



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00723

(22) Data de depozit: 26/09/2017

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. 3/2019

(71) Solicitant:
• AGROTEHNIC S.R.L., SAT PĂULEȘTI
NR.1, COM.PĂULEȘTI, PH, RO

(72) Inventatori:
• POPESCU MARIANA, STR. VALEA ROȘIE
NR. 6, BL. 62, SC. C, ET. 1, AP. 35,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;

• LUPU CARMEN, INTR.BÂRSEI NR. 5,
BL. G3, SC. 1, ET. 2, AP. 25, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• CHITORAN NICULINA, PĂULEȘTI NR.13,
COMUNA PĂULEȘTI, PH, RO;
• DUDOIU ROXANA, STR.NADEȘ NR.42A,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **SUPLIMENT NUTRITIV VETERINAR PENTRU DIMINUAREA
CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE LA SUINE, ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment nutritiv veterinar, pentru diminuarea contaminării cu micotoxine a furajelor la suine, și la un procedeu de obținere a acestuia. Suplimentul conform invenției este constituit din 53...58% adsorbant mineral de micotoxine de tip diatomită, 2...3% uleiuri esențiale bioactive cu acțiune antimicrobică, 3...5% izolat proteic din soia, 0,7...0,9% hidroxid de calciu, 0,1...0,2% KOH, 37...39% zer din lapte, opțional arome naturale și coloranți alimentari.

Procedeul conform invenției constă în termohidroliza alcalină a izolatului proteic, imobilizarea oligoelementelor și a uleiurilor volatile în hidrogel, încapsularea miezului uleios în învelișul mineral, prin granulare în pat rotativ, uscarea granulelor și cernerea pe site calibrate pentru ambalare.

Revendicări: 3



SUPLIMENT NUTRITIV VETERINAR PENTRU DIMINUAREA CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE LA SUINE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la un supliment nutritiv veterinar pe bază de uleiuri esențiale și diatomită, cu utilizare pentru nutriția și protecția suinelor împotriva contaminării cu micotoxine și la procedeul de obținere a acestuia.

Micotoxinele, substanțele chimice produse de ciupercile patogene, pot face diferența între profit și pierdere pentru industria zootehnică. Animalele sunt extrem de vulnerabile la micotoxinele prezente în hrana animalelor; așa apar frecvent micotoxicozele - bolile induse de micotoxine. Contaminarea prin micotoxine a hranei pentru animale are ca rezultat pierderi economice însemnate pentru creșterea animalelor la nivel mondial și, în unele cazuri, afectarea sănătății consumatorilor umani din cauza transferului contaminării prin produse lactate, ouă și carne (Andrea Piva, 2007). Principalele ciuperci micotoxigene din cerealele parțial uscate sunt *Penicillium verrucosum*, producătoare de ochratoxină (OTA), *Fusarium graminearum* și *F. sporotrichioides* producătoare de deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV) și toxina T-2 în climatele umede din Europa de Nord. În sudul Europei se întâlnesc: *Aspergillus flavus* producătoare de aflatoxine (AF), *A. ochraceus* - OTA și unele specii de *Fusarium* producătoare de fumonisine (FUM) și trichothecenele DON și NIV (US 8,496,984 B2, 2013).

Micotoxinele au proprietăți carcinogene, mutagene, teratogene, estrogenice, neurotoxice și imunotoxice, reducând performanța, apetitul, greutatea și imunitatea animalelor care le ingeră. De asemenea, provoacă tulburări de reproducere și generează reziduuri în produsele animale care afectează sănătatea umană. Aceste efecte nedorite pot fi prevenite prin controlul contaminării micotoxinelor în produsele agricole utilizate ca și ingrediente furajere, prin bune practici de management (în timpul vegetației, recoltării și depozitării).

Dacă, totuși, micotoxinele nu pot fi evitate, atunci rețeaua modernă de distribuție alimentară trebuie să includă metodologii comerciale pentru a garanta că hrana are un conținut minim de micotoxine. Una dintre strategiile de reducere a expunerii la micotoxine este de a scădea biodisponibilitatea lor prin includerea unor agenți adsorbanti care să oprească patrunderea acestora în sânge și transferul spre organele țintă. Liganzii de micotoxine pot funcționa în trei moduri: prin legarea fizică a



toxinei și a ionilor metalici prin aderență; prin legarea toxinelor prin sarcini electrostatice sau prin *capacitatea de schimb cationic* (Pearce Matt et.al., 2010). Ei pot elimina sursa de toxine prin creșterea permeabilității membranei celulare a fungilor, care sunt cauza producției de micotoxine. Există o serie de lianți pentru micotoxină disponibili comercial și agenți antifungici care s-au dovedit a avea diferite efecte potențiale în reducerea sau eliminarea prezenței toxicității micotoxinelor.

Pare imposibilă eliminarea completă a micotoxinelor din lanțul alimentar animal sau uman, având în vedere că produsele alimentare și precursorii lor pot fi depozitați și transportați de-a lungul unor intervale variabile de timp, fiind supuse umidității atmosferice și diferitelor temperaturi. Există o serie de abordări în vederea reducerii contaminării cu micotoxine în hrana animalelor și acestea implică prevenirea creșterii ciupercilor și prin urmare, formarea micotoxinelor și strategii pentru reducerea sau eliminarea micotoxinelor din produsele contaminate, în special prin aditivi pentru hrana animalelor.

Literatura de specialitate descrie o varietate de metode biologice, fizice, chimice pentru a contracara problema micotoxinelor, dar metode practice și eficiente ca preț pentru detoxifierea micotoxinelor sunt dificil de identificat (Anna Kolossova & Joerg Stroka, 2010). Strategiile de detoxifiere a alimentelor și furajelor contaminate trebuie făcute pentru a reduce sau elimina acțiunile negative ale micotoxinelor, pentru a îmbunătăți siguranța alimentară și pentru a preveni pierderile economice. Cea mai recentă abordare a problemei a fost adăugarea în dieta animalelor a unor aditivi non nutritivi, care sechestrează micotoxinele, reduc absorbția gastro intestinală, evita efectele toxice asupra animalelor și împiedică transferul micotoxinelor în produsele animale (Zaki M.M et al., 2012). Acești agenți de legare utilizați ca aditivi pentru hrana animalelor pot fi obținuți din materiale organice, anorganice sau combinații ale acestora (*Prima Mei Widiyanti, Romsyah Maryam, 2016*). Utilizarea agenților de legare a micotoxinelor este recomandată pentru prevenirea tulburărilor de sănătate a animalelor și diminuarea reziduurilor de micotoxine în produsele animale; adăugați în proporții reduse în hrană, ei diluează sau "leagă" micotoxinele în lumenul intestinal, determinând tranzitul și eliminarea lor din tubul digestiv o dată cu resturile nedigerate, reducându-le semnificativ efectele negative.



Orice procedură de detoxifiere, pentru a reduce impactul toxic și economic al micotoxinelor are nevoie de următoarele criterii de bază: 1) trebuie să distrugă, să inactiveze sau să elimine micotoxinele din alimente și furaje 2) nu trebuie să producă sau să lase reziduuri toxice sau cancerigene în produsele finale 3) nu ar trebui să modifice semnificativ proprietățile nutritive și tehnologice ale produsului 4) trebuie să fie capabil de a distruge sporii ciupercilor și miceliul în scopul de a evita formarea de noi toxine în condiții favorabile 5) trebuie să fie fezabilă din punct de vedere etic și economic (Pearce Matt et al., 2010).

Sunt cunoscute o serie de produse pentru protecția animalelor domestice față de ciupercile patogene sau metaboliții lor toxici. Diatomita este utilizată ca absorbant pentru limitarea efectelor micotoxinelor produse de ciupercile microscopice care se dezvoltă pe cereale și se transmit în hrana animalelor și ulterior în produsele alimentare destinate consumului uman: ouă, lapte, carne și toate derivatele obținute prin procesarea acestora. Există un supliment comercial (DIATOMACEOUS EARTH**), pe baza de scoici fosilizate rămase de la algele unicelulare numite diatomee. Pudra fină absoarbe umezeala și deshidratează prin contact. Poate fi folosit ca aditiv pentru hrana animalelor în concentrație de până la 2% din rația furajera. Îmbunătățirea calității alimentare prin suplimente ecologice ajută reproducerea, fătarea, digestia, creșterea în greutate, rezistența la contaminare cu micotoxine, îmbunătățește starea imunologică (<http://www.ohioearthfood.com/animal-feed-supplements.html>), controlează diverse bacterii, reducând mortalitatea și înlocuind antibioticele sau stimulatorii de creștere. Modul de acțiune al acestor suplimente alimentare este diferit: inhibitor de mucegai pentru furaje cu acțiune preventivă, liant al micotoxinelor, absorbția de umiditate etc. (<http://orbitec.es/feed-additives-feed-ingredients/mold-inhibitor/>). Suplimentele nutritive echilibrate natural ajută la modificarea deficiențelor existente în elementele alimentare majore, fără efect nociv asupra oamenilor, sănătate animală sau mediu.

Este cunoscut faptul că mineralele pe baza de siliciu au proprietăți de adsorbent de micotoxine, dovadă sunt brevete cum ar fi:

US 8.257.774, 2012 descrie un adsorbent de micotoxine care se bazează pe combinația unui silicat organic cu structură amorfă, modificat organic cu dodecilamina care este o amină primară având o catenă de 12 atomi de carbon alifatică, liniară, apolară. Silicatul organic este ales din grupul constând în diatomita,

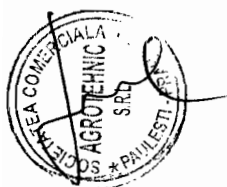


radiolarit, silicoflagelate si bureti spongiosi. Inventia se mai refera si la utilizarea respectivului adsorbent in furaje, pentru adsorbția micotoxinelor precum aflatoxine, zearalenona, ochratoxina A sau fumonisina B1.

Brevetul WO 1991013555 A1 descrie o compoziție furajera solidă uscată în care furajul biodegradabil este contaminat cu o micotoxina și este amestecat cu un agent de inactivare a micotoxinei cuprinzând particule dintr-un mineral filosilicat capabil să inactiveze micotoxinele, particulele fiind acoperite cu un agent de sechestrare într-o cantitate suficientă pentru a spori capacitatea filosilicatlui menționat de a inactiva micotoxina.

În **Brevetul US 8,496,984 B2** s-a semnalat că micotoxinele care predomină în climatele nordice sunt dificil de dezactivat în hrana animalelor prin legare, spre deosebire de micotoxinele predominante în climatele din Sud. Între timp, ambele tipuri de toxine prezintă un factor considerabil de risc pentru sănătatea și performanțele animalelor agricole. Brevetul descrie o metodă de adsorbție și de transformare într-un mod inofensiv pentru animal pentru o gamă extinsă de micotoxine nordice și sudice găsite în hrana contaminată. Conform invenției, o combinație de material vegetal ligno-polizaharidic modificat și componente tradiționale de legare a micotoxinei este adăugată în furajele animalelor agricole și de companie în cantitate suficientă pentru a diminua efectele negative ale ambelor tipuri de micotoxine prezente.

La nivel mondial si national au fost studiate o serie de plante medicinale aromatice si condimentare cunoscute si sub denumirea de aditivi botanici pentru a li se testa potentialul biostimulator atunci cand sunt utilizate ca supliment în hrana animalelor. Aceste plante au fost administrate sub diferite forme respectiv: pudra, extracte apoase sau uleioase, uleiuri esentiale. Toate aceste plante, prin continutul lor în substante bioactive, actioneaza fie direct asupra microorganismelor patogene (bacterii, virusuri, fungi) si asupra unor functii fiziologice hormonale si imunitare sau a metabolismului, fie indirect în cadrul unor procese biologice pe care le modifica favorabil, avand influenta pozitiva asupra sanatatii întregului organism. Actiunile lor sunt multiple - antiseptice, antioxidante, antiinflamatoare, actiune stomahica, eupeptica, carminativa, coleretica, stimuloare hepatocitara, antimitotica, imunomodulatoare, endocrinoreglatoare, antihelmintica, stimuloare a apetitului, cu o influenta pozitiva asupra sistemului nervos prin inlaturarea efectelor stresului. S-au



utilizat următoarele extracte vegetale: extract uleios de cimbru 0,1% L1, extract uleios de salvie 0,1 % L2, ulei esențial de rozmarin 0,05 % L3 și oregano pudra 0,5% (Boisteanu, 2005).

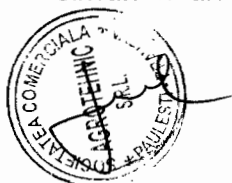
Cererea de brevet **WO 2015072872** dezvăluie o compoziție alcătuită din 42,1 părți de esteri etilici ai acizilor grași din ulei de in, 15 părți lecitină, 13,7 părți alcool etilic, 6 părți ulei esențial din muguri florali de *Syzygium aromaticum*, 6 părți ulei esențial din flori de *Ageratum houstonianum*, 5,6 părți săruri de potasiu ale acizi grași exprimate ca oleat, 3,9 părți glicerol, 3,3 părți trigliceride, 3 părți maltol, 0,5 părți apă, diferența până la 100 părți fiind substanțe nesaponificabile și săruri, destinată limitării formării de micotoxine în diferite componente ale lanțului alimentar.

Zhaikai Zeng și col., 2015 au rezumat cunoștințele actuale privind posibilele moduri de acțiune și factorii nutriționali implicați în utilizarea uleiurilor esențiale pentru porcine și păsări de curte. Uleiurile esențiale au atras recent un interes sporit ca aditivi pentru hrana porcinelor și a păsărilor de curte, eventual înlocuind utilizarea promotorilor de creștere antibiotici care au fost interzisi în Uniunea Europeană începând cu 2006. În general, uleiurile esențiale sporesc producerea de secreții digestive și absorbția nutrienților, reduc stresul patogenilor din în intestin, exercită proprietăți antioxidante și întăresc imunitatea animalului, ceea ce ajută la explicarea performanțelor sporite observate la porcine și păsări de curte.

Cu toate acestea, mecanismele implicate în cauza acestei promovări a creșterii sunt departe de a fi elucidate, din moment ce lipsesc datele privind ecosistemul intestinal complex, funcția intestinală, starea oxidativă in vivo și sistemul imunitar. În plus, sunt disponibile informații limitate privind interacțiunea dintre uleiurile esențiale și ingredientele din furaje sau alți aditivi pentru hrana animalelor (în special pro- și prebiotice și acizi organici).

Utilizările uleiurilor esențiale în domeniul medical sunt limitate din cauza greutăților întâmpinate în procesele de standardizare datorate variației de compoziție impusă de condițiile agro-meteorologice unde sunt cultivate plantele. Această variație în compoziție a extractelor de uleiuri vegetale din plante reprezintă un avantaj în utilizarea lor ca fungistatic, deoarece este redus fenomenul apariției de organisme dăunătoare imune la aceste produse.

Nu au fost descrise până în prezent produse sau compoziții care să asigure simultan un aport nutritiv pentru organismul animal și protecția împotriva agenților



patogeni (toxigeni) transferați din câmp în depozite în momentul recoltării și apoi în furaje.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui produs natural care să asigure simultan un aport nutritiv organomineral și reducerea efectelor nocive ale micotoxinelor din hrana animalelor.

Obiectul principal al invenției este un aditiv pentru hrana animalelor care elimină efectele adverse ale micotoxinelor care sunt prezente în furaj, în special ochratoxina, fără a promova efecte secundare nedorite la animale, cum ar fi pierderea în greutate. De asemenea, un obiectiv al prezentei invenții este de a propune o metodă de prevenire a efectelor ingerării de micotoxină (aflatoxină) la animale, în special la păsări de curte și la porcine, prin administrarea concomitentă a unor cantități minime din acești aditivi cu furaje normale pentru animale. Un alt obiect al acestei invenții este de a descrie un procedeu prin care produsul să se obțină printr-o tehnologie simplă, curată de tip "chimie verde", fără utilizare de solvenți chimici de sinteză și fără eliberare în ambient de noxe, deșeuri sau ape uzate tehnologic.

Produsul conform invenției este constituit din 53....58% adsorbant mineral de tipul diatomitei, 2....3% uleiuri esențiale cu acțiune antimicotică, 3....5% izolat proteic din soia, 0,7...0,9% $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 0,1...0,2% KOH, 37....38% zer din lapte, opțional – arome natural și coloranți alimentari.

Uleiurile esențiale volatile vor fi selectate pe baza testelor biologice insectofungicide și bactericide specifice bolilor și dăunătorilor de depozit, recunoscute fiind uleiurile esențiale de oregano, cimbru, cimbrișor, salvie, busuioc, rozmarin, cuișoare, scorțișoară, coriandru, pin. Pentru obținerea unui spectru cât mai larg de acțiune biologică, se pot combina unul sau mai multe uleiuri esențiale în aceeași formulă de condiționare.

Diatomita folosită are următoarele caracteristici: densitate relativă de 320-430 kg/m^3 , o suprafață specifică cuprinsă între 10 și 30 m^2/g , o duritate Mohs cuprinsă între 4,5 și 5 și o capacitate de absorbție a lichidelor de cel puțin 150%. Orice vehicul organomineral cu caracteristici similare se poate utiliza pentru realizarea produsului natural de uz veterinar cu acțiune antimicotoxigenă.

Procedeu de obținere a suplimentului nutritiv antimicotoxigen este realizat conform invenției în următoarele etape: a) hidroliza izolatului proteic de soia; b)



imobilizarea uleiului volatil în hidrogelul proteic prin coacervare la rece; c) încapsularea miezului uleios în înveliș organomineral prin granulare în pat rotativ; d) uscarea granulelor la aer în condiții de presiune și temperatură ambiantă; e) cernerea granulelor pe site calibrate în vederea ambalării.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Acțiunea sinergică a diatomitei cu uleiurile esențiale, care-și exercită acțiunea antimicotogenică și fungicidă concomitent cu fortificarea organismului prin aport proteic (aminoacizi și peptide) și organomineral (chelați de calciu, potasiu organic);
- Granulele fine rezultate au o aderență superioară altor aditivi furajeri datorită porozității diatomitei, miros plăcut vegetal și culoare crem gălbui, atractive pentru animalul furajat;
- Compoziția este bazată exclusiv pe ingrediente naturale netoxice, ieftine și accesibile;
- Procedul de obținere implică o tehnologie simplă, curată, eficientă energetic și lipsită de ape reziduale sau deșeuri tehnologice, ușor de ridicat la scară.

Se dau în continuare exemple nelimitative de realizare a invenției.

EXEMPLUL 1

Intr-o instalație de laborator compusă din balon de sticlă cu capacitate de 1 litru, prevăzut cu refrigerent ascendent, agitator mecanic, termometru și pîlnie de picurare, s-au introdus 500 ml zer acid adus la pH 7,5 cu 0,69 g KOH, s-au amestecat și omogenizat la temperature camerei cu 50 grame izolat proteic din soia și s-a lăsat 10 ore la umectat. Amestecul s-a agitat timp de 5 ore la temperaturi de 50-53°C, după decantare separându-se 2 faze: un strat superior lichid cu pH 7,5 și un strat inferior păstos. Stratul lichid se îndepărtează, obținându-se 267 grame produs de consistența smântânii, de culoare crem.

EXEMPLUL 2

Intr-un balon de sulfonare s-au agitat 500 ml zer acid cu 20 grame var calcic hidratat și 50 grame izolat proteic din soia, la temperature camerei, pînă la omogenizare, apoi amestecul s-a încălzit cu agitare încă 3,5 ore, la temperatura de



maxim 55°C. Produsul omogen s-a combinat cu pasta obținută la Exemplul I iar peste amestecul obținut (837 g) s-a adăugat cu picătura 50 grame ulei esențial de oregano Solaris, timp de 1 oră, sub agitare, la temperatură ambiantă. Emulsia omogenă s-a ajustat la pH 7 cu 1,5 grame KOH și s-a formulat într-un granulator cu 1500 grame diatomită Adamclisi Fabrica fin măcinată, obținându-se 2,21 kg produs granulat umed. S-a uscat în atmosferă de aer ambiental în tăvițe de carton, obținându-se 1670 grame produs uscat care s-a măcinat și ambalat în pungi de plastic.

EXEMPLUL 3

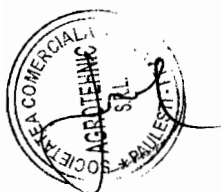
Produs obținut ca în exemplul II cu deosebirea că uleiul esențial de oregano se înlocuiește cu un amestec de uleiuri esențiale cu acțiune antimicrobică, iar zerul lichid cu concentrat proteic din zer suspendat în stratul lichid îndepărtat în exemplul I.

EXEMPLUL 4

Evaluarea efectului detoxifiant al suplimentului nutritiv veterinar a fost realizată în biobaza IBNA (Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Biologie și Nutriție Animală Balotești) prin studii *in vivo* pe purcei după înțărare, hrăniți cu furaj contaminat cu ochratoxină. S-au selectat 18 purcei hibrizi TOPIG intarcati [(Landrace × Large White) × (Duroc × Pietrain)]/6 purcei/lot cu o greutate medie inițială de 11,69 kg, pe o perioadă de trei săptămâni. Purceii au fost aclimatizați timp de trei zile înainte de a fi utilizați în protocolul experimental. Animalele au fost repartizate în trei loturi :

- Martor (M) - nutret combinat martor (reteta IBNA-NC-02);
- Experimental 1 (ochratoxina A–OTA) - nutret combinat contaminat cu 200 µg/kg OTA,
- Experimental 2 (OTA+supliment nutritiv-SN) - nutret combinat contaminat cu ochratoxina A 200 µg/kg si supliment nutritiv 1%. Suplimentul nutritiv a fost furnizat de ICECHIM Bucuresti obținut sub forma de pulbere (exemplul 2) și a fost inclus în nutretul combinat pentru lotul OTA+SN, în proporție de 1%, conform recomandărilor producătorului.

Purceii au fost hrăniți cu un nutret combinat fabricat în IBNA după o



reteta proprie pentru porci intarcati (NC-02) care a indeplinit necesarul de substante nutritive esentiale pentru aceasta categorie, NRC 1988 (Tabelul 1).

Animalele au fost cazate in 3 boxe corespunzatoare fiecarui tratament, ceea ce a permis masurarea exacta a cantitatii de hrana ingerata si a resturilor pentru fiecare tratament. Accesul animalelor la hrana si apa a fost *ad libitum*.

Tabel 1. Structura nutret combinat (dieta de hrana de baza)

Ingrediente	Cantitate (kg)
Porumb	53,31
Grau	15,00
Srot floarea soarelui	8,00
Srot soia	3,00
Inlocuitor lapte	5,00
Gluten	2,00
Full fat soia	9,00
Fosfat monocalcic	1,30
Creta furajera	1,60
Metionina	0,10
Lizina	0,40
Sare	0,20
Zoofort P1+2	1,00
Premix colina	0,09
TOTAL	100

Pentru contaminarea hranei cu ochratoxina s-a folosit toxina pura (50 mg OTA) (Fermentek, Israel), care a fost diluata in DMSO (1mL) si incorporata intr-o prima etapa in faina de porumb ca suport. Acest pre-amestec a fost apoi mixat impreuna cu celelalte ingrediente in nutretul combinat pentru o concentratie finala de 200 µg OTA/kg nutret.

Concentratia de OTA in nutretul combinat a fost determinată prin ELISA si HPLC si a fost de 2.3 µg/kg pentru lotul martor, 204 µg/kg pentru lotul OTA si de 205 µg/kg pentru lotul OTA+SN. Concentratia celorlalte micotoxine analizate (AF, DON,



ZEA) a fost foarte mica si apropiata de limita inferioara de detectie a kit-urilor ELISA (0ppb AF; 0.1ppm DON; 6 ppb ZEA) (Veratox, Neogen) (Tab. 2).

Tabel 2. Continutul in ochratoxina al probelor de furaj cu contaminare artificiala

	Proba	Ochratoxina ($\mu\text{g/kg}$ furaj)
1	Control	2,3
2	Proba furaj cu OTA -200 ppm ($\mu\text{g/kg}$)	204
3	Proba furaj cu OTA+SN 200 ppm ($\mu\text{g/kg}$)	205

Furajul contaminat experimental a fost administrat purceilor pe o durata de trei saptamani. La inceputul experimentului, mijlocul (dupa 10 zile) si sfarsitul perioadei experimentale (21 zile) au fost recoltate probe de sange pentru analiza efectului toxinei si produsului natural asupra parametrilor biochimici, markeri ai statusului general de sanatate si ai raspunsului de aparare imuna. La sfarsitul experimentului animalele au fost cantarite si ulterior sacrificate pentru recoltarea rinichilor. Observatiile anatomopatologice efectuate la sacrificarea animalelor au pus in evidenta un aspect normal al acestora fara modificari induse de tratamente.

Efectul suplimentului nutritiv si al contaminarii cu OTA asupra starii de sanatate generala a animalelor a fost evaluat prin determinarea unor parametri biochimici sanguini care reflecta influenta asupra metabolismului glucidic, lipidic, proteic si mineral, precum si foarte important asupra metabolismului hepatic (functiile hepatice). Concentratiile plasmatiche de glucoza, colesterol, trigliceride, proteina totala, albumina, bilirubina totala, creatinina, uree, fosfor, calciu, magneziu, fier, glucoza si concentratii de alanin aminotransferaza (ALAT), aspartat aminotransferaza (ASAT), alcalin fosfataza (AP), gama glutamil transferaza (GGT), au fost determinate pe un analizor BS-130 Chemistry (Bio-Medical Electronics Co., LTD, China).

Pentru evaluarea efectului OTA si al SN asupra raspunsului imun prin anticorpi al animalelor a fost determinata sinteza de anticorpi IgM care sunt implicati in realizarea raspunsului imun primar al organismului. Concentratia de IgM ca fost analizata din plasma animalelor utilizand un kit ELISA (Bethyl). Plasma a fost diluata 1/6000 in tampon Tris salin si procesata conform recomandarilor fabricantului.

Absorbanta a fost citita la 450 nm utilizand un cititor de microplaci (SUNRISE TECAN,



Austria). Un ser de porc cu concentratie cunoscuta de IgM a fost utilizat ca standard si rezultatele sunt exprimate in mg imunoglobulina/ml plasma.

Monoxidul de azot reprezinta un alt indicator important al raspunsului imun, fiind un marker important al inflamatiei. Asa cum se observa din tabelul 15, la sfarsitul experimentului atat OTA, cat si OTA + SN au determinat o crestere semnificativa a sintezei de NO. Evaluarea concentratiei de monoxid de azot în plasmă a fost făcută utilizând reacția Griess, pe baza transformării NO₂- in compuși azo-, în prezența sulfanil amidei și naftiletlen-diamidă.

Rezultatele testelor biologice preliminare au evidențiat faptul că hrana contaminata cu OTA a dus la scaderea performantelor zootehnice ale purceilor comparativ cu purceii control. Administrarea suplimentului nutritiv purceilor care au primit hrana contaminata cu OTA, nu a imbunatatit performantele de crestere ale animalelor (greutatea animalelor, sporul de greutate) pe durata testului.

In ceea ce priveste efectul asupra statului de sanatate, OTA a determinat o scadere semnificativa a concentratiei de fosfor si o crestere a concentratiei de bilirubina in plasma, dupa 10 zile de administrare a tratamentului. Acesti parametri au fost reabilitati dupa administrarea suplimentului nutritiv. De asemenea, la ambele loturi experimentale (OTA si OTA+SN) a fost remarcata o crestere semnificativa a concentratiei de IgM, atat dupa recoltarea intermediara cat si dupa cea finala.

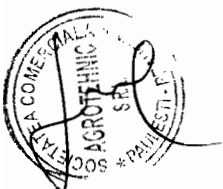
Pentru evaluarea efectului ochratoxinei (OTA) si al suplimentului natural (SN) asupra raspunsului imun prin anticorpi dezvoltat de purceii hraniti cu furaj control sau furaj experimental a fost determinata sinteza de imunoglobulina A, cel mai important anticorp implicat in apararea de la nivelul mucoaselor si de imunoglobulina G, componenta majora a raspunsului imun umoral sintetizat dupa a doua expunere la antigene bacteriene, virale, fungice, etc si care asigura imunitatea de lunga durata (raspunsul imun secundar). Dupa 10 zile de experiment, la recoltarea intermediara, OTA a determinat o scadere semnificativa a sintezei de IgA (-36.7%) comparativ cu lotul control, iar adaosul de produs antimicotoxic a produs o usoara tendinta de contracarare prin cresterea concentratiei de anticorpi IgA (+15,9%) fata de purceii intoxicati cu OTA.

Dupa primele zece zile de experiment (recoltare intermediara), OTA nu a afectat concentratia de IgG in plasma purceilor care au fost intoxicati. Adosul de



supliment natural a crescut in schimb nivelul de IgG cu 29,3%, ceea ce sugereaza ca acesta poate stimula capacitatea organismului animal de a se apara.

In concluzie, se poate spune ca suplimentul nutritiv a fost eficient in stimularea sintezei de IgG, anticorpul care asigura raspunsul imun de lunga durata, crescand rezistenta organismului la infectii. Sunt necesare experimente suplimentare pentru testarea si investigarea pe termen mai lung a efectului tratamentului cu suplimentul nutritiv antimicotoxigen.



REVENDICĂRI

1. Supliment nutritiv veterinar pentru diminuarea contaminării cu micotoxine a furajelor pentru suine, **caracterizat prin aceea că** este constituit din 53....58% adsorbant mineral, 2....3% uleiuri esențiale cu acțiune antimicotică, 3....5% izolat proteic din soia, 0,7...0,9% Ca(OH)_2 , 0,1...0,2% KOH, 37....38% zer din lapte, opțional - arome naturale și coloranți alimentari.

2. Produs conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** adsorbantul de micotoxine este reprezentat de un vehicul mineral de tipul diatomitei, singur sau în combinație cu pereți celulari de drojdii de la fermentația vinului sau berii, zerul din lapte poate fi adăugat ca atare, hidrogel concentrat sau praf atomizat iar uleiul esențial bioactiv este reprezentat de unul sau mai multe uleiuri volatile cu proprietăți antimicotice recunoscute cum ar fi cimbru, cimbrisor, busuioc, rozmarin, oregano, salvie, scorțișoară, coriandru, pelin, cuișoare.

3. Procedeu de obținere a produsului conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** este constituit din următoarele etape principale: a) termohidroliza alcalină a izolatului proteic; b) imobilizarea oligoelementelor și a uleiurilor volatile în hidrogel; c) încapsularea miezului uleios în înveliș (organo)mineral prin granulare în pat rotativ; d) uscarea granulelor la aer în condiții de presiune și temperatură ambiantă; e) cernerea granulelor pe site calibrate în vederea ambalării.

