food Microbiology.*, pp. 1-12.
- Wagener, R.E., Davis, N.D. and Diener, U.L. (1980) *Appl. Environ. Microbiol.*
- Warth, B., Parich, A., Atehnkeng, J., Bandyopadhyay, R., Schuhmacher, R., Sulyok, M. and Krska, R. (2012) 'Quantitation of Mycotoxins in Food and Feed from Burkina Faso and Mozambique Using a modern LC-MS/MS Multitoxin Method', *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*
- Wegulo, S. (2012) 'Factors influencing deoxinivalenol accumulation in small grain cereals.', *Toxins*, pp. 1157-1180.
- Weston, A. and Brown, R.P. (1997) *HPLC and CE: Principles and Practice.*, Academic Press.
- Wilson, D.M. and Adramson, D. (1992) 'Mycotoxins', in Sauer, D.B. *Storage of cereal Grains and Their Products*, American Association of Cereal Chemists.
- Wilson, D.M. and Payne, G.A. (1994) 'Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops.', in Eaton, D.L. and Groopman, J.D. *The Toxicology of Aflatoxins.*, New York.: Academic Press.
- World Health Organization, I.P.C.S. (1990) 'Trichothecenes In: Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecines, Ergot.', *World Health Organization.*
- Xu, H.X., Annis, S., Linz, J. and Trail, F. (2000) 'Infection and colonization of peanut pods by *Aspergillus parasiticus* and the expression of the aflatoxin biosynthetic gene, nor-1, in infection hyphae.', *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, pp. 185-196.