



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00689**

(22) Data de depozit: **02/11/2020**

(41) Data publicării cererii:
29/04/2021 BOPI nr. **4/2021**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU BIOLOGIE ȘI
NUTRIȚIE ANIMALĂ BALOTEȘTI -
INCDBNA BALOTEȘTI,
CALEA BUCUREȘTI, NR.1, BALOTEȘTI, IF,
RO**

(72) Inventatori:
• **MARIN DANIELA ELIZA,
PRELUNGIREA GHENCEA, NR.26, BL.M3,
SC.B, ET.1, AP.71, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **ȚĂRANU IONELIA, STR.IOVIȚĂ NR.10,
BL.P 13 A, SC.1, ET.1, AP.5, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **PISTOL GINA CECILIA,
STR. SOLDAT VASILE CROITORU, NR.7,
BL.4, SC.4, ET.6, AP.194, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GRAS MIHAIL ALEXANDRU,
STR.NICOLAE FILIMON, NR.59, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **HĂBEANU MIHAELA,
STR. REZERVELOR, NR.66B, AP.76, ET.4,
LOCALITATEA ROȘU, COMUNA CHIAJNA,
IF, RO**

(54) **REȚETĂ FURAJERĂ DESTINATĂ REDUCERII CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE LA PURCEI ÎNȚĂRCAȚI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție furajeră utilizată ca hrană pentru purcei după înțărcare care determină reducerea efectelor toxice produse de hrana contaminată cu micotoxine din genul *Aspergillus*. Compoziția, conform invenției, este constituită în procente masice din 5% amestec în părți egale de șrot de semințe de struguri și șrot de cătină inclus în nutreț combinat convențional pentru purcei după înțărcare, având un conținut de 88,95% substanță uscată, 17,19% proteină brută, 2,35% grăsime brută, 4,79% celuloză brută,

0,88% calciu, 0,44% fosfor, 1,18 mg/g polifenoli de tip epicatechină, acizi grași polinesaturați de tip acid oleic (27,96% g grăsime) și linoleic (52,21% g grăsime), precum și acizi organici de tip acid oxalic (0,62 mg/g), acid citric (6,33 mg/g) și acid tartric (4,10 mg/g), cu efect de reducere a concentrației de ochratoxina A în organe: în ficat cu 72% și în rinichi cu 91,3%.

Revendicări: 2



REȚETĂ FURAJERĂ DESTINATĂ REDUCERII CONTAMINĂRII CU MICOTOXINE LA PURCEII ÎNTĂRCAȚI

Domeniul tehnic la care se referă invenția: Zootehnie

Invenția se referă la o rețetă furajeră nouă care include subproduse agro-industriale bogate în compuși bioactivi (polifenoli, acizi grași polinesaturați, vitamine, minerale, fibre etc) creată în scopul reducerii efectelor negative ale micotoxinelor la porc.

Siguranța hranei pentru animalele de fermă a devenit o preocupare de o importanță majoră pentru producătorii de furaje, crescătorii de animale, dar și pentru autorități (Finke et al., 2015). Astfel, calitatea materiilor prime furajere trebuie evaluată înainte de utilizarea lor pentru fabricarea hranei destinate animalelor de fermă pentru a asigura atât sănătatea animalelor și a mediului înconjurător cât și o diminuare a riscurilor aferente sănătății publice. Dintre substanțele indezirabile în hrana animalelor de fermă menționate în directiva 2002/32/CE, micotoxinele reprezintă una dintre cele mai importante clase de substanțe toxice care contaminează materiile prime furajere produse de diferite genuri de fungi (mucegaiuri). Micotoxinele pot contamina diferite substraturi agro-alimentare (cereale, leguminoase, fructe, condimente, plantele medicinale etc), dar pot fi prezente și în produse de origine animală (lapte, brânzeturi fermentate, ouă, carne) sub formă de reziduuri provenite de la animale hrănite cu furaje contaminate sau pot rezulta în urma contaminării ulterioare a acestor produse cu micromicete toxinogene. Contaminarea cu mucegaiuri, dezvoltarea acestora și producerea de micotoxine poate avea loc în câmp, în timpul depozitării sau în ambele perioade. În timpul depozitării cerealelor are loc o pierdere a conținutului de proteine, aminoacizi, vitamine etc, fapt ce conduce la scăderea valorii nutritive a boabelor. În aceste condiții ele devin mai vulnerabile atacului fungilor și insectelor, care pot funcționa ca vectori ai contaminării.

Micotoxinele cele mai comune cunoscute pentru intoxicațiile severe pe care le produc la om și animale sunt sintetizate, în principal, de 5 genuri importante de fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* și *Claviceps* (Miller și Trenholm, 1994; Sweeney și Dobson, 1998) și aparțin în principal următoarelor clase: aflatoxine (AF), ochratoxine (OTA), fumonizine (FB), trichotecene (DON, NIV) și zearalenona (ZEA). Una dintre principalele lor caracteristici este rezistența la tratamente fizice, chimice și termice.

Deși există o preocupare permanentă pentru a împiedica contaminarea cu micotoxine pe tot traseul lanțului alimentar, aceasta nu poate fi evitată. Pentru animalele de fermă, mari consumatoare de cereale, riscul de a consuma hrană contaminată este foarte mare, cu implicații negative pentru starea de sănătate a animalelor și scăderea eficienței economice. După ingestia hranei contaminate cu micotoxine, acestea sunt absorbite la nivel intestinal și ajung prin intermediul circulației sanguine la organele țintă, în special la ficat și rinichi, organele principale implicate în metabolismul și excreția toxinelor. Reducerea contaminării cu micotoxine contribuie nu numai la îmbunătățirea sănătății animale, dar și la reducerea conținutului de micotoxine în produsele de origine animală destinate consumului uman (lapte, carne, organe, produse din carne etc).

Pentru contracararea efectelor negative ale micotoxinelor pe piața agro-industrială există numeroase produse al căror preț este însă ridicat ceea ce duce la o creștere a costului furajelor și implicit al ponderii costurilor pentru hrană în economia fermei. De aceea, găsirea de soluții mai ieftine este imperios necesară.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în diminuarea efectelor negative produse de micotoxine prin utilizarea unei rețete furajere destinată purceilor după înțărcare care include subproduse agro-industriale (un amestec de șrot de semințe struguri și șrot de cătină) în scopul reducerii efectelor toxice ale micotoxinelor, cu demonstrarea eficienței utilizării ei prin reducerea concentrației markerilor de expunere la toxină în organele țintă (ficat și rinichi).

Extraordinara dezvoltare din ultimii douăzeci de ani a biotehnologiilor care prelucrează materii prime vegetale pentru obținerea de produse destinate alimentației animale și umane a dus la obținerea de cantități însemnate de subproduse agro-industriale. Cercetările au demonstrat că aceste subproduse au valori nutritive ridicate, mai mari uneori decât materia primă de proveniență și pot deveni noi surse furajere de interes. Ele sunt prelucrate prin uscare, peletizare etc ceea ce facilitează utilizarea/incorporarea lor în nutrețurile combinate.

Avantajele pe care le prezintă invenția revendicată se referă la utilizarea în alimentația suinelor a unor subproduse provenite din industria agroalimentară care reprezintă surse importante de compuși bioactivi (polifenoli, acizi grași polinesaturați - PUFA, vitamine, minerale etc) care poate reduce efectele contaminanților prin adsorbție fizică directă sau prin alte mecanisme (biotransformare / imunostimulare). Studii anterioare au arătat că compușii naturali din plante, extracte și uleiuri din plante bogate în compuși antioxidanți (seleniu, vitamine, provitamine,

compuși fenolici etc), pigmenți (cumarină, clorofilă), fibre sunt eficiente în combaterea efectului toxic al micotoxinelor (EFSA, 2009; Galvano și colab., 2001; Jiang și colab., 2015; Peng și colab., 2014; Tulayakul și colab., 2007).

Invenția revendicată poate fi utilizată la scară industrială și poate furniza producătorilor de furaje un produs furajer eficient, care va putea fi utilizat în vederea reducerii efectelor toxice ale micotoxinelor la porci, îmbunătățirii stării de sănătate a animalelor și creșterii securității alimentelor de origine animală.

Prezentăm în continuare date științifice din literatura de specialitate care au evaluat beneficiile pe care utilizarea subproduselor agro-industriale bogate în compuși bioactivi (polifenoli, acizi grași polinesaturați, vitamine, minerale, fibre etc) le pot avea pentru îmbunătățirea stării de sănătate a animalelor.

Există studii care au demonstrat că biocompușii activi din plante sau subproduse ale acestora pot să lege diferite micotoxine împiedicând absorbția lor (San și Chan, 1987). De exemplu, subprodusele vinicole (tescovină, turte de sămburi de struguri sau șrot de sămburi de struguri), o sursă foarte importantă de polifenoli au capacitatea de a diminua absorbția micotoxinelor pe lângă proprietățile lor antioxidante și anti-inflamatoare. Lu și colab., (2017) au raportat că polifenolii din ceaiul fermentat (Pu-er) au inhibat absorbția aflatoxinei B1 (AFB1) din hrana contaminată în proporție de 85% prin formarea unui complex macromolecular C-AFB1 mai puțin absorbabil diminuând astfel leziunile hepatice provocate de toxină și facilitând eliminarea ei prin defecții în experimente pe șobolani. Studiile *in vitro* realizate de Avantaggiato și colab., (2014) au arătat că subprodusele vinicole au redus procesul de adsorbție a unor micotoxine în mediu lichid. Procentul de inhibiție cel mai mare s-a înregistrat pentru AFB1 urmată de zearalenonă și ochratoxina A (AFB1 > ZEA > OTA). La porc de asemenea, tescovina de mere inclusă în hrana contaminată cu deoxinivalenol a diminuat absorbția gastro-intestinală a acestei toxine (Guidon-Kezis și colab., 2014). Alte studii au experimentat potențialul compușilor fenolici de a reduce toxicitatea micotoxinelor.

Astfel, Aboobaker și colab (1994) au evidențiat rolul compușilor fenolici în procesele de detoxificare și în modularea carcinogenității aflatoxinei B1. În experimentele realizate la șobolani hrăniți cu o dietă sintetică conținând diferiți compuși fenolici alimentari cu o concentrație de 0,5% autorii au observat o scădere dramatică a capacității microzomilor hepatici de a cataliza reacțiile AFB1, care duc la activarea toxinei și la formarea aducțiilor cu ADN-ul. Unii

compuși polifenolici naturali, ex. flavonoizii polihidroxilați și acizii fenolici pot reduce eficient concentrația de aducți AFB1-DNA din plasmă (Firozi și Bhattacharya, 1995). Fenolii naturali, cum ar fi quercetina și kaempferolul, acidul elagic, și curcumina reduc *in vitro* activitatea enzimatică crescută cauzată de intoxicația cu AFB1 (Mistry și colab., 1997). După acești autori, suprimarea activității protein kinazei C de către compușii fenolici poate reprezenta o cale de a controla carcinogenicitatea AFB1. Alți compușii fenolici testați au fost flavonoizii (fisetin, kaempferol, morin, naringin, și catechine), acizi fenolici (acidul cafeic și clorogenic), alți fenoli (eugenol, vanilină) și fenoli sintetici (hidroxianisol butilat și hidroxitoluen butilat) cu proprietăți antioxidante. Unii compuși fenolici (naringin, catechine, eugenol, vanilina și hidroxianisolul butilat) au indus activarea sistemului antioxidant, în particular a glutathion S-transferazei citosolice, o enzimă antioxidantă care stimulează formarea conjugatului AFB1-glutathion și care reprezintă un prim pas în detoxificarea toxinei.

Mecanismul implicat în efectul protector al antioxidanților nu este foarte clar. S-a menționat că biocompușii fenolici (flavonoizii și acizii fenolici) au proprietatea de a capta radicalii liberi (ROS) (Gülçin, 2012; Zambonin, 2012), capacitatea antioxidantă depinzând de numărul și pozițiile grupărilor hidroxil și de procesul de glicozilare a flavonoizilor (Cai și colab., 2006). În acest sens, Corcuera și colab., (2012) au arătat că un extract polifenolic obținut din semințele de cacao care conține 28% procianidine (în principal oligomeri ai epicatechinelor) a determinat o creștere a viabilității celulare și a redus semnificativ cantitatea de ROS în celulele tratate cu OTA. Mai mult, s-a sugerat că legarea compușilor fenolici de membrana plasmatică celulară poate determina inhibarea peroxidării lipidice (El-Sharakly și colab., 2009). De asemenea, progresia peroxidării lipidice poate fi afectată de chelatarea ionilor metalici de către compușii fenolici (Wang and Millner, 2009).

De asemenea numeroase cercetări au arătat că acizii grași polinesaturați, alte molecule cu potențial biologic activ important pot reduce toxicitatea asociată micotoxinelor. Astfel, acizii grași polinesaturați omega-3 (eicosapentaenoic acid și docosahexaenoic) determină la nivel renal o reducere a răspunsului pro-inflamator și împiedică dezvoltarea nefropatiei indusă de micotoxine (Shi și Pestka, 2006; Jia și colab., 2002).

Studiile care susțin invenția revendicată au fost realizate pe porci după înțărare a căror hrană a fost contaminată ochratoxină (OTA). Alegerea ochratoxinei dintre micotoxine pentru demonstrarea eficienței noii rețete furajere se bazează pe faptul că la porc, în urma ingestiei orale,

OTA este rapid absorbită și excretată în principal prin rinichi, reziduuri de toxină regăsindu-se în aceste organe. Concentrația de micotoxină din organele implicate în metabolismul și în excreția toxinei (ficat și rinichi) pot fi utilizate ca markeri de expunere la toxină.

Ochratoxinele reprezintă un grup de micotoxine, metaboliți secundari produși de fungi ai genului *Aspergillus* și *Penicillium* sp., iar ochratoxina A este cea mai toxică moleculă din acest grup (el Khoury și Atoui 2010). Contaminarea cu OTA a cerealelor și furajelor este foarte heterogenă din cauza condițiilor climatice sau de păstrare (Malir și colab. 2016). Ochratoxina A este nefrotoxică atât la om, cât și la animale (Malir și colab. 2016). Rinichiul este organul țintă principal, dar după cum arată studiile *in vivo*, ochratoxina A poate avea și efecte hepatotoxice, neurotoxice, imunotoxice, mutagenice și teratogenice (Kuiper-Goodman și Scott 1989; Marin și colab. 2016).

Datele anterioare din experimente *in vivo* au indicat că OTA se acumulează în rinichi, mai degrabă decât în alte organe și concentrația de OTA în rinichi reprezintă un marker al expunerii la toxină (Milicevic și colab., 2008). Totodată, spre deosebire de alte micotoxine, OTA se poate acumula în organism și în țesuturi datorită ratei mari de reabsorbție (Dahlmann și colab., 1998; Zingerle și colab., 1997). În plus, alegerea porcului s-a făcut datorită faptului că porcii sunt mari consumatori de furaje și sunt, în general, considerați cea mai sensibilă specie la nefrotoxicitatea indusă de OTA și din acest motiv, stabilirea limitei provizorii de toleranță la om s-a bazat pe studii de nefrotoxicitate la porci (Walker și Larsen 2005).

Utilizarea rețetei furajere, conform invenției revendicate într-un experiment desfășurat la purcei după înțârcare

Experimentul a fost realizat în ferma experimentală a IBNA pe 40 de purcei hibrizi TOPIG înțârcați (10 purcei/lot) cu o greutate medie inițială de $9,13 \pm 0,05$ kg, timp de 30 de zile. După înțârcare (la 30 de zile) purceii au fost aclimatizați în hala experimentală timp de o săptămână înainte de a fi utilizați în protocolul experimental și au fost tratați cu colistin (3 zile) pentru a preveni stresul de înțârcare. Animalele au fost repartizate în patru loturi și au primit următoarele tratamente:

- lot 1: nutreț combinat (NC) control (lot/grup Control)
- lot 2: NC contaminat cu ochratoxina A (lot/grup OTA)

-lot 3: NC cu 5% amestec de șrot de semințe de struguri + șrot de cătină (1 :1)
(lot/grup NC+SSC)

-lot 4: NC cu 5% amestec de șrot de semințe de struguri + șrot de cătină contaminat
cu ochratoxina A (lot/grup NC+SSC+OTA)

Animalele au fost cazate în 8 boxe corespunzătoare fiecărui tratament (5 animale/boxa/10 animale/treatment), ceea ce a permis măsurarea exactă a cantității de hrană ingerată și a resturilor pentru fiecare tratament. Accesul animalelor la hrană și apă a fost *ad libitum*. Animalele au fost cântărite la începutul și la sfârșitul experimentului pentru calcularea sporului mediu zilnic.

La sfârșitul experimentului (30 zile) au fost recoltate probe de sânge și organe (ficat și rinichi) pentru determinări analitice.

Rețeta control a fost compusă din porumb și șrot de soia (Tabelul 2) și aceeași rețetă a fost utilizată și pentru lotul 2 (NC contaminat cu ochratoxina A). Rețeta experimentală a fost utilizată pentru loturile 3 (NC+SSC) și lotul 4 (NC+SSC+OTA) și a diferit față de rețeta control prin includerea în structura de bază a nutrețului combinat a amestecului de șroturi (SSC). Structura amestecului de șroturi testat este prezentată în Tabelul 1.

Pentru obținerea nutrețului combinat contaminat cu micotoxină s-a folosit un porumb natural contaminat cu ochratoxina A (230mg/kg) care a condus la o concentrație finală de OTA de 480 μg OTA/kg NC. Concentrația de OTA în furajele care au fost administrate celor 4 loturi a fost analizată prin tehnica ELISA a fost după cum urmează : 3,8 ppb (Control); 3,9 ppb (SSC); 480 μg OTA/kg NC (OTA); 480 μg OTA/kg NC (OTA+SSC).

Tabel 1. Structura SSC

Ingredient	Procent de includere (%)
Șrot fructe de cătină	50
Șrot semințe de struguri	50

Rețetele de nutreț combinat au fost formulate conform cerințelor nutriționale NRC (2012) pentru porci după înțărcare. Pe baza compoziției chimice brute a ingredientelor furajere selecționate au fost formulate rețete de hrană izoproteice și izocalorice (Tabel 2). Amestecul de șroturi a fost înglobat într-un procent de 5% în nutrețul combinat dedicat porciilor după înțărcare având ca factor limitativ conținutul în celuloză al rețetei.

Tabel 2. Rețetele de nutrețuri combinate

Ingrediente (%)	NC (Control)	NC (OTA)	NC (SSC)	NC (SSC+OTA)
Porumb	68,46	68,46	65,48	65,48
Sr. Soia	19,00	19,00	17,00	17,00
Gluten porumb	4,00	4,00	4,00	4,00
Inlocuitor de lapte	5,00	5,00	5,00	5,00
L Lizina	0,36	0,36	0,25	0,25
DL Metionina	0,12	0,12	0,12	0,12
Carbonat Calciu	1,58	1,58	1,58	1,58
Fosfat monocalcic	0,35	0,35	0,25	0,25
Sare	0,10	0,10	0,10	0,10
Pr. Colina	0,10	0,10	0,10	0,10
Zoofort (Premix P1+2)	1,00	1,00	1,00	1,00
Fitaza	0,01	0,01	0,01	0,01
Amestec șroturi	-	-	5,00	5,00
Concentrația de micotoxină				
OTA (μg/kg)	-	480	-	480
Compoziția chimică calculată				
EM (kcal/kg)	3282,60	3282,60	3265,70	3282,60
PB %	18,70	18,70	18,29	18,70
Liz %	1,20	1,20	1,20	1,20
Met +Cis%	0,72	0,72	0,72	0,72
Ca%	0,90	0,90	0,90	0,90
P%	0,72	0,72	0,72	0,72
Grasime%	2,40	2,40	2,70	2,40
Celuloza%	4,24	4,24	4,90	4,24
SU %	89,44	89,44	89,49	89,44

Premixul folosit pentru rețeta martor și cea experimentală a fost produsul Zoofortul P1-2 (fabricat de IBNA Balotesti), care este un premix convențional (Tabel 3).

Tabel 3. Structura premixului utilizat

Structura premix	Premix comercial- Zoofort P1-2
Vitamina A, UI/kg	10.000
Vitamina D, UI/kg	2.000
Vitamina E, UI/kg	30,00
Vitamina K3, mg/kg	2,00
Vitamina B1, mg/kg	1,96

Vitamina B2, mg/kg	3,84
Acid pantothenic, mg/kg,	14,85
Acid nicotinic, mg/kg	19,2
Vitamina B6, mg/kg	2,94
Vitamina B7, mg/kg	0,06
Vitamina B9, mg/kg	0,98
Vitamina B12, mg/kg	0,03
Vitamina C, mg/kg	24,50
Mangan, mg/kg	40,30
Fier, mg/kg	100
Cupru, mg/kg	100
Zinc, mg/kg	100
Iod , mg/kg	0,38
Seleniu, mg/kg	0,23

Dupa fabricarea nutrețurilor combinate, acestea au fost analizate din punct de vedere chimic pentru evaluarea calității nutritionale a acestora după cum urmează:

Determinarea compozitiei chimice brute, metoda WEENDE:

-*Substanta uscata* la 65⁰C si 103⁰C s-a determinat prin metoda gravimetrica conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 SR ISO 6496 :2001 folosind etuve ECOCELL pentru uscare si o moara Gridomix GM 200 pentru macinare.

-*Proteina bruta* s-a determinat prin metoda de mineralizare in bloc si distilare cu abur conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 SR EN ISO 5983- 2:2009 AOAC 2001.11 folosind un analizor de proteina FOSS Tecator, KJELTEC 2300.

-*Grasime bruta* s-a determinat prin metoda extractiei cu solventi organici conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 SR ISO 6492:2001 folosind un aparat FOSS Tecator SOXTEC- HT 1043 sau 2055.

-*Celuloza bruta* s-a determinat prin metoda cu filtrare intermediara conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 SR EN ISO 6865:2002 folosind un aparate FOSS Tecator FIBERTEC 2010 sau 2055.

-*Cenusa bruta* s-a determinat prin metoda gravimetrica conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 SR EN ISO 2171:2010 folosind un cuptor de calcinare Nabertherm.

Determinarea concentratiei de acizi grasi PUFA a fost efectuata prin metoda gazcromatografica SR CEN ISO/TS 17764 folosind un gaz cromatograf Perkin Elmer (Clarus 500, USA) echipat cu injector (250⁰C), un detector cu ionizare (260⁰C), si o coloana capilara BPX70 pentru acizi grasi (60 m × 0.25 mm i.d. × 0.20 μm, Agilent) cu un flux al coloanei de 50 mL/min.

1. Prepararea esterilor metilici s-a efectuat prin extractie cu metanol hexan conform standardului ASRO-SR EN ISO 15304/AC, 2005
2. Programul termic a fost de: crestere de la 180⁰C la 220⁰C pentru 7 min, apoi crestere la 220⁰C pentru 10 min. Timpul de analiza a fost de 29 min. Pikurile au fost identificate comparand timpul lor de retentie cu standarde ale acizilor grasi determinati individual.

Determinarea concentratiei de minerale

-Determinarea macroelementelor Calciu, Fosfor, Sodiu, Potasiu, Magneziu

Calciu: Metoda - spectrometrie de absorbtie atomica conform standardului SR ISO 6490-2: 1983 folosind un spectrofotometru cu absorbtie atomica Thermo Electron.

Fosfor: Metoda fotometrica conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009, folosind un spectrofotometru UV- VIS V530.

Sodiu, Potasiu, Magneziu: Metoda - spectrometrie de emisie in flacara conform standardului SR ISO 7485: 2000 folosind un spectrofotometru cu absorbtie atomica Thermo Electron.

-Determinarea microelementelor Fier, Cupru, Mangan, Zinc

Metoda - spectrometrie de absorbtie atomica conform recomandarilor Regulamentului (CE) nr. 152/2009 STAS 9597/16- 86 STAS 9597/17- 86 folosind un spectrofotometru cu absorbtie atomica Thermo Electron la lungimea de undă (λ; in nm): 324.8-Cu; 279.5-Mn; și 213.9-Zn.

Determinarea concentratiei de polifenoli totali a fost efectuata prin metoda Folin-Ciocalteu dupa cum urmeaza: un amestec de 10 μl de extract, 790 μl de apa, 50 μl reactiv Folin-Ciocalteu si 150 μl Na₂CO₃ (20%) a fost vortexat si lasat 2 ore la intuneric. Absorbanta acestui amestec a fost citita la 750 nm, iar concentratia de polifenoli totali a fost calculata de pe o curba de calibrare obtinuta prin folosirea acidului galic ca standard, dupa ecuatie, TP(mg/L GAE) = (A750-0.0165)/0.0008. Rezultatele au fost exprimate in mg echivalent de acid galic (GAE)/L.

Determinarea concentrației de ochratoxină din furaje și organe

Determinarea OTA din furaj s-a făcut cu ajutorul kitului ELISA, Veratox ((Neogen, Lansing, MI,

USA), conform instrucțiunilor producătorului.

Extracția și dozarea ochratoxinei A din organe s-a realizat după o metodă optimizată în cadrul laboratorului care a presupus următoarele etape:

Extracția OTA: cinci grame de țesut au fost extrase cu cloroform acidificat: 25 mL cloroform + 0.75 mL acid orthophosphoric concentrat (raportul de 5 g probă: 25 mL cloroform acidificat a fost respectat și după filtrare s-a măsurat volumul exact de filtrat - volumul aproximativ de filtrat a fost de 20mL). Cei 20 mL din filtrat a fost re-extras cu 20 mL soluție de 0.5 mol/L bicarbonat de sodiu și amestecat viguros timp de 3 min. Amestecul a fost centrifugat la 3500 rpm timp de 3 min și extractul a fost acidificat cu 1mol/L HCl la pH 2.5 plus 1 mL of cloroform și apoi re-extrase de două ori cu 2 x 2 mL of cloroform. Extracția a fost repetată de 3 ori. De fiecare dată, amestecul a fost centrifugat la 3500 rpm timp de 5 min pentru un strat compact între cele două faze, fracția organică (cloroform) de la baza tubului a fost colectată și evaporată la sec la rotavapor (15mL/probă x 3 extracții).

Separarea OTA : Reziduurile rezultate din cele 3 extracții a fost dizolvat gradual în 20 mL PBS/15% methanol (v/v) (PBS, pH 7.4) și separat pe coloane de immunoafinitate OCHRAPREP® Coloanele au fost apoi spalate cu 20 mL apă și uscate. Apoi, coloana a fost eluată cu amestec methanol: acetic 98/2 (v/v) (1,5 mL:1,5mL) și s-a făcut dozarea prin ELISA.

Rezultate

Analiza chimică a amestecului de șroturi (SSC) este prezentată în Tabele 4, 5, 6, 7 și 8. Se poate observa că acest amestec are o concentrație relativ mică de proteină, dar un nivel ridicat de lipide (Tabel 4) cu un conținut mare de polifenoli totali (7.50 mg/g), acizi grași polinesaturați (41,82g FAME %g total FAME). Amestecul de șroturi este bogat în acizi grași omega -6-9-3 reprezentați de: acid linoleic (n-6, 36,9482 g FAME %g total FAME), oleic (n-9, 26,10 g FAME %g total FAME) și alpha linolenic (n-3, 4,45 g FAME %g total FAME, Tabel 5). Amestecul de șroturi conține polifenoli din clasa flavonoidelor: catechina și epicatechina (Tabelul 6), zaharuri: fructoză, glucoză, sucroză (Tabel 7) și acizi organici (tartric, malic, oxalic, Tabel 8).

67

Tabel 4. Compoziția chimică brută a amestecului de șroturi

Denumire produs	SU 103°C	PB	GR	Cenușă
	%	%	%	%
Amestec șroturi (SSC)	90,10	12,87	7,72	2,99

Tabel 5. Compoziția în acizi grași a amestecului de șroturi

Esteri metilici ai acizilor grași (g FAME/100g total FAME)		SSC
Ac. Capric	C10:0	0,07
Ac. Lauric	C12:0	0,03
Acid Miristic	C14:0	0,38
Ac. Pentadecanoic	C15:0	0,23
Ac. Pentadecenoic	C15:1	0,09
Ac. Palmitic	C16:0	18,86
Ac. Pamitoleic	C16:1	9,41
Ac. Stearic	C18:0	3,00
Ac. Oleic	C18:1n9c	26,10
Ac. Linoleic	C18:2n6	36,94
Ac. Linolenic-α	C18:3n3	4,45
Ac. Octadecatetraenoic	C18:4n3	0,08
Ac. Eicosadienoic	C20:2n6	0,04
Ac. Eicosatrienoic	C20:3n6	0,08
Alti acizi grași		0,23

Tabel 6. Compoziția în polifenoli a amestecului de șroturi

Denumire produs	Flavonoidi și acizi fenolici (mg/g)						
	Polifenoli totali	Catechina	Acid valinic	Acid cafeic	Epicatechina	P-Acid Cumaric	Acid ferulic
Amestec SSC	50,85	0,3977	0,0099	0,0136	0,1893	0,0049	0,0011

Tabel 7. Compoziția în carbohidrați a amestecului de șroturi

Denumire produs	Compoziția în carbohidrați (mg/g)			
	Fructoza	Glucoza	Sucroza	Maltoza
Amestec SSC	9,156	6,789	5,130	0,502

Tabel 8. Compoziția în acizi organici a șroturilor

Denumire produs	Compoziția în acizi organici (mg/g)					
	Oxalic	Citric	Tartric	Malic	Succinic	Fumaric
Amestec SSC	2,15	0,95	2,14	3,451	0,112	0,0002

Analiza chimică a nutrețurilor combinate a validat compoziția chimică calculată (Tabel 9)

Tabel 9. Compoziția chimică brută a nutrețurilor combinate

Compoziția chimică brută				
	NC (Control)	NC (OTA)	NC (SSC)	NC (SSC+OTA)
SU 103°C	88,86	90,02	88,95	90,01
PB %	18,50	18,27	17,19	17,82
Grasime%	2,35	2,21	2,35	2,38
Cenusa %	4,12	4,75	4,79	4,91
Calciu %	0,86	0,89	0,88	0,88
Fosfor %	0,470	0,520	0,440	0,420
Sodiu %	0,046	0,059	0,049	0,046
Potasiu %	0,966	1,01	0,844	0,928
Magneziu %	0,220	0,241	0,223	0,226
Fier %	283,48	305,88	278,5	300,67
Cupru %	19,89	19,84	17,87	16,82
Mangan ppm	52,46	52,74	52,87	57,14
Zinc ppm	104,07	129,6	109,4	117,71
Plumb ppm	0,258	0,298	0,282	0,274
Cadmiu ppm	0,160	0,161	0,135	0,149

Nutrețul combinat care a inclus **5% amestec șrot de semințe de struguri + șrot de cătină** (proporție 1:1) este bogat în acizi grași nesaturați dintre care acizi polinesaturați (omega-6 și omega-9). Includerea SSC, a determinat creșterea conținutului de acid linoleic, (n-6) în medie cu 3.71% în furajul administrat lotului 3 (SSC) comparativ cu lotul 1 (Control) și lotul 2 (OTA) – (Tabelul 10).

Tabelul 10. Compoziția în acizi grași a nutrețurilor combinate

Esteri metilici ai acizilor grași (g FAME/100g total FAME)		NC (Control)	NC (OTA)	NC (SSC)	NC (SSC+OTA)
Ac. Capric	C10:0	0,05	0,06	0,00	0,05
Ac Lauric	C12:0	0,02	0,00	0,00	0,00
Acid Miristic	C14:0	0,10	0,18	0,16	0,15
Ac. Palmitic	C16:0	11,69	13,93	13,21	13,34
Ac pamitoleic	C16:1	0,21	1,72	0,19	1,53
Ac. Stearic	C18:0	2,65	2,73	2,58	2,41
Ac oleic cis	C18:1n9c	29,87	29,63	28,05	27,96

Ac Linoleic	C18:2n6	52,77	49,40	53,91	52,21
Ac Linolenic	C18:3n3	2,15	2,36	1,91	2,35
Ac. Octadecatetraenoic	C18:4n3	0,32	0,00	0,00	0,00
Ac eicosadienoic	C20:2n6	0,17	0,00	0,00	0,00
Alti acizi grasi		0,00	0,00	0,00	0,00

NC cu SSC este **bogat compuși bioactivi** având concentrații ridicate de acizi organici (acid oxalic: 0,474-0,620 mg/g, acid citric: 6,242-6,333, acid tartric: 4,109-4,250 mg/g, Tabel 11). Includerea amestecului de șroturi în compoziția nutrețului combinat a determinat o creștere semnificativă a concentrației de epicatechină în furajele destinate loturilor 3 și 4 (1,079 la lotul 3-SSC și 1,182 la lotul 4-SSC+OTA) față de concentrația de la lotul control (0,0042) și de la lotul OTA (0,0016, Tabelul 12). Astfel, epicatechina este unul dintre cele mai abundente flavonoide prezente în diferite fructe, cacao și frunze de ceai. Noul produs are și un conținut mai mare în carbohidrați (glucoză și sucroză, Tabelul 13).

Tabel 11. Compoziția în acizi organici a nutrețurilor combinate

Lot/grup	Compoziția în acizi organici (mg/g)			
	Oxalic	Citric	Tartric	Malic
NC (Control)	0,057	2,762	3,919	0,329
NC (OTA)	0,030	2,568	3,780	0,229
NC (SSC)	0,474	6,242	4,250	0,372
NC (SSC+OTA)	0,620	6,333	4,109	0,341

Tabel 12. Compoziția în flavonoide și acizi fenolici a nutrețurilor combinate

Lot/grup	Flavonoide și acizi fenolici (mg/g)							
	Acid vanilic	Acid cafeic	Epicatechina	P-Acid Cumaric	Acid ferulic	Rutina	Quercetina	Luteolina
NC + amestec șroturi (SSC)	0,0015	0,0016	1,0791	0,0022	0,0040	0,0016	0,0973	0,0133
NC + amestec șroturi +OTA	0,0016	0,0014	1,1827	0,0018	0,0035	0,0023	0,0797	0,0100

Tabel 13. Compoziția în carbohidrați a nutrețurilor combinate

Lot/grup	Compoziția în carbohidrați (mg/g)			
	Fructoză	Glucoză	Sucroză	Maltoza
NC (Control)	9,870	12,296	12,230	1,224
NC (OTA)	9,143	11,460	11,312	1,851

NC (SSC)	9,777	13,386	19,459	1,557
NC (SSC+OTA)	9,489	13,206	19,853	1,239

Studiile recente au demonstrat că micotoxinele au un efect preponderent inflamator și că multe din efectele lor negative, inclusiv potențialul lor cancerigen au la bază un proces inflamator (de exemplu o creștere a citokinelor pro-inflamatoare). La nivel celular, micotoxinele sunt responsabile de asemenea de inducerea stresului oxidativ și de generarea ROS care sunt principalii factori responsabili de inducerea leziunilor la nivelul membranei celulare. Multe studii *in vitro* și *in vivo* susțin efectele antiinflamatorii ale polifenolilor prin inhibarea la nivel genetic și molecular a mecanismului de producere a inflamației (calea NF- κ B).

De asemenea flavonoidele, polifenoli dintre cei mai abundenți găsiți în fructe (în principal citrice), legume cu frunze verzi, semințe, hrișcă, nuci, broccoli, ulei de măsline, mere, ceapă, ceai verde, struguri roșii, vin roșu, cireșe și fructe de pădure. Flavonoidele au fost utilizate ca supliment nutritiv cu un efect benefic în diferite patologii prin efectul lor antioxidant. Unele dintre efectele benefice includ protecția cardiovasculară, anticancerigenă, antitumorală, anti-alergică, anti-virală, antiinflamatoare, efecte anti-diabetice, gastroprotectoare, antihipertensive, imunomodulatoare și antiinfecțioase (Lakhanpal și Rai, 2007).

Nutrețul combinat incluzând amestecul de șroturi este bogat în carbohidrați (glucoză și sucroză). În ultimii ani, cercetările axate pe reducerea efectelor negative ale micotoxinelor au explorat eficiența adsorbanților organici de tipul carbohidraților, în special a oligozaharidelor modificate (de exemplu manan), izolate din peretele celular de drojdii dovedindu-se capacitatea distinctă a acestora de a absorbi micotoxinele, aflatoxină, ochratoxină, etc (Nedeljković-Trailović e al., 2015).

Nutrețul combinat incluzând amestecul de șroturi este bogat acizi organici, oxalic și citric care sunt agenți de chelatare și care pot contribui la legarea micotoxinelor scăzând riscul acumulării lor în organismul animal. De exemplu, șpreierea arbuștilor de kiwi cu acid oxalic înainte de recoltare a scăzut acumularea de patulină în fructele infectate experimental cu *Penicilium expansum* și a crescut concentrația de acid ascorbic în fruct și fermentarea acestora.

În perioada experimentală a acestui studiu au fost monitorizați parametrii productivi, greutate, consum de hrană și spor. Expunerea la ochratoxină nu a avut efecte negative asupra greutății corporale, a sporului în greutate și a consumului de hrană, diferențele apărute nefiind

semnificative. Administrarea nutrețului combinat cu șroturi fără toxină (NC+SSC) a crescut în schimb greutatea și sporul purceilor hrăniți cu acest furaj ($p < 0.0013$).

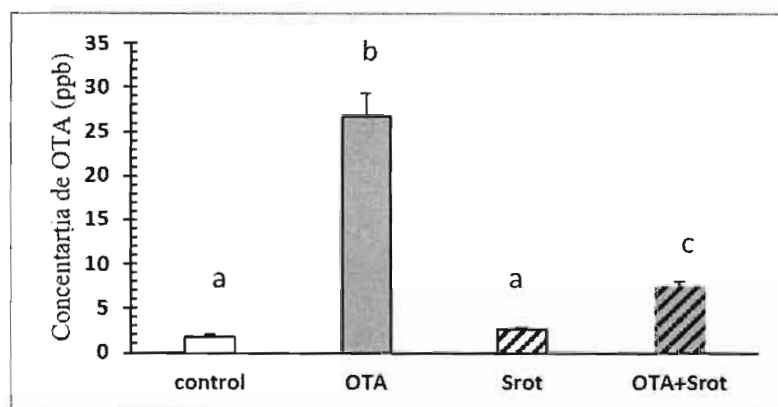
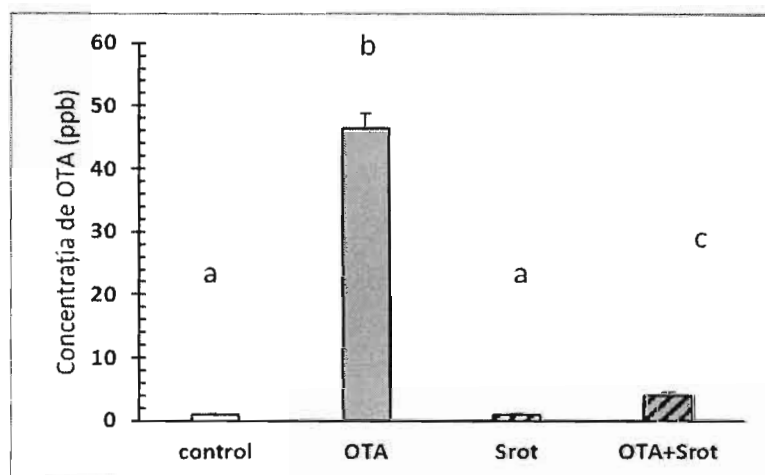
Analiza parametrilor biochimici care ilustrează starea generală de sănătate, funcționalitatea ficatului și a rinichilor a pus în evidență valori care s-au situat în limitele admise pentru categoria de vârstă și de greutate la purceii înțărcați. Nu au fost identificate diferențe semnificative între loturi indiferent de tipul de tratament (Tabelul 14).

Tabel 14. Concentrația markerilor serici la purceii înțărcați

Parametrii serici	Control	SSC	OTA	SSC+OTA
Glucosa (mg/dL)	109,9 ± 2,0	122,1 ± 4,0	111,6 ± 7,0	103,3 ± 9,0
Colesterol (mg/dL)	102,4 ± 1,0	105,0 ± 0,5	97,7 ± 5,0	104,9 ± 8,0
Trigliceride (mg/dL)	31,4 ± 2,0	32,6 ± 3,0	33,2 ± 1,0	37,5 ± 5,0
Albumina (g/L)	3,0 ± 0,10	2,9 ± 0,5	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,1
Creatinina (mg/dL)	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Uree (mg/dL)	21,0 ± 2,0	25,4 ± 3,0	27,0 ± 5	26,3 ± 2,0
Fosfor (mg/dL)	4,9 ± 0,7	6,0 ± 0,8	4,1 ± 0,4	4,4 ± 0,5
Calciu (mg/dL)	9,9 ± 0,5	9,7 ± 0,6	9,1 ± 0,7	9,8 ± 0,5
Magneziu (mg/dL)	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	1,9 ± 0,9	2,4 ± 1,0
Fier (ug/dL)	113,9 ± 2,1	107,2 ± 5,0	104,0 ± 7,0	112,1 ± 8,0
Proteina totala (g/dL)	5,3 ± 1,0	5,1 ± 1,5	5,1 ± 1,6	5,4 ± 1,7
Bilirubina totala (mg/dL)	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0
ALAT (TGP) (U/L)	49,4 ± 0,8	40,3 ± 0,9	46,2 ± 1,5	51,2 ± 1,9
ASAT (TGO) (U/L)	38,5 ± 10,5	41,2 ± 5,0	40,0 ± 6,0	41,0 ± 7,0
Fosfataza alcalina (U/L)	247,6 ± 10,0	279,9 ± 11,0	311,4 ± 17,0	273,2 ± 3,0
GAMA GT (U/L)	25,1 ± 0,5	26,7 ± 2,0	34,0 ± 5,0	29,9 ± 6,0

La sfârșitul experimentului animalele au fost sacrificate și au fost preluate probe de ficat și rinichi în scopul determinării reziduurilor de ochratoxină în principalele organe interne cu rol în metabolismul acestei toxine. Probele de organe au fost păstrate la o temperatură de -80°C , până la realizarea determinărilor analitice.

Concentrația de OTA prezentă în ficatul purceilor care au primit hrană contaminată este prezentată în Figura 1. Ingerarea NC-lui contaminat cu OTA timp de 30 de zile a determinat o creștere a concentrației de OTA de 14,81 ori față de concentrația de OTA din ficatul de la animalele control. Important de remarcat este faptul că administrarea furajului care a conținut amestecul de șroturi a condus la o reducere a concentrației de OTA cu 72% față de concentrația de OTA determinată în ficatul purceilor intoxicați. Așa cum era de așteptat, concentrația de OTA în ficatul purceilor din lotul SSC, a avut un nivel similar cu cel identificat la lotul control.

Figura 1. Concentrația de ochratoxina A în ficat**Figura 2. Concentrația de ochratoxina A în rinichi**

Reziduuul de OTA determinat în rinichi este prezentat în Figura 2. Așa cum se poate observa, ingerarea NC contaminat cu OTA timp de 30 de zile a determinat o creștere a concentrației de OTA de 46 ori față de concentrația OTA din rinichii de la animalele control. Concentrația de OTA în rinichii porceilor din lotul SSC, a fost similară cu cea identificată la lotul control. La fel ca și în cazul ficatului, administrarea furajului care conține amestecul de șroturi a determinat o reducere a concentrației de OTA cu 91.3% față de concentrația determinată în rinichii porceilor intoxicați cu OTA.

Răspunsul imun mediat prin anticorpi contribuie la neutralizarea toxinelor, particulelor virale și bacteriene prin sinteza de anticorpi (imunoglobuline-Ig) ca molecule efectoare. Cele trei clase de imunoglobuline M, G și A sunt implicate diferit în răspunsul imun. IgM este primul

anticorp produs după prima expunere la diverse antigene și se găsește în cantitatea cea mai mare în fluidele circulante. IgG, componenta majoră a răspunsului imun umoral este anticorpul sintetizat după a doua expunerea la antigene bacteriene, virale, fungice, etc și asigură imunitatea de lungă durată, iar IgA este anticorpul produs în cea mai mare cantitate la nivelul mucoaselor și joacă un rol cheie în imunitatea mucosală. În experimentul de față contaminarea cu OTA a produs o scădere semnificativă a nivelului de IgM și IgA (aproximativ 9%, $p < 0,053$, respectiv 10%, $p < 0,033$) în plasma purcelor care au primit furaj contaminat cu toxină. În contrast, NC cu amestecul de șroturi, 5% a crescut nivelul acestor imunoglobuline peste nivelul grupului control și al grupului OTA contracarând efectul reducător al micotoxinei asupra răspunsului imun umoral. Furajul incluzând amestecul de șroturi a crescut de asemenea concentrația de IgG peste control și peste grupul OTA (Tabel 14).

Tabel 16. Efectul NC cu 5% amestec de șroturi în contracararea efectului OTA asupra parametrilor imunologici sistemici

Loturi	IgA (mg/mL)	IgM (mg/mL)	IgG (mg/mL)
NC-Control	$0,677 \pm 0,1$	$2,49 \pm 0,28$	$8,58 \pm 1,54$
NC +OTA	$0,609 \pm 0,07$	$2,26 \pm 0,13$	$5,97 \pm 0,45$
NC+SSC	$0,897 \pm 0,10$	$2,94 \pm 0,27$	$9,99 \pm 2,53$
NC +SSC +OTA	$0,831 \pm 0,13$	$2,76 \pm 0,24$	$6,48 \pm 0,77$

Aceste rezultate sugerează că **amestecul de șrot de struguri și șrot de cătină** precum și nutrețul combinat incluzând aceste subproduse sunt o sursă alternativă eficientă în contracararea efectelor negative produse de hrana contaminată cu ochratoxină prin scăderea reziduurilor de toxină din ficat și rinichi, organe cu rol cheie în procesele metabolice ale animalelor care sunt totodată subproduse animaliere destinate consumului uman. De asemenea nutrețul combinat cu amestec de șroturi are capacitatea de a îmbunătăți statusul imun prin anticorpi. Având în vedere că pentru diminuarea efectelor micotoxinelor în ferme se utilizează doar produse de import, produsul propus pentru brevetare este un produs românesc, cu eficiență ridicată și preț de cost scăzut care poate fi folosit în hrana purcelor în perioada de înțărare

REVENDICĂRI:

1. *Rețetă de nutreț combinat îmbogățită în compuși bioactivi (polifenoli, acizi grași nesaturați, carbohidrați, acizi organici) prin includerea a 5% amestec de șroturi - semințe de struguri și cătină destinată reducerii acumulării de ochratoxină, micotoxină produsă de mucegaiuri din genul *Aspergillus* în organe și îmbunătățirea răspunsului imun la porc.*

Nutrețul combinat rezultat din această rețetă se caracterizează prin: 88,95 % substanță uscată; 17,19 % proteină brută; 2,35 % grăsime brută; 4,79 % celuloză brută, 0,88% calciu și 0,44% fosfor. Amestecul are un conținut în polifenoli totali de 8,51g/kg din care 1,130mg/g epicatechină și 0,0885mg/g quercitină, acizi grași polinesaturați din care 29,75 % acid oleic-n-9, și 53,06% acid linoleic-n-6, acizi organici, din care acid oxalic: 0,474-0,620 mg/g, acid citric: 6,242-6,333, acid tartric: 4,109-4,250 mg/g.

2. *Structura amestecului de șrot de struguri și șrot de cătină utilizat este următoarea: 50% șrot semințe de struguri și 50% șrot cătină cu o compoziție de: 90% substanță uscată, 12 % proteină brută, 7,7% grăsime, 2,99% cenușă. Amestecul este bogat în polifenoli totali (50,85mg/g) din care catechină (0,3977mg/g), epicatechină (0,1893 mg/g); quercitină (0,0520 mg/g), acizi grași nesaturați: acid linoleic (omega-6, 36,94%), oleic (omega-9, 26,10 %) și alpha linolenic (4,45%), acizi organici: oxalic (2,15 mg/g, tartric, 2,14 mg/g, malic. 3,41mg/g) și carbohidrați: fructoză, 9,156mg/g, glucoză, 6,789mg/g, sucroză, 5,130mg/g.*