



UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET
JAVNO ZDRAVLJE

**ODREĐIVANJE SADRŽAJA PATULINA
U PROIZVODIMA OD JABUKA I PROCENA
IZLOŽENOSTI STANOVNIŠTVA PATULINU**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Ljilja Torović

Kandidat: Nina Dimitrov

Novi Sad, 2018. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nina Dimitrov
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Ljilja Torović, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Određivanje sadržaja patulina u proizvodima od jabuka i procena izloženosti stanovništva patulinu
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint

Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9 / stranica 143 / slika 6 / grafikona 12 / tabela 24 / referenci 184 / priloga -)
Naučna oblast: NO	Farmacija
Naučna disciplina: ND	Bromatologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	patulin; sokovi od voća i povrća; kontaminacija hrane; jabuka; bezbednost hrane; procena rizika; tečna hromatografija; analiza hrane; ostaci pesticida
UDK	543.544.5:663.316 613.26:[615.9:582.28
Čuva se: ČU	Biblioteka Medicinskog fakulteta, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Sprovedena studija po prvi put izveštava o prisustvu patulina, sekundarnog metabolita određenih vrsta plesni, u proizvodima od jabuka, kao i proceni rizika usled unosa patulina od strane odojčadi, dece, adolescenata i odrasle populacije u Republici Srbiji. Ukupno 356 uzoraka sokova i kašica za odojčad i malu decu (48 i 66, redom), sokova za decu (mala pakovanja sa cevčicom, 100) i sokova u porodičnom pakovanju (142), sakupljeno je sa tržišta tokom tri godine i analizirano primenom tečne hromatografije sa ultraljubičastom detekcijom, metodom koja je predhodno validirana. Prisustvo patulina je detektovano u 44% i 17% uzoraka sokova i kašica za odojčad i malu decu, redom, u količinama nižim od zakonskog ograničenja od 10 µg/kg (maksimalno 8,3 i 7,7 µg/kg, redom). Udeo kontaminiranih uzoraka među sokovima za decu iznosio je 43%, sa najvišom koncentracijom patulina od 30,2 µg/kg ispod maksimalno dozvoljenog nivoa od 50 µg/kg. Patulin je detektovan u 51% sokova u porodičnom pakovanju, sa 0,7% uzoraka iznad zakonske granice od 50 µg/kg (prosečna

	<p>koncentracija 4,3 µg/kg). Sokovi od jabuka su pokazali značajno viši udeo kontaminiranih uzoraka (74% u odnosu na 28%), kao i viši prosečni sadržaj patulina (6,4 u odnosu na 2,1 µg/kg) u poređenju sa sokovima od mešanog voća. Procena rizika usled unosa patulina od strane odojčadi, dece, adolescenata i odrasle populacije u Republici Srbiji, sprovedena primenom determinističkog i probabilističkog pristupa, uključujući rezultate biodostupnosti patulina, pokazala je da je odnos između procenjenog dnevnog unosa i toksikološke referentne doze za patulin od 0,4 µg/kg telesne mase, koji se označava kao “<i>hazard quotient</i>”, znatno ispod 1, što ukazuje na tolerantan nivo izloženosti i nepostojanje razloga za zabrinutost za zdravlje populacije. Dodatno, analiza ostataka pesticida i toksičnih metala potvrdila je bezbednost proizvoda od jabuka na tržištu. Međutim, identifikacija višestrukih ostataka pesticida je razlog za aktivan pristup i pažljivo planiranje i sprovođenje monitoringa bezbednosti hrane, posebno hrane za odojčad i malu decu, kao najosetljivije populacione grupe.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>23.06.2016.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: Prof. dr Sanja Bijelović, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Prof. dr Ivana Beara, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Dr Gorica Vuković, naučni saradnik, Institut za zaštitu bilja, Beograd član: Prof. dr Jelena Hogervorst, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: Prof. dr Ljilja Torović, vanredni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</p>

University of Novi Sad
Faculty of Medicine
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Nina Dimitrov
Mentor: MN	Dr Ljilja Torović, associate professor
Title: TI	Determination of patulin in apple products and population exposure assessment
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 9 / pages 143 / pictures 6 / graphs 12 / tables 24 / references 184 / appendix -

Scientific field SF	Pharmacy
Scientific discipline SD	Bromatology
Subject, Key words SKW	Patulin; Fruit and Vegetable Juices; Food Contamination; Malus; Food Safety; Risk Assessment; Cromatography, Liquid; Food Analysis; Pesticide Residues
UC	543.544.5:663.316 613.26:[615.9:582.28
Holding data: HD	Library of Faculty of Medicine, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	<p>This study reports for the first time the occurrence of patulin, a secondary metabolite of certain fungi, in apple-based food, as well as risk assessment related to patulin intake by infants, children, adolescents and adults in Serbia. In total, 356 samples of infant fruit juices (48), infant purée (66), juices for children (small package with straw, 100), and juices in family package (142) were collected from the market over three years (2013–15) and analysed using validated method based on liquid chromatography with ultraviolet detection. Patulin was found in 44% of infant juices and 17% of infant purée, with all values below the legal limit of 10 µg/kg (maximum 8.3 and 7.7 µg/kg, respectively). The proportion of contaminated samples among fruit juices for children was 43%, with the highest patulin concentration at 30.2 µg/kg, not exceeding the maximum allowed level of 50 µg/kg. Patulin was found in 51% of juices in family package, with 0.7% of the samples in excess of the legal limit of 50 µg/kg (mean 4.3 µg/kg). Apple juices showed significantly higher percentage of contaminated samples (74% versus 28%), as well as higher mean patulin content (6.4 versus 2.1 µg/kg) when compared with the multifruit ones. Risk assessment of patulin intake by Serbian infants, children, adolescents and adults, conducted by deterministic and probabilistic</p>

	<p>approaches and including the bioaccessibility results, revealed a ratio between exposure and toxicological reference dose for patulin of 0,4 µg/kg body weight, called hazard quotients, well below 1, indicating a tolerable exposure level and no health concern. Furthermore, analysis of pesticide residues and toxic metals confirmed safety of apple products on the market. However, identification of multiple pesticide residues is a reason for an active attitude and carefully planned and conducted monitoring of food safety, especially in the case of food for infants and young children, as they are the most susceptible population group.</p>
Accepted on Senate on: AS	06/23/2016
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Prof. dr Sanja Bijelović, associate professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Ivana Beara, associate professor, Faculty of Science, University of Novi Sad</p> <p>member: Dr Gorica Vuković, research associate, Institute for plant protection, Belgrade</p> <p>member: Prof. dr Jelena Hogervorst, full professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p> <p>member: Prof. dr Ljilja Torović, associate professor, Faculty of Medicine, University of Novi Sad</p>

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru **Prof. dr Ljilji Torović**, na nesvakidašnjem uloženom trudu, podršci, optimizmu, interesovanju, nesebičnom ličnom i profesionalnom zalaganju, predanosti, organizovanosti, razumevanju i neverovatnom entuzijazmu, tokom svih ovih godina.

Za stručnu saradnju i doprinos u izradi doktorske disertacije zahvaljujem se:

Prof. dr Vladimiru Petroviću (direktor Instituta za javno zdravlje Vojvodine) – za odobrenje za izradu doktorske disertacije u Institutu za javno zdravlje Vojvodine

Dr Gorici Vuković (Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu; Gradski zavod za javno zdravlje Beograd) – za saradnju u analizi ostataka pesticida

Danijeli Lukić (Institut za javno zdravlje Vojvodine) – za saradnju u analizi toksičnih metala

Prof. dr Zagorki Lozanov-Crvenković (Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu) – za statističku analizu

Ricardo Assunção (Institut za javno zdravlje Portugala) – za saradnju na probabilističkoj proceni rizika

Prof. dr Sanji Bijelović (Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu),

Prof. dr Ivani Beara (Prirodno matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu),

Prof. dr Jeleni (Cvejić) Hogervorst (Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu)

– za kritički pregled doktorske disertacije

Prof. književnosti Dragici Bilić – za lektorisanje

Posebnu zahvalnost dugujem mom dugogodišnjem prijatelju **Ivanu Sovilju**, neverovatnom čoveku i naučniku, koji nažalost nije više sa nama.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i užoj rodbini na razumevanju i podršci, tokom proteklih godina, kada je moje “učenje” oduzimalo vreme posvećeno njima.

Veliku zahvalnost dugujem mojim najdražim roditeljima i bratu na bezgraničnoj ljubavi i podršci.

Nina Dimitrov

Biografija

Nina Dimitrov je rođena 31.03.1981. godine u Novom Sadu. Osnovno obrazovanje je stekla u školi „Petefi Šandor“ u Novom Sadu, koju je završila kao novilac Vukove diplome. Uporedo je završila i osnovnu baletsku školu, takođe u Novom Sadu.

Tokom školovanja u Gimnaziji „Isidora Sekulić“, društveno-jezički smer, koju je završila sa odličnim uspehom, uključila se u rad Crvenog krsta Novog Sada, gde sa omladincima osvaja nagrade, među kojima i najvažniju, na državnom takmičenju u pružanju prve pomoći i postaje instruktor prve pomoći.

Ova dugogodišnja aktivnost opredeljuje je da upiše Medicinski fakultet, odsek farmacija, u Novom Sadu, koji završava 2008. godine, sa prosečnom ocenom 9,31. Po završetku prve godine studija, dobija nagradu Univerziteta u Novom Sadu, za uspešno završenu godinu sa prosekom 9,57.

Tokom fakulteta nastavlja sa volonterskim radom u oblasti ekologije u Udruženju eko-novinara „Eko vest“, u Novom Sadu.

Specijalizaciju Farmaceutska zdravstvena zaštita na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2011. godine, a na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, odsek Javno zdravlje, upisala je doktorske studije 2012. godine, koje završava 2018. godine, sa prosečnom ocenom 9,93.

Učestvovala je u televizijskim emisijama „Najbolji lek“ (Novosadska televizija), koja promoviše zdrav pristup životu. Takođe, piše o aktuelnim temama na polju farmacije i ekologije, u brojnim časopisima („Eliksir“, „Eko Vest“, „Betty“, „Blic žena“ i dr.).

Nakon završenog staža i položenog državnog ispita 2009. godine, radi u Zdravstvenoj ustanovi apoteka „Cvejić“ u Novom Sadu, sada na mestu koordinatora apoteka.

U 2017. godini upisala je školu homeopatije „Hahnemann“ u Novom Sadu.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	5
2.1.	TOKSIČNOST PATULINA	5
2.1.1.	Opšta toksičnost	5
2.1.2.	Akutna toksičnost	5
2.1.3.	Subakutna toksičnost	5
2.1.4.	Citotoksičnost	6
2.1.5.	Genotoksičnost	7
2.1.6.	Karcinogenost	10
2.1.7.	Embriotoksičnost i teratogenost	10
2.1.8.	Imunotoksičnost	10
2.1.9.	Neurotoksičnost	13
2.2.	PREGLED DOSTUPNE LITERATURE O PRISUSTVU I SADRŽAJU PATULINA U PROIZVODIMA OD JABUKA	14
2.2.1.	Proizvodi od jabuka izuzev sokova i hrane za odojčad i malu decu	14
2.2.2.	Sokovi od jabuka	18
2.2.3.	Hrana za odojčad i malu decu	24
2.3.	PREGLED DOSTUPNE LITERATURE O IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU	26
2.4.	POSTUPCI ZA SMANJENJE PRISUSTVA PATULINA U HRANI	30
2.4.1.	Prevenција produkcije patulina pre berbe jabuka	30
2.4.2.	Metode za postprodukcijско uklanjаnje ili detoksifikaciju patulina	30
2.4.2.1.	Mehaničke metode - filtriranje i adsorpcija	30
2.4.2.2.	Fizičke metode	31
2.4.2.3.	Fizičke i hemijske metode	34
2.4.2.4.	Hemijske metode	35
2.4.2.5.	Biološke metode	38
2.4.2.6.	Upotreba fungicida i biokontrolnih agenasa	42
2.4.2.7.	Primena prirodnih proizvoda	43
2.4.3.	Patulin i klimatske promene	43
3.	CILJEVI I HIPOTEZE	44
4.	IZBOR I KARAKTERIZACIJA METODE ZA ANALIZU PATULINA	46
4.1.	IZBOR METODE ZA ANALIZU PATULINA	46
4.1.1.	Metode za analizu patulina	46
4.1.1.1.	Metode za pripremu uzoraka	46
4.1.1.2.	Metode za identifikaciju / kvantifikaciju	48
4.1.2.	Izabrana metoda za analizu patulina	51
4.1.2.1.	Analitička metoda za analizu patulina	51
4.2.	KARAKTERIZACIJA METODE ZA ANALIZU PATULINA	54
4.2.1.	Metodologija za karakterizaciju analitičke metode	54
4.2.2.	Rezultati i diskusija karakterizacije (validacije) metode za analizu patulina	55
4.2.3.	Kontrola kvaliteta analitičkog rada	60

5.	ANALIZA PROIZVODA OD JABUKA	61
5.1.	ANALIZA PATULINA	61
5.1.1.	Materijal i metode za analizu patulina	61
5.1.1.1.	Vrsta i brojnost uzoraka za analizu patulina	61
5.1.1.2.	Analitička metoda za analizu patulina	63
5.1.1.3.	Statističke metode za analizu patulina	63
5.1.2.	Rezultati i diskusija o prisustvu i sadržaju patulina u proizvodima od jabuka	65
5.1.2.1.	Rezultati prikazani po godinama uzorkovanja	65
5.1.2.2.	Rezultati sumirani za period trajanja istraživanja	74
5.1.2.3.	Razmatranja različitih faktora koji utiču na kontaminaciju patulinom	81
5.1.2.4.	Rezultati statističke analize	84
5.1.2.5.	Podaci u literaturi o prisustvu patulina u proizvodima od jabuka	89
5.2.	ANALIZA OSTATAKA PESTICIDA	91
5.2.1.	Materijal i metode za analizu ostataka pesticida	91
5.2.1.1.	Vrsta i brojnost uzoraka za analizu ostataka pesticida	91
5.2.1.2.	Analitička metoda za analizu ostataka pesticida	91
5.2.1.3.	Statističke metode za analizu ostataka pesticida	92
5.2.2.	Rezultati i diskusija o ostacima pesticida u proizvodima od jabuka	92
5.2.2.1.	Prisustvo i sadržaj ostataka pesticida u proizvodima od jabuka	92
5.2.2.2.	Podaci u literaturi o prisustvu ostataka pesticida u sokovima od voća	98
5.3.	ANALIZA TOKSIČNIH METALA	101
5.3.1.	Materijal i metode za analizu toksičnih metala	101
5.3.1.1.	Vrsta i brojnost uzoraka za analizu toksičnih metala	101
5.3.1.2.	Analitička metoda za određivanje toksičnih metala	101
5.3.2.	Rezultati i diskusija o toksičnim metalima u proizvodima od jabuka	102
5.3.2.1.	Prisustvo i sadržaj toksičnih metala u proizvodima od jabuka	102
5.3.2.2.	Podaci u literaturi o prisustvu toksičnih metala u sokovima od voća	102
6.	OCENA BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA	106
6.1.	METODOLOGIJA ZA OCENU BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA	106
6.2.	ZAKONSKA OSNOVA	106
6.2.1.	Patulin	106
6.2.2.	Ostaci pesticida	106
6.2.3.	Toksični metali	107
6.3.	REZULTATI I DISKUSIJA O OCENI BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA	107
6.3.1.	Patulin	107
6.3.2.	Ostaci pesticida	108
6.3.3.	Toksični metali	109
7.	PROCENA IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU I KARAKTERIZACIJA RIZIKA	110
7.1.	METODOLOGIJA ZA PROCENU IZLOŽENOSTI I KARAKTERIZACIJU RIZIKA	110
7.1.1.	Ulazni elementi	110
7.1.2.	Procena izloženosti populacije determinističkim pristupom	112
7.1.3.	Procena izloženosti populacije probabilističkim pristupom	112
7.1.4.	Karakterizacija rizika	112
7.2.	REZULTATI I DISKUSIJA O PROCENI IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU I KARAKTERIZACIJI RIZIKA	113
7.2.1.	Deterministička procena izloženosti i karakterizacija rizika	113
7.2.2.	Probabilistička procena izloženosti i karakterizacija rizika	115
7.2.3.	Uticaj biodostupnosti patulina na procenu izloženosti populacije	118
7.2.4.	Podaci u literaturi o izloženosti različitih populacija patulinu	120
7.3.	NESIGURNOSTI POVEZANE SA PROCENOM RIZIKA	122
8.	ZAKLJUČAK	123
9.	LITERATURA	127

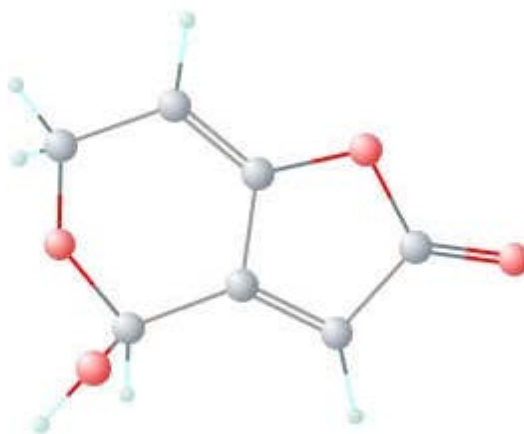
LISTA SKRAĆENICA

Skraćenica		
5-HMF	5-Hydroxymethylfurfural	5-hidroksimetilfurfural
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	Atomska apsorpciona spektrometrija
AOAC	Association of Official Analytical Chemistry	Oficijalna asocijacija analitičkih hemičara
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Hemijska jonizacija pod atmosferskim pritiskom
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization	Fotojonizacija pod atmosferskim pritiskom
ATP	Adenosine Triphosphate	Adenozin trifosfat
BCA	Bio-control Agents	Biokontrolni agens
CAS	Chemical Abstract Service	Služba za sažetke i ostale informacije iz područja hemije. Jedinstven numerički identifikator hemijskih jedinjenja, polimera, bioloških komponenata, smeša i legura.
CFU/mL	Colony Forming Unit	Jedinice formiranja kolonija bakterija
CV-AAS	Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy	Atomska apsorpciona spektroskopija - generisanje hladnih para
DEET	Diethyltoluamide	Dietiltoluamid
DNK		Dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH*	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil radikal
EC	European Commission	Evropska komisija
EGF	Epidermal Growth Factor	Epidermalni faktor rasta
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	Receptor epidermalnog faktora rasta
ESI	Electrospray ionization	Elektrosprej jonizacija
EU	European Union	Evropska unija
FAPAS	Food Analysis Performance Assessment Scheme	Šema za procenu performansi analize hrane
GC	Gas Chromatography	Gasna hromatografija
GC-ECD	Gas Chromatography - Electron Capture Detector	Gasna hromatografija sa detektorom zahvata elektrona
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry	Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom
GH	Growth Hormone	Hormon rasta
GSH	Glutathione	Glutation
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point	Analiza opasnosti i kritične kontrolne tačke
HGAFS	Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry	Atomska fluorescentna spektrometrija - generisanje hidrida
HLB	Hydrophilic-lipophilic balance	Hidrofilno-lipofilni balans
hOATs	human Organic Anion Transporters	Organski anjonski transporteri kod ljudi
hOCTs	human Organic Cation Transporters	Organski katjonski transporteri kod ljudi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Tečna hromatografija visokih performansi
HQ	Hazard Quotient	Količnik opasnosti
IARC	The International Agency for Research on Cancer	Internacionalna agencija za istraživanje karcinoma
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy	Induktivno kuplovana plazma sa atomskom emisionom spektroskopijom

Skraćena		
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry	Induktivno kuplovana plazma sa spektrometrijom masa
IFN- γ	Interferon γ	Interferon γ
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IL	Interleukin	Interleukin
IP		Interval poverenja
JECFA	The Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee on Food Additives	Ekspertski komitet za aditive u hrani
LAB	Lactic Acid Bacteria	Mlečno kiselinske bakterije
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry	Tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom
LD50	Lethal Dose, 50%	Srednja letalna / smrtna doza
LH	Luteinizing Hormone	Luteinizirajući hormon
LOD	Limit of Detection	Limit detekcije
LOQ	Limit of quantification	Limit kvantifikacije
MEECK	Microemulsion electrokinetic chromatography	Mikroemulziona elektrokinetička hromatografija
MEKC	Micellar electrokinetic chromatography	Micelarna elektrokinetička hromatografija
MEPS	Microextraction by packed sorbent	Mikroekstrakcija sa upakovanim sorbentom
OR	Odds ratio	Odnos šansi
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells	Mononuklearne ćelije periferne krvi
PCR	Polymerase Chain Reaction	Lančana reakcija polimeraze
PL	Pulsed Light	Pulsno svetlo
PMTDI	Provisional maximum tolerable daily intake	Provizioni maksimalni tolerantni dnevni unos
PVPP-C18	Polyvinylpyrrolidone-octadecyl	Polivinilpolipirrolidon-oktadecil
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe	Brza-laka-jeftina-efikasna-robustna-bezbedna
R ²	Regression coefficient	Regresioni koeficijent
RNK		Ribonukleinska kiselina
rOats	rat Organic Anion Transporters	Organski anjonski transporteri kod pacova
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktivne kiseonične vrste
RSD	Relative Standard Deviation	Relativna standardna devijacija
SD	Standard Deviation	Standardna devijacija
SH	Sulfhydryl	Sulfhidrilna
SOD	Superoxide Dismutase	Superoksid dismutaza
SPE	Solid-phase extraction	Ekstrakcija na čvrstoj fazi
SZO		Svetska zdravstvena organizacija
T3	Thyronine	Trijodtironin
T4	Thyroxine	Tiroksin
TBARS	Thiobarbituric Acid Reactive Species	Vrste koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom
TER	Transepithelial Resistance	Transepitelijalni otpor
Th 1	T-helper type 1 cells	T pomoćne ćelije tip 1
TLC	Thin Layer Chromatography	Tankoslojna hromatografija
TM		Telesna masa
TSH	Thyroid Stimulating Hormone	Tiroidni stimulirajući hormon
U	Measurement Uncertainty	Merna nesigurnost
UV	Ultraviolet	Ultraljubičasto zračenje

1. UVOD

Nutritivne preporuke promovišu konzumiranje voća i proizvoda od voća u sklopu raznovrsne i uravnotežene ishrane, zbog zdravstvenih dobiti koje obezbeđuju nutrijenti i fitohemikalije prisutne u ovoj kategoriji hrane. Posmatrano sa aspekta bezbednosti hrane, potrebno je istaći da voće i proizvodi od voća mogu biti kontaminirani toksičnim jedinjenjima, među kojima je i patulin.



Slika 1.1. Struktura patulina u 3D prikazu

Patulin (4-hidroksi-4H-furo[3,2-c]piran-2(6H)-on; CAS broj 149-29-1) (Slika 1.1) kao sekundarni metabolit određenih vrsta plesni, prvenstveno *Penicillium*, *Aspergillus* i *Byssoschlamys*, pripada grupi mikotoksina. Patulin je poliketid lakton, relativno mali molekul ($C_7H_6O_4$) rastvorljiv u vodi (1). Može se izolovati u obliku bezbojnih do belih kristala, tačke topljenja oko $110^{\circ}C$, koji sublimiraju u visokom vakuumu na $70 - 100^{\circ}C$. Osim u vodi, rastvorljiv je i u metanolu, etanolu, acetonu i etil ili amil acetatu, a u manjoj meri u dietil etru i benzenu. Stabilan je u kiselim rastvorima, ali se može degradirati višesatnim zagrevanjem u sumpornoj kiselini.

Patulin je prvi put izolovan iz plesni *Penicillium griseofulvum* i *Penicillium expansum*, 1943. godine, od strane Birkinshaw i saradnika (2), koji su tražili nove metabolite plesni sa

antibiotskim svojstvima. Klinički je testiran kao antibiotik i kao lek za prehladu, ali, interes za antibiotska svojstva patulina nestao je nakon otkrića da toksično deluje na ljude i životinje (3).

Plesni koje produkuju patulin mogu rasti na različitim vrstama hrane, uključujući voće, žitarice i sir (4). *P. expansum* je najznačajniji produktor patulina, a primarno je povezan sa truleži jabuka. Zaražene jabuke i proizvodi od jabuka predstavljaju najznačajniji izvor patulina u ishrani ljudi (5).

Patulin je dobro poznat toksikant u hrani, sa nepovoljnim imunološkim, neurološkim i gastrointestinalnim ishodima povezanim sa hroničnim unosom (3). Patulin je enteropatogeni mikotoksin - ima sposobnost da izmeni funkciju intestinuma (6,7). Internacionalna agencija za istraživanje karcinoma (*The International Agency for Research on Cancer, IARC*), zaključila je da patulin ne može biti klasifikovan kao humani karcinogen, na osnovu čega je uvršten u kategoriju 3 humanih karcinogena (8). Na osnovu drugih toksičnih efekata patulina, Ekspertski komitet za aditive u hrani (*The Joint Food and Agriculture Organization / World Health Organization Expert Committee on Food Additives, JECFA*) uspostavio je provizionni maksimalni tolerantni dnevni unos (*Provisional maximum tolerable daily intake, PMTDI*) patulina od 0,4 µg/kg telesne mase (TM) (9).

U cilju očuvanja javnog zdravlja, potrebno je nadgledati i kontrolisati izloženost populacije patulinu. U efikasne kontrolne mere ubrajaju se: primena dobre poljoprivredne prakse, adekvatni uslovi industrijske prerade i skladištenja, kao i zakonski propisi za ograničavanje nivoa patulina u hrani od interesa dostupnoj na tržištu (10).

U Evropskoj uniji (*European Union, EU*), zakonom je ograničen maksimalni dozvoljeni nivo patulina u hrani, a propisi u Republici Srbiji usklađeni su sa regulativom Evropske unije (11,12).

Republika Srbija je značajan proizvođač jabuka: u periodu od 2013. do 2015. godine proizvedeno je od 336 do 458 hiljada tona jabuka godišnje (13). Tokom godina rastao je i izvoz, od 35% do 53% (najvećim delom svežih jabuka), dok se preostali deo raspodeljivao na domaću potrošnju svežih jabuka i na potrebe prerađivačke industrije, uglavnom, za proizvodnju soka. Strategija za poljoprivredni razvoj Republike Srbije, u periodu 2014.-2024. godine (14), promoviše intenzivnu proizvodnju voća, posebno jabuka, zbog povoljnih klimatskih uslova i sastava tla, kao i dalji razvoj prerađivačke industrije koja koristi voće kao sirovinu. Vlada

Republike Srbije stimuliše poljoprivrednu proizvodnju usaglašenu sa GLOBALG.A.P. sistemom. Preporuka Evropske komisije (*European Commission, EC*) o prevenciji i smanjenju kontaminacije soka od jabuka patulinom (15) naglašava značaj primene preventivnih sistema osiguranja bezbednosti hrane, kao što je Sistem analize opasnosti i kritičnih kontrolnih tačaka (*Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP*). HACCP sistem je zasnovan na analizi rizika, počev od identifikacije opasnosti i njihove sledstvene eliminacije / umanjena do prihvatljivog nivoa, na odabranim kritičnim kontrolnim tačkama. Višestruki su faktori koji utiču na prisustvo patulina u voću i proizvodima od voća (16). Za razliku od klimatskih uslova, geografske lokacije i godine proizvodnje, na koje je teško uticati, faktori kao što su: sorta voća, tretman pre i posle berbe, upotreba pesticida za sprečavanje razvoja plesni, površinska oštećenja ploda i uslovi skladištenja, mogu biti bolje kontrolisani. Pranje voća i uklanjanje oštećenih delova su jeftini postupci za izbegavanje prisustva patulina u proizvodima od voća (17).

Voćni sok je proizvod dobijen mehaničkom preradom jedne ili više vrsta tehnološki zrelog, svežeg, ohlađenog ili smrznutog voća, konzervisan isključivo fizičkim postupcima, čiji ukus, boja i aroma moraju da budu karakteristični za vrstu voća od kojeg je sok proizveden. Voćni sok se može dobiti i ponovnim dodavanjem izdvojene količine vode koncentrisanom voćnom soku. Voćni nektar je proizvod koji se dobija dodavanjem vode i šećera i / ili meda u voćni sok ili u voćnu kašu ili koncentrovanu voćnu kašu, čiji sadržaj iznosi minimalno 50%. Voćni sok i voćni nektar, u zavisnosti od sadržaja nerastvorljivih sastojaka voća, može da se proizvodi kao bistar, mutan ili kašast (18).

Prisustvo patulina u različitim vrstama voća, primarno jabukama i proizvodima od jabuka, ali i drugom voću, kao što su kruške, narandže i grožđe i njihovi proizvodi, dokumentovano je u studijama iz različitih regiona sveta (na primer: 17,19-23), uključujući Evropu (na primer: 24,25).

Procena uticaja toksikanata na zdravlje je suštinska potreba i ozbiljan izazov, a zasniva se na toksikološkoj proceni jedinjenja i proceni izloženosti populacije. Toksikološka karakterizacija jedinjenja smatra se relevantnom na globalnom nivou, dok procena izloženosti, koja je populaciono specifična, zahteva podatke o prisustvu toksikanta u hrani dostupnoj populaciji od interesa, praćene podacima o navikama u ishrani date populacije.

U Republici Srbiji nije ranije sprovedena studija o prisustvu patulina u hrani, koja bi omogućila procenu izloženosti populacije i sledstvenog rizika za zdravlje. Stoga je osmišljeno i sprovedeno u delo istraživanje čiji će rezultati biti izloženi u nastavku. Imajući u vidu moguće / očekivano prisustvo i drugih kontaminanata u proizvodima od jabuka kao odabranom predmetu ispitivanja, preduzeto je i određivanje ostataka pesticida i toksičnih metala.

2. OPŠTI DEO

2.1. TOKSIČNOST PATULINA

2.1.1. Opšta toksičnost

Patulin ima jak afinitet prema sulfhidrilnim grupama, što objašnjava njegovo inhibitorno delovanje na mnoge enzime. U studijama akutne toksičnosti, teratogenosti i mutagenosti, modifikovane forme patulina sa cisteinom su pokazale nižu toksičnost od izvornog oblika (3).

2.1.2. Akutna toksičnost

Kod glodara, oralna srednja letalna doza (*Lethal Dose, 50%, LD₅₀*) patulina se kretala od 29 do 55 mg/kg TM, a kod živine, koja se pokazala kao manje osetljiva, 170 mg/kg TM. Kada se primeni intravenski, intraperitonealno ili subkutano, patulin pokazuje 3 do 6 puta višu toksičnost. Simptomi toksičnosti su: uznemirenost, a u nekim slučajevima grčevi, otežano disanje, kongestija pluća, edem, ulceracije, hiperemija i distenzija gastrointestinalnog trakta. Primećeno je da određena jedinjenja mogu da utiču na toksičnost patulina. Na primer, proadifen, inhibitor citohroma P450, značajno povećava toksičnost patulina, dok indukcija citohroma P450 nema uticaja (3).

2.1.3. Subakutna toksičnost

Subakutna toksičnost je najviše ispitivana na pacovima, pri čemu je primećeno smanjenje telesne mase, želudačne i crevne promene, kao i promene u bubrežnim funkcijama. Ponovljene doze dovodile su do znakova neurotoksičnosti (tremori i grčenje), kao i do inhibicije nekoliko enzima (ATPaza) u crevima i mozgu, što je posebno uticalo na metabolizam lipida. Slični klinički znakovi su uočeni i kod miševa, hrčaka i kokoši. Kod majmuna nije bilo znakova toksičnosti nakon primene dnevnih doza patulina od 5 do 500 µg/kg TM tokom četiri nedelje. Samo su majmuni, koji su primali 5 mg patulina/kg TM/dan u periodu od dve nedelje, počeli odbacivati hranu tokom poslednja tri dana studije. Selmanoğlu i Koçkaya (26) su pratili hormone štitne žlezde i testisa kod pacova koji su primali 0,1 mg patulina/kg TM/dan oralnim putem u periodu od 60 ili 90 dana. Šezdesetodnevna izloženost rezultovala je povećanjem nivoa testosterona u

plazmi i smanjenjem nivoa tiroksina (T4), a nije primećen uticaj na trijodtironin (T3), tiroidni stimulišući hormon (*Thyroid Stimulating Hormone, TSH*), luteinizirajući hormon (*Luteinizing Hormone, LH*) i hormon rasta (*Growth Hormone, GH*). Nakon izlaganja u trajanju od 90 dana, došlo je do povećanja nivoa testosterona i LH, bez kliničkih znakova. Histološki pregled štitne žlezde pokazao je limfoidnu ćelijsku infiltraciju i povećanje intersticijalnog tkiva. Primećeni su i edem, fibroza, lokalna hiperplazija Lajdigovih ćelija i dezorganizacija semenih cevčica, što je sve bilo povezano sa smanjenim brojem spermatozoida. Patulin je prepoznat kao enteropatogeni mikotoksin, koji indukuje gastrointestinalne poremećaje sa ulceracijama, distenzijama i krvarenjem, a u višim dozama, promene u bubrežnoj funkciji (3).

2.1.4. Citotoksičnost

Poznato je da je direktna ćelijska toksičnost često povezana sa povećanom ćelijskom akumulacijom toksičnih jedinjenja, a transport kroz membranu može biti prva faza u razvoju citotoksičnosti. Da bi se objasnio ulazak mikotoksina u ćelije, ispitivana je interakcija organskih anjonskih transportera kod ljudi i pacova (*human Organic Anion Transporters / rat Organic anion transporters, hOATs / rOats*) i organskih katjonskih transportera kod ljudi (*human Organic Cation Transporters, hOCTs*) sa mikotoksinima. Uzimajući u obzir lokalizaciju hOATs / rOats i hOCTs, smatra se da su ovi transporteri mogući put ulaza mikotoksina u bubrege i jetru, što dalje vodi do intracelularne akumulacije i ispoljavanja neželjenih efekata kod ljudi i pacova. Ovi transporteri posreduju u transportu organskih jona molekulske težine ispod 500 Da. Kao posledica sekretorne uloge, bubrezi i jetra su izloženi malim organskim jedinjenjima - mikotoksinima (50-500 Da). Patulin značajno inhibira preuzimanje organskih katjona posredovano sa hOAT1, hOAT3 i hOAT4 i preuzimanje organskih anjona posredovano sa hOCT2 (27).

Nekoliko studija je pokazalo da je patulin citotoksičan u različitim tipovima ćelija, kao što su protozoe (*Tetrahymena pyriformis*), granulozne ćelije pacova i kulture ćelija bubrega (LLC-PK₁ ćelije). Najčešći su efekti na transport jona preko biomembrana, što utiče na ravnotežu jona kalcijuma i na intracelularne jone natrijuma i kalijuma. Pri visokim dozama patulina, usled gubitka strukture ćelijske membrane, dolazi do lipidne peroksidacije, naglog influksa kalcijuma i oslobađanja laktat dehidrogenaze (28).

U studiji koja je proučavala ćelijske mehanizme i intestinalnu toksičnost patulina, dve humane epitelijalne ćelijske linije (adenokarcinom kolona HT-29-D4 i kolorektalni adenokarcinom Caco-2-14) su izložene patulinu. Rezultati su pokazali brzo i snažno smanjenje transepitelijalnog otpora (*Trans epithelial Resistance, TER*) u obe ćelijske linije. Kako TER odražava organizaciju čvrstog vezivanja, ovi podaci ukazuju na barijernu funkciju intestinalnog epitela. Inhibitorni efekat patulina na TER je u bliskoj vezi sa reaktivnošću sulfhidrilnih (*Sulphydryl, SH*) grupa. Naime, cistein i glutation (*Glutathione, GSH*) sprečavaju oštećenje ćelija izloženih patulinu, dok butionin sulfoksimin, specifični inhibitor sinteze glutationa, potencira toksičnost patulina (29).

Uopšteno, toksičnost patulina može se ispoljiti i putem indukcije oksidativnog stresa. Ispitivani su efekti oksidativnog stresa na različite ćelije sisara. Kao indikatori nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Reactive Oxygen Species, ROS*) korišćene su ćelije obojene fluorescentnim bojama, pri čemu je utvrđeno da patulin direktno povećava intracelularni oksidativni stres u ćelijama bubrega humanog embriona (HEK293) i humanim promijelocitnim leukemičnim ćelijama. Supresija CuZn-superoksid dismutaze (*Superoxide Dismutase, SOD*) u ćelijama sisara, rezultirala je povećanjem oštećenja membrane posredovanog delovanjem patulina, dok je preekspresija humane CuZn-SOD ili katalaze dovela do smanjenja oštećenja, ukazujući na učešće ROS u toksičnosti patulina. Ćelije sisara se od delovanja ROS brane antioksidativnim enzimima, superoksid dismutazama, koje konvertuju štetni superoksid anjon u vodonik peroksid, koji se metaboliše u vodu i kiseonik pod dejstvom katalaze i glutation peroksidaze. Slobodni radikali i drugi ROS dovode do oksidativnog stresa, što direktno utiče na promene ćelija tokom starenja (30).

2.1.5. Genotoksičnost

Brojne studije su ispitivale genotoksičnosti patulina, i *in vitro* i *in vivo*. U *in vitro* testovima sprovedenim na bakterijama, plesnima i ćelijama sisara, zabeležena je pojava obrnute mutacije, hromozomske aberacije, usporavanje ćelijskog ciklusa, izmena sestrinskih hromatida, prekid / narušavanje sinteze dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), neplanska sinteze DNK i popravka DNK (28).

Proučavan je aneuploidni i klastogeni potencijal patulina određivanjem inhibicije mikrotubula merenjem indukcije zastoja mitoze i mikronukleusa u kulturi V79 ćelija kineskog hrčka

(fibroblasti pluća). Patulin je inhibirao polimerizaciju mikrotubula kovalentnim vezivanjem za reaktivne tiol grupe mikrotubula. Smatra se da aneuploidni i klastogeni potencijal mogu da doprinesu karcinogenosti patulina u dugoročnim studijama na životinjama (31).

Patulin izaziva strukturno oštećenje DNK unakrsnim vezivanjem, zagrađivanjem nukleoplazmatskog mosta, što ima za posledicu nastanak mikronukleusne formacije. Strukturno oštećenje DNK može dovesti do kašnjenja ćelijskog ciklusa, što za posledicu može imati amplifikaciju centrozoma i formiranje multipolarnih mitotskih vretena. Mikronukleusni test i analiza nukleoplazmatskog mosta su sprovedeni radi procene genotoksičnosti patulina u V79 ćelijama. Sa povećanjem koncentracije patulina, proliferacija ćelija je neznatno smanjena, ali je efekat bio mnogo više izražen u ćelijama prethodno tretiranim sa butionin sulfoksiminom. Pri najvećoj koncentraciji patulina od 1 μ M, proliferacija u ćelijama prethodno tretiranim sa butionin sulfoksiminom bila je skoro potpuno blokirana (32).

Patulin je indukovao mutacije u kultivisanim ćelijama sisara (V79), dovodeći do prekida DNK lanca, oksidativne modifikacije DNK i pojave unakrsnih veza između DNK-DNK lanaca (33).

Ispitivani su genotoksični efekti patulina na mozak, bubrege, jetru i mokraćnu bešiku miša korišćenjem *in vivo* Komet testa. Genotoksičnost je procenjena na osnovu merenja sadržaja glutaciona i nivoa supstanci koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (*Thiobarbituric Acid Reactive Species, TBARS*). Patulin je davan muškim CF-1 miševima, intraperitonealno u dozi od 1-3,75 mg/kg. Efekti su bili dozno zavisni, a najveće doze patulina su indukovale prekid DNK lanca u mozgu (indeks oštećenja u hipokampusu se povećao 3,5 puta, a u jetri i bubrezima tri puta). Zabeleženo je i smanjenje nivoa glutaciona (oko 2,5 puta u hipokampusu) i povećanje lipidne peroksidacije (oko 3,5 puta u hipokampusu). Ovi nalazi su ustanovili postojanje međuodnosa prooksidativnog i genotoksičnog efekta patulina. Pri genotoksičnim dozama došlo je do povećanja nivoa TBARS (osim u mokraćnoj bešici). Davanjem *N*-acetil cisteina pre izvođenja testa smanjeno je patulinom indukovano oštećenje DNK i lipidna peroksidacija, normalizovan je ćelijski nivo GSH, glavnog ne-enzimskog antioksidativnog odbrambenog molekula, i smanjen je nivo TBARS. U mokraćnoj bešici ni pri jednoj od testiranih doza nije uočeno oštećenje DNK, dok je mozak bio glavni ciljni organ za patulinom indukovano oštećenje DNK (i to sa najvećim stepenom oštećenja). Najverovatniji razlozi su visoka metabolička

aktivnosti, visok lipidni sadržaj i nizak kapaciteta popravke DNK u mozgu. Međutim, dobijeni podaci se ne mogu direktno primeniti na ljude, zbog drugačijeg puta unosa patulina (uzimanjem hrane, inhalacijom ili dermalnim kontaktom), za razliku od intraperitonealne aplikacije kod miševa. Navedeni rad je prvi ukazao na glavne organe (mozak, jetra i bubrezi) za uočavanje genotoksičnosti patulina nakon sistemske primene. Razlog za povećanu ćelijsku akumulaciju patulina u ovim organima je specifični membranski transport, odnosno prisustvo organskih anjonskih i katjonskih transportera kod ljudi, kojih ima najviše u navedenim organima (34).

Nekoliko studija je pokazalo da patulin deluje kao klastogen u ćelijama sisara, na primer, indukujući strukturne hromozomske aberacije u kulturama V79 ćelija kineskog hrčka. Hromozomske aberacije i genetičke mutacije indukovane patulinom su uočene u FM3A ćelijama karcinoma dojke miša i u L5178Y ćelijama limfoma miša. Hromozomske i hromatidne praznine i pauze su izazvane patulinom u ćelijama jajnika kineskog hrčka, ali ne i u humanim limfocitima periferne krvi. Slične razlike u osetljivosti različitih ćelijskih sistema na genotoksičnu aktivnost patulina su primećene u odnosu na sestrinske hromatide, koje su indukovane u ćelijama jajnika kineskog hrčka i humanim limfocitima periferne krvi, ali ne i u V79 ćelijama kineskog hrčka. Nakon tretmana sa patulinom dobijen je i dokaz za oksidativno oštećenje DNK u humanim embrionalnim ćelijama bubrega. Takođe, zapaženo je da askorbinska kiselina smanjuje indukciju mikronukleusa i hromozomskih aberacija u patulinom tretiranim V79 ćelijama (3).

Iako postoje različiti podaci o genotoksičnosti patulina, većina testova sprovedenih na ćelijama sisara bila je pozitivna, dok su testovi na bakterijama, uglavnom, bili negativni. Pored toga, neke studije pokazuju da patulin narušava sintezu DNK. Genotoksični efekti mogu biti povezani sa sposobnošću patulina da reaguje sa sulfhidrilnim grupama, inhibira enzime uključene u replikaciju genetičkog materijala i izaziva oksidativna oštećenja. Na osnovu raspoloživih podataka, Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je zaključila da je patulin genotoksičan (3).

2.1.6. Karcinogenost

U nekoliko studija dugoročne toksičnosti kod pacova oralno izloženih patulinu u dozama od 0,1 do 2,5 mg/kg TM/dan, u trajanju od 74 do 104 nedelje, nije utvrđena pojava tumora. Prema podacima IARC, patulin je klasifikovan u grupu 3 kao “ne klasifikovan da ima kancerogenu aktivnost na ljude” (3).

2.1.7. Embriotoksičnost i teratogenost

U studijama na pacovima kojima je patulin intraperitonealno unet u dozama od 1,5 mg/kg TM/dan, uzrokovao je smanjenje telesne mase kod potomaka, a pri dozi od 2 mg/kg TM pobačaj svih embriona. Kod miševa, ista oralna doza je izazvala smrt potomaka sa krvarenjima mozga, pluća i kože. Patulin ubrizgan u kokošja jaja pokazao je embriotoksični efekat pri dozama od 2,35 do 68,7 µg/jajetu, u zavisnosti od starosti embriona, i teratogeni efekat pri dozama od 1 do 2 µg/jajetu (3).

2.1.8. Imunotoksičnost

Patulin može da promeni imunološki odgovor domaćina. Mnogobrojne *in vitro* studije su pokazale da patulin inhibira nekoliko funkcija makrofaga. Izlaganjem alveolarnih makrofaga pacova patulinu, dolazi do inhibicije sinteze proteina i izmenjene funkcije membrane. Patulin, takođe, smanjuje fagozom–lizozom funkciju, fagocitozu, mikrobiološku aktivnost u makrofagima miševa, kao i proizvodnju kiseonika i lizozomalnih enzima (3).

In vitro studije

Studije na peritonealnom eksudatu ćelija miševa, prethodno inkubiranih patulinom u dozi od 0,01-2 µg/ml u toku 2h, ustanovile su smanjenu fagocitozu i fagozom–lizozom fuziju pri koncentracijama većim od 0,1 µg/mL, dok su lizozomski enzimi i mikrobiološka aktivnost bili smanjeni pri dozama iznad 0,5 µg/mL, a proizvodnja kiseonika inhibirana iznad 2 µg/mL. Patulin je ispoljio stimulativni efekat na splenocite miševa pri nižim koncentracijama (1-10 nM) i jak inhibitorni efekat na proliferaciju limfocita pri višim koncentracijama, u zavisnosti od tipa korišćenog mitogena. Patulin u koncentracijama od 0,25-1 µg/mL smanjuje hemotaksični faktor neutrofilnih granulocita psa i favorizuje migraciju ćelija, dok pri višim koncentracijama inhibira oslobađanje superoksid jona od neutrofila, ali ne menja sposobnost fagocitoze *Saccharomices*

cerevisias. Imunosupresivni efekat objašnjava se vezivanjem za SH grupe prisutne na neutrofilnoj membrani (28).

Izlaganje dece patulinu smanjuje broj T pomoćnih ćelija tipa 1 (*T-helper type 1 cells, Th 1*) u perifernoj krvi i predstavlja faktor rizika za razvoj alergije. Zbog toga je ispitan uticaj patulina na mononuklearne ćelije periferne krvi (*Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC*) kod čoveka. Inkubacija CD3/CD28-stimulišućih PBMC zdravih donora sa patulinom (64,8 ng/mL) tokom 24h, rezultovala je inhibicijom (50%) interferona γ (IFN- γ), a u dozi od 243,2 ng/mL istim procentom inhibicije interleukina-4 (IL-4). U prisustvu patulina kod anti-CD3/CD28/CD40 stimulišućih PBMC, došlo je do supresije sekrecije IFN- γ , dok na IL-4 nije bilo uticaja. Patulin smanjuje alergen-specifičnu ekspresiju IFN- γ mRNK, dok IL-4 mRNK ekspresija ostaje nepromenjena. Ovi podaci ukazuju na ulogu patulina u povećanju alergijske preosetljivosti (28).

Nedavno je otkriveno da patulin može da smanji sekreciju citokina IFN- γ i IL-4 u humanim makrofagima i IL-4, IL-13, IFN- γ i IL-10 u humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi i u T ćelijama. Slično tome, Marin i saradnici (35), koristeći ćelije timusa EL-4, primetili su smanjenje u proizvodnji IL-2 i IL-5, pri koncentraciji patulina od 500 ng/mL. Ovo smanjenje sekrecije citokina nije bilo uzrokovano citotoksičnim efektom patulina, već trošenjem intracelularnog GSH (3).

In vivo studije

U *in vivo* studijama na miševima ukazano je na promenljive efekte patulina na imuni sistem. Ovi efekti uključuju povećan broj T limfocita slezine, smanjenu koncentraciju imunoglobulina u serumu, produžen odgovor na preosetljivost i povećan broj neutrofila, kao i otpornost na infekcije izazvane delovanjem *Candida albicans* (3).

Miševima je, svakodnevno, tokom 28 dana, putem sonde, davan patulin u dozama od 0,08 do 2,56 mg/kg TM. Ove doze su približno ekvivalentne procenjenom nivou izloženosti kod ljudi. Promene u broju imunih ćelija su uključile: smanjenje broja leukocita periferne krvi i limfocita (posmatrano na 1,28 i 2,56 mg toksina/kg TM/dan), povećan broj monocita slezine i prirodnih ćelija ubica (0,08 mg toksina/kg TM/dan), povećan broj citotoksičnih T limfocita (na 2,56 mg/kg TM/dan) i promene u procentu imunoglobulina (Ig)+, CD3+, CD4+/CD8- i CD4-/CD8+ limfocita u slezini. Ove promene u broju ćelija ne odražavaju funkcionalne promene. Nije bilo

merljivih promena u imunoj funkciji miševa tretiranih patulinom: mešovito leukocitnog odgovora i funkcije prirodnih ćelija ubica. Autori su zaključili da izloženost patulinu, na nivoima koji su u skladu sa izloženošću ljudi putem hrane, ne bi dovela do promene imunog odgovora (3).

Ispitivani su efekti patulina na timus muških pacova starosti 5 do 6 nedelja, kojima je davan patulin oralnim putem u dozi od 0,1 mg/kg TM/dan, 60 i 90 dana. Timus igra glavnu ulogu u razvoju i održavanju imunog sistema. Najrazvijeniji je odmah nakon rođenja, a posle puberteta počinje da se smanjuje, što se smatra glavnim uzrokom sa godinama (starošću) povezanog smanjenja funkcije imunog sistema. Tkivo timusa proizvodi epidermalni faktor rasta (*Epidermal Growth Factor, EGF*), koji je jedan od kritičnih regulatornih molekula u produkciji citokina, uključujući IL-6, i može da posluži kao modulator razvoja T ćelija kod ljudi. Epitelijalne ćelije timusa sadrže receptor epidermalnog faktora rasta (*Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) i mogu biti stimulisane na proliferaciju od strane EGF. EGFR je transmembranski protein sa intrizičnom tirozin kinaza aktivnošću. Preko nekoliko puteva utiče na angiogenezu, apoptozu, ćelijski ciklus, ćelijsku mobilnost i invazivnost tumora. Timus tretiranih pacova pokazao je znakove krvarenja, hiperplazije ćelijske plazme, dilatacije i fibroze kore, uvećanja intestinalnog tkiva između režnjeva timusa, uvećanja masnog tkiva, tanjenja kore i zamagljivanje kortikomedularne demarkacije. Međutim, nije bilo razlike u EGF i EGFR imunoreaktivnosti između tretirane i kontrolne grupe pacova. Kod pacova tretiranih patulinom uočeno je smanjenje težine timusa, ali ne značajno. Stanjivanje korteksa timusa bilo je značajno veće u grupi koja je bila izložena patulinu 90 dana, nego u kontrolnoj grupi, dok je grupa izložena 60 dana pokazala zadebljanje korteksa timusa, koji se značajno razlikovao od kontrolne grupe. To ukazuje da produžena izloženost patulinu za vreme rasta može izazvati pad imune funkcije. Opšte je prihvaćeno da je timus mladih životinja podložniji neurotoksičnim supstancama od timusa odraslih životinja (36).

2.1.9. Neurotoksičnost

U studiji na pacovima testirana je neurotoksičnost patulina nakon jednokratne primene (1,6 mg/kg TM) u poređenju sa kontrolnom grupom. Kod patulinom tretiranih životinja primećene su konvulzije, tremor, oslabljeno kretanje, ukočenost zadnjih ekstremiteta i podrhtavanje glave. Patulin inhibira acetilholinesterazu i NaK-ATPazu u cerebralnoj hemisferi, malom mozgu i produženoj moždini. Istovremeno, u ovim delovima mozga primećeni su povišeni nivoi acetilholina (28).

2.2. PREGLED DOSTUPNE LITERATURE O PRISUSTVU I SADRŽAJU PATULINA U PROIZVODIMA OD JABUKA

Dosadašnja istraživanja prisustva i sadržaja patulina u komercijalno dostupnim proizvodima od voća, među kojima preovlađuju proizvodi koji sadrže jabuke, pokazala su široku rasprostranjenost patulina i visoku varijabilnost njegovog sadržaja, zavisno, pre svega, od vrste proizvoda (sok od jabuka, koncentрати soka od jabuka, mešani voćni sokovi, kaše i kompoti, jabučni cideri), geografskog područja, vremenskog perioda obuhvaćenog istraživanjem, tipa poljoprivredne proizvodnje (konvencionalni, organski, integrisani), mestu produkcije (lokalni i uvezeni proizvodi), veličini proizvodnje (industrijska i zanatska). Poređenje rezultata različitih autora kada su u pitanju učestalost pojave i sadržaj patulina, veoma je osetljivo i komplikovano, zbog nepotpunosti informacija dostupnih u publikacijama, razlika u broju analiziranih uzoraka, vrednosti limita detekcije i kvantifikacije, kriterijuma odabira kontaminiranih uzoraka (nivo patulina veći od limita detekcije ili od limita kvantifikacije), iskazivanja prosečne vrednosti u odnosu na kontaminirane uzorke ili u odnosu na ukupan broj uzoraka, kao i drugih promenljivih.

Za vrste proizvoda koje su ispitivane i u ovom istraživanju (sokovi od jabuka i hrana za odojčad i malu decu), podaci iz poslednje decenije (posle 2007. godine) su prikazani uz diskusiju rezultata dobijenih u ovom istraživanju, osim gde je zbog celovitosti razmatranja bilo potrebno integrisati sve dostupne podatke.

2.2.1. Proizvodi od jabuka izuzev sokova i hrane za odojčad i malu decu

Koncentрати sokova od jabuka

Voćni koncentрати se obično rekonstituišu pre direktnog konzumiranja kao voćni sok, ili bezalkoholni osvežavajući napici, ili se koriste za proizvodnju voćnih likera, sirupa i slično (37).

Iako je patulin detektovan u 100% testiranih uzoraka u grčkoj studiji objavljenoj 2008. godine (25), ni jedan nije prekoračio maksimalnu dozvoljenu koncentraciju, a prosečni sadržaj patulina u koncentrovanim voćnim sokovima iznosio je 10,5 µg/kg. Najviši sadržaj patulina pokazali su koncentrovani voćni sokovi od jabuka poreklom iz Turske (18,1-36,8 µg/kg) i jedan uzorak koncentrovanog voćnog soka od kajsija poreklom iz Kine (15,3 µg/kg) (25). U španskoj studiji

objavljenoj 2011. godine (37), u ne-rekonstituisanim voćnim koncentratima jabuka, patulin je nađen u 42,4% uzoraka, u opsegu koncentracija od 9,3-74,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, sa prosečnom koncentracijom kontaminiranih uzoraka od 36,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i registrovanih 15,2% neusaglašenih uzoraka. U ne-rekonstituisanim voćnim koncentratima krušaka, dobijene su veće vrednosti u odnosu na uzorke od jabuka, sa 50% uzoraka pozitivnih na patulin (svi u koncentraciji iznad regulatorne granice), u opsegu koncentracija od 90,4 do 126,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i sa prosečnom koncentracijom kontaminiranih uzoraka od 107,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$. U ne-rekonstituisanim voćnim koncentratima bresaka ni jedan uzorak nije prekoračio maksimalno dozvoljenu koncentraciju patulina (37). U Turskoj su u periodu od 1996. do 1999. godine (38) utvrđene prosečne koncentracije patulina od 19-63 $\mu\text{g}/\text{L}$, sa 8-48% uzoraka koji su prekoračili maksimalno dozvoljenu koncentraciju. Niže srednje godišnje i maksimalne vrednosti patulina, kao i niži udeo neusaglašenih uzoraka koncentrata sokova od jabuka, zabeleženi su u 1997., 1998. i 1999. godini u odnosu na 1996. godinu. Maksimalni nivo patulina, nađen u jednom od 234 uzorka iz 1996. godine, iznosio je 376 $\mu\text{g}/\text{L}$. Studija sprovedena u Iranu (publikovana 2005. godine) (39) u kojoj su ispitana 23 koncentrata soka od jabuka, pokazala je visoku prisutnost patulina (78%), sa maksimalnim nivoom patulina od 148,8 $\mu\text{g}/\text{L}$ i srednjom koncentracijom od 61,7 $\mu\text{g}/\text{L}$, pri čemu je 56% uzoraka prekoračilo regulatornu granicu, sa napomenom da vrednosti ispod 15 $\mu\text{g}/\text{L}$ nisu uzete u obzir pri statističkoj obradi podataka. Dve studije sprovedene u Tunisu, publikovane 2007. i 2015. godine, pokazale su značajno različitu kontaminaciju patulinom u koncentratima soka od jabuka: u prvoj, samo jedan od 15 uzoraka sadržao je patulin u koncentraciji 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (40), dok je u drugoj studiji udeo kontaminiranih među 30 ispitanih uzoraka iznosio 80%, sa najvećom koncentracijom od 889 $\mu\text{g}/\text{L}$ i prosečnim sadržajem u kontaminiranim uzorcima od 158 $\mu\text{g}/\text{L}$ (sa napomenom da se voćni koncentrat obično rekonstituišu pre konzumacije) (41). Dugoročna studija sprovedena u Kini, najvećem proizvođaču i izvozniku koncentrata sokova od jabuka u svetu, u periodu od 2006.-2010. godine (21), pokazala je visoku prisutnost patulina među 1987 ispitanih uzoraka koncentrata soka od jabuka (98%), sa prosečnom koncentracijom od 8,44 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ali samo 0,2% neusaglašenih uzoraka (sezona 2007.-2008., maksimalna koncentracija 78 $\mu\text{g}/\text{kg}$). U kineskoj studiji sprovedenoj 2009. godine (42), kojom je obuhvaćeno 20 koncentrata soka od jabuka, maksimalni sadržaj patulina iznosio je 94,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, srednja vrednost 28,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a 30% uzoraka su prekoračili dozvoljeni limit.

U istraživanju sprovedenom u Sjedinjenim Američkim državama (20), 13% koncentrata soka od jabuka bilo je pozitivno na patulin (prosečni sadržaj 473 µg/L), sa 7,1% neusaglašenih uzoraka i maksimalnom koncentracijom od čak 2700 µg/L.

Cideri

Opšte je poznato da koncentracija patulina opada za vreme alkoholne fermentacije soka od jabuka u procesu proizvodnje cidera, tako da se u ciderima ne očekuje prisustvo patulina (43). Patulin nije detektovan u jabučnim ciderima u studijama publikovanim u Španiji (2007. g.) (44), u Holandiji (45), u Tunisu (2007. g.) (40) i u Portugaliji (2009. g.) (46). Međutim, neki autori su ipak detektovali patulin u ciderima, a kao razlog navodi se da je sok od jabuka dodat u cider nakon fermentacije, da bi se podesio sadržaj šećera i ukus (43), ili da degradacija patulina za vreme fermentacije nije bila potpuna (47). Učestalost detekcije patulina u ciderima kretala se od 25% u Južnoj Africi (2001. g.) (48), 43% u Belgiji (49), 50% (1 od 2 cidera) u Francuskoj (2005. g.) (43), do 100% (2 cidera) u Češkoj (2015. g.) (50), uz napomenu da su istraživanja sprovedena na malom broju uzoraka. Prosečna koncentracija patulina u kontaminiranim uzorcima kretala se od 3,4 µg/L u Belgiji (49) do 7,5 µg/L u Južnoj Africi (48), odnosno, kada su u obzir uzete prosečne koncentracije svih uzoraka cidera, od 19,5 µg/L u Francuskoj (43) do 30,3 µg/L u Češkoj (50), pri čemu nijedan uzorak nije prekoračio maksimalno dozvoljenu koncentraciju patulina od 50 µg/L. U istraživanju u Sjedinjenim Američkim Državama, prisustvo patulina je praćeno u 493 jabučna cidera u jesenjoj sezoni 2002., 2003. i 2004. godine (20). Patulin je detektovan u 18,7% uzoraka (opseg koncentracija 4,6-467,4 µg/L, prosečna koncentracija kontaminiranih uzoraka 36,9 µg/L), a 2,2% imalo je koncentraciju patulina iznad dozvoljene. Najveća učestalost prisustva patulina utvrđena je u jabučnim ciderima koji su podvrgnuti procesu termalne pasterizacije (28,4%), u odnosu na uzorke bez ikakve intervencije (17%) i uzorke na koje je primenjeno ultraljubičasto zračenje (*Ultraviolet, UV*) (13,5%). Prisustvo patulina bilo je najizraženije tokom 2004. godine (25,4%), u poređenju sa 2002. godinom (21,1%) i 2003. godinom (12,9%). Ovo istraživanje je sprovedeno na najvećem broju uzoraka do sada i prvo je koje je uzelo u razmatranje i uticaj mera kontrole bezbednosti hrane na nivo patulina u ciderima.

Proizvodi od jabuka u čvrstom stanju (kaše, kompoti, marmelade i slični proizvodi)

Kada su u pitanju proizvodi od jabuka u čvrstom stanju (kaše / pirei, kompoti, džemovi), namenjeni opštoj populaciji, izuzimajući odojčad i malu decu, najveći broj publikovanih studija potiče iz Španije (2007.-2013.godine), a učestalost detekcije patulina kretala se od 0% u kompotima i džemovima, na malom broju uzoraka (37,51), do 33% u kašama i / ili kompotima (44,52,53). Treba napomenuti da se među ovim studijama po značajnom broju uzoraka ističu dve: prva iz 2009. godine sa 77 uzoraka (52), u kojima je prosečna koncentracija kontaminiranih uzoraka iznosila 13,5 µg/kg, bez neusaglašenih uzoraka, i druga sa 23 uzorka (53), sa prosečnom koncentracijom kontaminiranih uzoraka od 22,5 µg/kg i 8,7% neusaglašenih uzoraka. Rezultati iz 2007. godine u istoj zemlji, sa sadržajem patulina u opsegu od 7,7-28,4 µg/kg, pokazuju prekoračenje maksimalno dozvoljene koncentracije patulina (zakonski limit za proizvode od jabuka u čvrstom stanju iznosi 25 µg/kg) (44). U Portugaliji je u periodu 2007.-2009. godine (54) ispitano 76 kaša od jabuka, a patulin je detektovan u 7%, bez neusaglašenih uzoraka. Maksimalne vrednosti patulina od 74,2 i 221 µg/kg u kašama od jabuka zabeležene su u studijama u Italiji (2003. g.) (55) i Argentini (2009. g.) (56), redom. Italijanska studija iz 2005. godine (47), pokazala je prisustvo patulina u 7% konvencionalnih i 36% organskih voćnih kaša (zbirno su prikazani rezultati i za kaše za odojčad i malu decu), sa niskim prosečnim koncentracijama od 0,11 i 0,18 µg/kg, redom. U argentinskoj studiji (56) učestalost prisustva patulina u marmeladi od jabuka iznosila je 23%, sa koncentracijama u opsegu od 17-39 µg/kg i prosečnom vrednošću kontaminiranih uzoraka od 27 µg/kg; u slučaju marmelade od krušaka zabeležen je jedan pozitivan uzorak (25 µg/kg), dok u uzorcima džema od jabuka patulin nije detektovan. U francuskoj studiji publikovanoj 2005. godine (43), patulin nije detektovan u ispitivanim kompotima, ali je u kolačima od jabuka prekoračio maksimalnu dozvoljenu koncentraciju u dva od šest uzoraka (60 µg/kg u piti od jabuka i 100 µg/kg u krofni sa jabukom), pri čemu treba napomenuti da je limit kvantifikacije metode bio visok (60 µg/kg). U holandskoj studiji objavljenoj iste godine (45), u kašama od jabuka (konvencionalnim i organskim), patulin nije kvantifikovan (limit kvantifikacije metode iznosio je 25 µg/kg). U istraživanju sprovedenom u Tunisu (2013. g.) (41), najveće koncentracije patulina u kompotu od jabuka, džemu od jabuka i džemu od krušaka iznosile su 77, 554 i 325 µg/kg, redom, sa prosečnom koncentracijom od čak 302 µg/kg u 33% pozitivnih uzoraka džema od jabuka. U džemu od jabuka na tržištu Kine,

prema publikaciji iz 2012. godine (57), patulin nije detektovan ni u jednom od 12 ispitanih uzoraka.

U studiji iz Južne Afrike (2008. g.) (58), od 8 uzoraka sušenih kolutića od jabuke, što je prvo ispitivanje takve vrste, dva uzorka su bila pozitivna na patulin, bez prekoračenja maksimalno dozvoljene koncentracije za patulin u čvrstim proizvodima od jabuka. U petogodišnjoj studiji (2000.-2004. g.) sprovedenoj u Češkoj (59) na 219 namirnica od voća, patulin je detektovan u 7,3% uzoraka sa prosečnom koncentracijom od 18,3 µg/kg, a maksimalna koncentracija od 3150 µg/kg zabeležena je u jednom uzorku sa borovnicama.

2.2.2. Sokovi od jabuka

U skladu sa geografskom lokalizacijom ovog istraživanja, prvo će biti prikazani dostupni rezultati studija sprovedenih u evropskim zemljama, a zatim i sa ostalih kontinenata. Nakon prikaza rezultata po državama, sumirane su studije koje su pratile specifične faktore koji mogu uticati na prisustvo i sadržaj patulina (konvencionalna / organska proizvodnja, bistri / mutni sokovi, vrsta voća – jabuka / mešani, voćni sadržaj – 50% / 100%).

Studije u Evropi

U italijanskoj studiji publikovanoj 2000. godine (60), u kojoj su proučavani sokovi od jabuka sa pulpom, utvrđene su koncentracije patulina u opsegu od 0,68 do čak 1150 µg/kg. Poređenje konvencionalnih i organskih sokova od jabuka ukazalo je na viši nivo kontaminacije patulinom u organskim sokovima (prosečni sadržaj 7,7 µg/kg, maksimalno 28,2 µg/kg) u odnosu na konvencionalne (1,0 i 3,0 µg/kg, redom). Nasuprot tome, rezultati studije publikovane 2003. godine (55) pokazali su ujednačeno prisustvo patulina u konvencionalnim i organskim sokovima od jabuka (43%), sa 14,3% konvencionalnih uzoraka neusaglašenih sa zakonskim ograničenjem. U periodu 2003.-2004. godina (47), procenat neusaglašenih uzoraka iznosio 3,0% i 8,3% u konvencionalnim i organskim sokovima, redom. U mešanim voćnim sokovima sa jabukom nije utvrđeno prisustvo patulina bez obzira na tip proizvodnje (55), dok je u sokovima od krušaka patulin nađen u 14% konvencionalnih (bez neusaglašenih) i 50% organskih sokova (12,5% neusaglašenih), a sokovi od drugog voća pokazali su sličan udeo pozitivnih uzoraka kao i sokovi od krušaka, ali bez neusaglašenih uzoraka (55). Dve italijanske studije publikovane 2007. godine

(24,61) pokazale su približan udeo patulinom kontaminiranih sokova od jabuka (48 i 58%), sa oko dvostruko višim udelom kontaminiranih uzoraka u grupi konvencionalnih (59%) u odnosu na organske sokove (28%) i niskim prosečnim sadržajem patulina u obe grupe (oko 9 µg/kg). Grupisanje sokova na bistre i mutne nije ukazalo na razlike u pojavi i sadržaju patulina, ali je podela na osnovu voćnog sadržaja (iznad i ispod 50%) rezultovala dvostruko, odnosno trostruko višim vrednostima dva posmatrana parametara u grupi sokova sa višim voćnim sadržajem (48%, 11,3 µg/kg) (24), za razliku od studije sprovedene 2008. godine, sa ujednačenim prisustvom patulina u obe grupe, ali gde su uzorci sa manje od 50% voćnog sadržaja imali višu prosečnu koncentraciju patulina (31,6 µg/L) u odnosu na uzorke sa više od 50% voćnog sadržaja (23,4 µg/L) (62). Kao razlog autori navode da uzorci sa manje od 50% voćnog sadržaja imaju lošiji kvalitet, jer polazne sirovine nisu pažljivo odabrane. Kada su sokovi od jabuka upoređeni sa mešanim sokovi koji sadrže i jabuke (27%, 4,5 µg/kg), uočen je dvostruko viši udeo kontaminiranih uzoraka i sadržaja patulina u sokovima od jabuka (24). U trećoj studiji publikovanoj 2007. godine (63), ali sa znatno manjim brojem uzoraka, mešani sokovi koji sadrže i jabuke pokazali su nizak udeo kontaminiranih uzoraka (8,3%).

Belgijska studija publikovana 2006. godine (64), pokazala je učestalost prisustva patulina u grupi od 177 sokova od jabuka od 12%, sa ujednačenim prisustvom patulina u konvencionalnim i organskim sokovima, ali četverostruko višim prosečnim sadržajem u organskim sokovima (43,1 µg/kg), uz 3,1% neusaglašenih uzoraka. Prethodna studija sprovedena u Belgiji 2001. godine (49) kao rezultat je dala 81% uzoraka pozitivnih na patulin (prosečni sadržaj u kontaminiranim uzorcima 9,0 µg/kg), ali bez neusaglašenih uzoraka. U istoj studiji sokovi su kategorizovani i prema poreklu na industrijske i domaće, ali među grupama nisu uočene značajne razlike. Obe nevedene studije su pratile i razlike između bistrih i mutnih sokova, pri čemu je zabeležena viša učestalost prisustva patulina u bistrim, a viši prosečni sadržaj u mutnim sokovima (49,64).

U petogodišnjoj studiji u Češkoj (59) analizirano je 294 uzoraka pića od voća, od čega je patulin nađen u 14,3%, sa prosečnom i maksimalnom koncentracijom od 4,3 i 81 µg/kg, redom.

Niska učestalost i nizak nivo kontaminacije zabeleženi su u ispitivanjima sprovedenim u Holandiji (2005. g.; 10%) (45), kao i u Švedskoj (1996.-1998. g.; 13%) (65), dok je u Danskoj 2006. godine zabeleženo 70% pozitivnih i 25% neusaglašenih uzoraka (66).

Važan faktor koji može da utiče na prisustvo patulina u sokovima od jabuka su konvencionalni ili organski tip poljoprivrede (47). Uticaj organske proizvodnje na prisustvo mikotoksina nije sasvim jasan. Naime, smanjena upotreba fungicida može dovesti do rasta plesni i produkcije mikotoksina, a smanjena upotreba insekticida, može rezultirati većim oštećenjima od strane insekata i posledično većoj invaziji plesni, prouzrokujući povećano stvaranje mikotoksina (64). Poređenjem evropskih studija, u cilju procene pojave i prosečne koncentracije patulina u sokovima iz ova dva tipa poljoprivredne proizvodnje, dobijaju se kontradiktorni rezultati. Važno ograničenje većeg broja publikovanih studija je mali broj uzoraka organskog porekla (studije u Belgiji (49), u Portugaliji (46,67) i u Španiji (68,69)), što otežava donošenje odgovarajućeg zaključka. Potrošači imaju predstavu da su organski proizvodi bezbedniji i nutritivno vredniji u poređenju sa konvencionalnim, međutim, sadržaj patulina može dostići visoke vrednosti u sokovima od organski gajenih jabuka (61). Zanimljivo je da su u Belgiji najveće koncentracije patulina nađene u sokovima koji su bili cenovno najskuplji, a radilo se o organskim uzorcima (64). Kako su veće vrednosti koncentracije patulina nađene u organskim mutnim u odnosu na konvencionalne mutne sokove od jabuka, isti autori su zaključili da su veće koncentracije posledica organske proizvodnje, a ne prisustva suspendovanih čvrstih čestica (64). Koncentracija patulina je bila statistički značajno veća u organskim, u odnosu na konvencionalne sokove od jabuka u studiji u Belgiji (2006. g.) (64) i u Italiji (2000. g.) (60). Ovi rezultati ukazuju na to da se prisustvo patulina mora pažljivo pratiti, a da je njegovo prisustvo češće u organskim, u odnosu na konvencionalne proizvode. Italijanske studije publikovane u periodu od 2003. do 2007. godine, nisu ustanovile značajne razlike u prosečnim koncentracijama patulina između organskih i konvencionalnih sokova od jabuka, uprkos većim vrednostima u organskim uzorcima (24,47,61), kao ni u proizvodima od jabuka (55), iako je učestalost detekcije u svim proizvodima (sokovi od jabuka, sokovi od krušaka, drugi sokovi i voćne kaše) bila značajno viša u organskim u odnosu na konvencionalne proizvode (47). Jedno od objašnjenja za odsustvo značajnih razlika je da se u proizvodnom procesu sa istom pažnjom pristupilo uklanjanju trulog i oštećenog voća (24). Ni u holandskoj studiji (45) nije bilo značajne razlike između organskih i konvencionalnih proizvoda na bazi jabuka.

Na prisustvo patulina u sokovima od jabuka može da utiče i konzistencija soka (bistri ili mutni) (70). Iako je učestalost pojave patulina u sokovima od jabuka pokazala visoku varijabilnost u

zavisnosti od konzistencije (udeo pozitivnih uzoraka u bistrim sokovima od jabuka bio je nezatno viši (24,49,64), ali i tri (53) i pet puta niži (54) u poređenju sa mutnim sokovima), viša prosečna koncentracija patulina zabeležena je u mutnim sokovima od jabuka (49,53,54,64). Belgijske studije publikovane 2003. (49) i 2006. godine (64), pokazale su kontradiktorne rezultate: u prvoj nije bilo statistički značajne razlike u prosečnoj koncentraciji patulina među kontaminiranim uzorcima između mutnih i bistrih sokova od jabuka, ali je u drugoj zabeležena značajno viša koncentracija patulina u mutnim u odnosu na bistre sokove. Mutni sokovi su bogatiji u proteinima u odnosu na bistre sokove zbog prisustva čvrstih čestica, a patulin može da interaguje sa proteinima. U nekim slučajevima, u zavisnosti od analitičke metode, patulin koji se veže za proteine ne može biti detektovan, što može dovesti do potcenjivanja sadržaja patulina i dobijanja različitih rezultata (53). Jedino je u studiji sprovedenoj u Italiji (24) prosečna koncentracija patulina bila viša u bistrim u odnosu na mutne sokove od jabuka, ali razlika nije bila statistički značajna.

Kada se razmatraju razlike između sokova od jabuka i mešanih voćnih sokova koji sadrže jabuke, pored grčke studije (25) u kojoj su zabeleženi isti nivo pojave i sadržaja patulina u obe grupe (100%, 5,6 µg/kg), ističu se još tri italijanske studije (24,55,62) u kojima su paralelno ispitivane obe vrste uzoraka. Međutim, u jednoj je pokazana statistički značajno viša učestalost pojave i viši prosečni sadržaj patulina u sokovima od jabuka u odnosu na mešane (mada je u grupi mešanih sokova zabeleženo i prekoračenje dozvoljene koncentracije u 1,2% uzoraka, u odnosu na 0% među sokovima od jabuka) (24), približno iste vrednosti u drugoj (62), dok u trećoj studiji u mešanim sokovima patulin nije detektovan, u odnosu na 40% pozitivnih uzoraka sokova od jabuka (55).

Studije van Evrope

Mediterranska zemlja, kakva je Tunis u klimatskom i geografskom smislu, pogoduje rastu plesni i proizvodnji mikotoksina, naročito od strane *P. expansum*, a od značaja su i socio-ekonomski uslovi (22). U tunižanskoj studiji objavljenoj 2007. godine (40), 16% od 25 sokova od jabuka i 15% od 20 mešanih voćnih sokova bilo je kontaminirano patulinom, ali ispod regulatornog kriterijuma, dok je u studiji sprovedenoj 2011. godine (22) učestalost pojave patulina u po 30 uzoraka čistih i mešanih sokova od jabuka iznosila 37% i 40%, redom, sa vrlo visokim

maksimalnim i prosečnim koncentracijama od 167 i 80 $\mu\text{g/L}$, odnosno 125 i 55 $\mu\text{g/L}$, u jednoj i drugoj grupi, sa ukupno 18% uzoraka preko maksimalno dozvoljenog nivoa. Najnovija istraživanja iz 2013. godine (41) pokazuju porast incidencije patulina u sokovima od jabuka (64%), kao i mešanim sokovima (50%), ali i značajan pad prosečnih koncentracija (46 i 28 $\mu\text{g/L}$, redom).

U studijama sprovedenim u Južnoj Africi učestalost pojave patulina u sokovima od jabuka iznosila je 15% (2001. g.) (48), 62% (2007. g.) (63) i 33% (2010. g.) (71), sa udelom neusaglašenih uzoraka od 0%, 12,5% i 10%, redom. U najnovijem istraživanju prosečna koncentracija patulina iznosila je 73 $\mu\text{g/L}$, sa maksimalnom koncentracijom od čak 1650 $\mu\text{g/L}$ (71), što su rezultati koji izazivaju zabrinutost. Autori studije iz 2007. godine (63), sproveli su i dodatno istraživanje na novih 14 uzoraka sokova od jabuka, kupljenih na mestima gde se snabdeva stanovništvo sa niskim primanjima, pri čemu su utvrdili udeo od 50% kontaminiranih, sa 36% neusaglašenih uzoraka i maksimalnom koncentracijom patulina od 166 $\mu\text{g/L}$.

U Turskoj je u periodu 1998.-2000. godina (72) patulin detektovan u 60% ispitanih sokova od jabuka, u koncentraciji od 19,1 do čak 733 $\mu\text{g/L}$, sa prosečnom koncentracijom kontaminiranih uzoraka od 140 $\mu\text{g/L}$ i 44% neusaglašenih uzoraka, dok su svi sokovi od jabuka ispitani u studiji publikovanoj 2004. godine (73) bili pozitivni na patulin (40,6-69,6 $\mu\text{g/L}$, prosečna koncentracija 49,5 $\mu\text{g/L}$, 20% neusaglašenih uzoraka).

Rezultati iranskih studija objavljenih u periodu od 2005. do 2014. godine, pokazali su visoku prisutnost patulina u sokovima od jabuka (69%-100%), sa udelom neusaglašenih uzoraka od 10,3% do 33% (17,39,74,75). Ova istraživanja karakteriše i značajan broj uzoraka, među kojima se izdvaja studija iz 2010. godine sa 150 ispitanih uzoraka (75), zatim, prosečne koncentracije patulina u rasponu od 27-62 $\mu\text{g/L}$ i izrazito visoke maksimalne koncentracije, čak do 285 $\mu\text{g/L}$ (39). Autori studije publikovane 2014. godine (17), ukazali su na probleme sa pranjem jabuka, tretmanom zagrevanja i skladištenja u fabrici, kao i korišćenjem manje kiselih jabuka u drugim studijama, opravdavajući na taj način viši procenat neusaglašenih uzoraka, u odnosu na predhodne studije (74,75). Međutim, u iranskoj studiji objavljenoj 2016. godine (76) zabeleženo je znatno poboljšanje, sa 52% kontaminiranih uzoraka, među kojima nijedan nije prekoračio maksimalno dozvoljenu koncentraciju (prosečna koncentracija 2,6 $\mu\text{g/L}$).

U Saudijskoj Arabiji (77) prosečna vrednost 8,3% kontaminiranih uzoraka sokova od jabuka u 2008. godini iznosila je 140 µg/kg za sokove iz lokalne industrijske proizvodnje, dok u uvezenim sokovima patulin nije detektovan.

Studiju publikovanu u Indiji (2008.g.) (78) karakteriše udeo kontaminiranih uzoraka od 20% među brendiranim sokovima od jabuka i mešanim sokovima, odnosno 28% u sokovima iz lokalnih prodavnica. Međutim, ono što je potrebno posebno istaći su visoke koncentracije patulina, u opsezima od 205-1839 µg/L i 24-325 µg/L (prosečna vrednost kontaminiranih uzoraka 845 i 191 µg/L), u brendiranim i lokalnim sokovima od jabuka, redom.

U Kini je sprovedeno više studija tokom poslednje decenije, a posmatrano hronološki situacija sa prisustvom patulina se menjala na sledeći način: 2007. g. (79) svih 6% pozitivnih uzoraka sokova od jabuka i jabuka i drugog voća sa prosečnom koncentracijom od 78,3 µg/L su prekoračili maksimalno dozvoljeni sadržaj patulina; 2010. g. (42) 7% neusaglašenih uzoraka sokova od jabuka i 20% mešanih sokova; 2012. g. (57) 8% pozitivnih uzoraka sa prosečnom koncentracijom od 35,4 µg/L, ali bez neusaglašenih uzoraka; 2017. g. (80) 15% pozitivnih uzoraka voćnih sokova, sa znatno nižom prosečnom koncentracijom od 13,1 µg/L, bez uzoraka preko dozvoljene granice.

Niska učestalost pojave i nizak nivo kontaminacije patulinom u sokovima od jabuka, bez neusaglašenih uzoraka, zabeleženi su u ispitivanjima sprovedenim na Tajvanu (2000. g.) (81), u Južnoj Koreji (2010. g.) (82) i Maleziji (2014. g.) (23), kao i u Japanu (2004. i 2005. g.) (83,84). U jednom od istraživanja sprovedenih u Japanu (84), ispitano je 179 sokova od jabuka i 9 sokova od mešanog voća. Patulin je detektovan u tri od 143 uzorka iz domaće proizvodnje (opseg koncentracija 6-10 µg/L), kao i u jednom od šest uzoraka iz uvoza (15 µg/L), dok se među preostalih 39 uzoraka iz domaće proizvodnje pripremljenih od uvezenih koncentrata našlo 13% pozitivnih uzoraka.

Brazilaska studija sprovedena 2004.-2005. godine (19) pokazala vrlo nizak udeo pozitivnih uzoraka i niske koncentracije patulina, za razliku od studije publikovane 2010. godine (85) u kojoj je zabeležena maksimalna koncentracija patulina u soku od jabuka od 51,6 µg/L.

2.2.3. Hrana za odojčad i malu decu

Iako su odojčad i mala deca visoki potrošači proizvoda na bazi jabuka, raspoloživ je manji broj studija koje su ispitivale hranu za odojčad i malu decu u poređenju sa proizvodima od jabuka namenjenim opštoj populaciji.

Na području Italije, u ispitivanju publikovanom 2000. godine (60), analizirano je 23 uzorka hrane za odojčad i malu decu, pri čemu su koncentracije patulina u svim uzorcima bile ispod zakonskog ograničenja od 10 µg/kg, bez razlike da li se radi o konvencionalnim ili organskim uzorcima. Studija publikovana 2003. godine (55) utvrdila je učestalost prisustva patulina u hrani za odojčad i malu decu iz organske proizvodnje od 20%, sa istim procentom neusaglašenih uzoraka, dok u konvencionalnim uzorcima patulin nije detektovan. Studija sprovedena 2003.-2004. godine (47), kao rezultat pokazala je 13% pozitivnih uzoraka (3/23 voćne kaše za bebe, jedna konvencionalna i dve organske), bez neusaglašenih uzoraka. Niska učestalost i nizak nivo kontaminacije zabeleženi su u ispitivanju sprovedenom tokom 2004.-2005. godine u Italiji, Francuskoj i Španiji (86), sa 8% pozitivnih i bez neusaglašenih uzoraka. U holandskoj studiji publikovanoj 2005. godine (45), patulin nije detektovan ni u jednom od uzoraka iz konvencionalne i organske proizvodnje, ali je primenjena metoda imala veoma visok limit kvantifikacije (25 µg/L). Petogodišnja studija iz Češke (59) na 310 uzoraka hrane od voća za bebe, pokazala je prisustvo patulina u 1% uzoraka, sa prosečnom koncentracijom od 0,14 µg/kg.

Među studijama sprovedenim van Evrope, najpovoljniji rezultati zabeleženi su na Tajvanu (81), gde među sokovima za bebe nisu nađeni kontaminirani uzorci, ali je primenjena metoda imala visok limit kvantifikacije (15 µg/L). U Kini je 2009. godine (42) zabeleženo 63% pozitivnih uzoraka, sa 37% uzoraka neusaglašenih u odnosu na zakonsko ograničenje za koncentraciju patulina u Evropi, odnosno 3,3% u odnosu na kineske propise (granična vrednost 50 µg/kg).

Tunižanske studije publikovane 2007. (40) i 2013. godine (22), pokazale su značajne razlike: u prvoj studiji patulin nije detektovan u voćnim kašama od jabuka i od drugog voća, dok je u drugoj studiji 28% uzoraka kompota bilo pozitivno i neusaglašeno (prosečna vrednost 68 µg/kg, maksimalna vrednost 165 µg/L).

U Južnoj Africi (2001. g.) (48), patulin nije detektovan ni u jednom od uzoraka voćnih kaša za odojčad, ali je više od polovine voćnih sokova bilo kontaminirano i kod sokova od jabuka i kod mešanih sokova, među kojima je bilo i 29% neusaglašenih.

2.3. PREGLED DOSTUPNE LITERATURE O IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU

Platforma za upravljanje rizikom za zdravlje ljudi usled prisustva toksičnih supstanci u hrani, definiše se na osnovu procene izloženosti datoj supstanci i njenog toksikološkog profila.

Na osnovu negativnih efekata patulina na zdravlje ljudi, od strane JECFA uspostavljen je PMTDI za patulin od 0,4 µg/kg telesne mase (9).

Za procenu izloženosti potrebno je raspolagati podacima o sadržaju toksične supstance u hrani i o potrošnji hrane od interesa. Kao rezultat naučne saradnje u okviru Evropske unije, 2002. godine objavljen je izveštaj o koncentraciji patulina u hrani i posledičnoj izloženosti humane populacije za većinu evropskih zemalja (5). Pri proceni izloženosti populacije toksičnim supstancama putem hrane, primenjuju se dva konceptualno različita pristupa, okarakterisana kao deterministički i probabilistički model. Za razliku od determinističkog, kojim se izloženost procenjuje direktno na osnovu sadržaja toksične supstance u hrani i količine konzumirane hrane, probabilistički metod uzima u obzir i druge faktore, kao što su interindividualne varijacije u potrošnji hrane, starost jedinke, sezonske i geografske varijacije, kulturološke, verske i ekonomske razlike (87). Izloženost se procenjuje za populaciju kroz definisane populacione grupe (na primer: odojčad, decu, adolescenate, odrasle i osobe starije dobi), s obzirom na visoku varijabilnost u osetljivosti, telesnoj masi i dnevnom unosu hrane od interesa. Poređenje procenjenih izloženosti iz različitih studija je veoma kompleksno, kako zbog brojnih objektivnih razlika, tako i zbog različitih pristupa u obradi i iskazivanju rezultata (53). Patulin se najčešće javlja u jabukama i proizvodima od jabuka, a njihov unos se značajno razlikuje zavisno od uzrasta potrošača (49). Opšte je poznato da se jabuke i proizvodi od jabuka najviše konzumiraju u prvoj godini života, a sa povećanjem godina njihov unos opada (60).

Procena izloženosti populacije patulinu i sledstvenog zdravstvenog rizika je karakteristika samo određenog broja studija o prisustvu patulina u hrani, sprovedenih u 21. veku. Kratak pregled najznačajnijih rezultata studija, koji je dat u nastavku, obuhvata period do 2007. godine, dok su studije publikovane u protekloj deceniji sumirane zajedno sa rezultatima ovog istraživanja, čime

su ti rezultati postavljeni u širi kontekst savremenih postignuća u oblasti procene rizika za zdravlje populacije usled izloženosti patulinu putem hrane.

U istraživanju o unosu patulina u različitim populacionim grupama u Italiji u periodu od 2003. do 2005. godine (47), utvrđeno je da je generalno izloženost patulinu daleko ispod tolerantnog nivoa, a da su najizloženija deca uzrasta 1-10 godina. Karakteristično je da je doprinos unosu patulina bio četverostruko viši iz organskih u odnosu na konvencionalne voćne sokove, u svim populacionim grupama. U prethodnoj italijanskoj studiji publikovanoj 2000. godine (60), pri konzumiranju proizvoda od jabuka kod dece, računajući maksimalnu nađenu koncentraciju patulina, maksimalni dnevni unos patulina procenjen je na 41 ng/kg TM, što čini jednu desetinu PMTDI. Kod odraslih, unos 500 mL soka od jabuka sa maksimalnom nađenom koncentracijom patulina doveo bi do izloženosti koja dostiže 60% tolerantne vrednosti. Unos soka od jabuka sa pulpom od strane odraslih osoba rezultovao je izloženošću koja višestruko premašuje tolerantni nivo.

U prvoj španskoj studiji (86) koja je ispitivala izloženost patulinu putem konzumiranja proizvoda od jabuka (španskog, francuskog i portugalskog porekla) u kategoriji male dece, procenjeni unos patulina iznosio je 3,8% u odnosu na tolerantnu vrednost. Studija publikovana dve godine kasnije (44), 2007. godine, pokazala je sedam puta veću izloženost u kategoriji male dece, dok je izloženost odrasle populacije bila na nivou 3-4% PMTDI.

Francuska studija publikovana 2005. godine (43), pokazala je da su vrednosti prosečnog unosa patulina (kroz brojne proizvode, među kojima su i kompoti od voća) 30 ng/kg TM/dan kod dece (uzrast 3-14 godina) i 18 ng/kg TM kod odraslih, što je znatno ispod tolerantnog nivoa.

Prosečan dnevni unos patulina u populaciji Belgije, prema podacima objavljenim 2003. godine (49), iznosio je 180 ng/kg TM kod dece, a šest puta manje kod odraslih, dok je tri godine nakon toga izloženost kod dece procenjena na 96, odnosno 48 ng/kg TM, putem unosa konvencionalnih i organskih proizvoda, redom (64).

U švedskoj studiji publikovanoj 2001. godine (65), prosečan dnevni unos patulina kod dece uzrasta 7-14 godina iznosio je 9 ng/kg TM putem soka od jabuka, odnosno 4,1 ng/kg TM putem soka od drugog voća, a 4 ng/kg TM kod odraslih, što su vrednosti daleko ispod PMTDI.

Većina prikazanih studija sprovedenih u Evropi pokazale su da su odojčad i deca populaciona grupa koja je najviše izložena patulinu (43,47,49,65). Interesantno je da je zapažena viša izloženost patulinu putem konzumiranja organskih sokova od jabuka u odnosu na konvencionalne (47,64).

U iranskoj studiji sprovedenoj 2006. godine (74), prosečan dnevni unos patulina kod dece bio je iznad maksimalnog tolerantnog nivoa (145% u odnosu na tolerantnu vrednost), a kod odraslih 24% u odnosu na tolerantnu vrednost.

Ispitivanje izloženosti patulinu u Južnoj Africi (2010. g.) (71) pokazalo je da su, takođe, najizloženija odojčad i mala deca (1-5 godina) i deca uzrasta 6-9 godina, ali bez prekoračenja tolerantnog nivoa.

Dnevni unos patulina u populaciji 3-85 godina starosti u Južnoj Koreji u 2007. godini (82) iznosio je svega 0,17 ng/kg TM, od čega 0,01 ng/kg TM usled unosa soka od jabuka. Ovako nizak unos patulina i doprinos soka od jabuka su rezultat vrlo niskih koncentracija patulina u soku, ali i veoma niskog unosa sokova (u slučaju soka od jabuka 0,5 mL dnevno).

U studiji o izloženosti kineske populacije u periodu od 2006. do 2010. godine (21), procenjeni dnevni unos patulina putem koncentrata soka od jabuka bio je ispod maksimalno tolerantnog nivoa u svim populacionim grupama (odojčad 110, deca 68, odrasli 79 ng/kg TM). Ova studija je prva studija izloženosti patulinu putem konzumiranja koncentrata soka od jabuka. Druga kineska studija, publikovana 2012. godine (57), procenila je znatno viši nivo izloženosti svih populacionih grupa, kod odojčadi čak blizu tolerantne vrednosti, međutim, u proračunu je korišćen prosečni sadržaj patulina u kontaminiranim uzorcima, što je rezultovalo desetostruko višom procenjenom izloženosti odojčadi nego da je korišćena prosečna koncentracija patulina u svim analiziranim uzorcima.

Agencija za hranu i lekove Sjedinjenih Američkih Država primenila je probabilistički model za procenu izloženosti odojčadi i male dece i opšte populacije patulinu (4). Starija deca (2-10 godina) nisu uvrštena u ispitivanje kao posebna grupa, zato što konzumiranje soka od jabuka u odnosu na telesnu masu značajno opada posle druge godine života, zbog čega ovaj uzrast nije smatran rizičnom grupom. Pri prosečnom unosu soka od jabuka, izloženost patulinu iznosila je 210 ng/kg TM kod dece mlađe od godinu dana, dok je kod dece uzrasta 1-2 godine prosečan

dnevni unos patulina dvostruko prekoračio tolerantnu vrednosti. Agencija je iznela mišljenje da unos patulina putem konzumiranja soka od jabuka kod svih populacionih grupa treba da bude znatno ispod tolerantne vrednosti, kako bi se postigla bezbednost prilikom dugoročne potrošnje soka od jabuka.

Iz izloženog je proistekla potreba da regulatorna tela i industrija proizvodnje sokova ulože napor da se smanji kontaminacija voća i proizvoda od voća patulinom. U tom cilju, donete su smernice za prevenciju kontaminacije patulinom (15), a razvijene su i metode za postprodukcijnsko uklanjanje, odnosno detoksifikaciju patulina.

2.4. POSTUPCI ZA SMANJENJE PRISUSTVA PATULINA U HRANI

2.4.1. Prevencija produkcije patulina pre berbe jabuka

Od svih vrsta koje produkuju patulin, *Penicillium expansum* se najčešće povezuje sa pojavom plave truleži na jabukama. Iako se patulin najčešće javlja na oštećenom i plesnivom voću, odsustvo buđi ne znači i odsustvo mikotoksina, jer rast plesni nije uvek vidljiv spolja. Unutrašnja buđ može da se javi kao posledica invazije insekata, ako je voće oštećeno usled bolesti ili od udara pri padu na zemlju, što može da dovede do pojave patulina u voću bez vidljivog spoljašnjeg oštećenja (88).

Da bi se osigurao kvalitet jabuka koje će se koristiti u proizvodnji sokova, potrebno je primeniti sledeće mere (88):

- ukloniti i uništiti trulo voće ili obolelo drveće,
- obezbediti adekvatno rastojanje između stabala drveća, radi dovoljnog strujanja vazduha i prodora svetlosti,
- kontrolisati štetočine (insekte i plesni) i bolesti koje mogu izazvati truljenje, ili predstavljaju tačku ulaza za plesni koje proizvode patulin,
- primeniti fungicide radi sprečavanja klijanja i rasta plesni tokom i nakon berbe,
- upotrebiti đubriva na bazi kalcijuma i fosfora za plantaže, radi poboljšanja ćelijske strukture i smanjenja osetljivosti voća na truljenje,
- ne skladištiti voće sa lošim mineralnim sastavom duži vremenski period (više od 3-4 meseca), zbog njegove veće podložnosti fiziološkim poremećajima i truljenju,
- voditi registre pojave truleži za svaki voćnjak, jer je istorija voćnjaka najbolji pokazatelj za potrebu primene fungicida i potencijala za skladištenje voća.

2.4.2. Metode za postprodukcijsko uklanjanje ili detoksifikaciju patulina

2.4.2.1. Mehaničke metode - filtriranje i adsorpcija

Ispitivano je uklanjanje patulina iz soka korišćenjem materijala na bazi ugljenika. Mućkanjem sa 20 mg/mL aktivnog uglja i filtracijom kroz kolonu sa ugljem, nivo patulina je opao od početnog

30 mg/mL do nedetektabilnog. Upotreba 5 mg/mL uglja je smanjila koncentraciju patulina ispod detekcionog limita u prirodno kontaminiranom cideru, međutim, pri tome je došlo do gubitka boje cidera. U drugoj studiji, prirodno kontaminiranom soku od jabuka koji je sadržao 62,3 µg/L patulina dodavane su različite količine aktivnog uglja i uzorci su mešani određeno vreme. Kao najdelotvorniji se pokazao tretman sa 3 g/L aktivnog uglja u vremenskom periodu od 5 minuta. Bistrina soka se povećala, smanjila se obojenost i došlo je do pada koncentracije fumarne kiseline, pH i °Brix. Rađena je studija sa ultra finim aktivnim ugljem vezanim za granularni kvarc, čime je stvoren kompozitni ugljениčni adsorbent. U studiji dizajniranoj da uporedi efekat različitih metoda sa aktivnim ugljem, aktivni ugalj na pari NORIT SA 4 i NORIT SX 4 je uklonio 80% i 70%, redom, inicijalnog 1 g patulina/L u soku 12°Brix na 55°C. Hemijski aktivni ugalj NORIT CA 1 uklonio je samo 45% patulina iz istog rastvora. Studija je pokazala i da povećanje °Brix soka dovodi do smanjene efikasnosti uklanjanja patulina, odnosno uz NORIT SA 4 uklonjeno je samo 20% patulina iz soka 20°Brix. Uklanjanje patulina bilo je nezavisno od temperature sokova između 30 i 65°C, dok je u drugoj studiji, proces vezivanja patulina za ugalj na povišenim temperaturama rezultirao poboljšanim uklanjanjem. Upotreba aktivnog uglja predstavlja značajan trošak za industriju, dugotrajan je i skup proces, stvara otpad sa kojim se mora ekološki postupati i ima već pomenute negativne efekte na boju, sadržaj fumarne kiseline, pH i °Brix. Ove i druge modifikacije tretmana adsorpcijom na uglju mogu negativno uticati na percepciju ukusa i kvalitet soka. Upotreba gline može predstavljati rizik zbog uklanjanja esencijalnih hranljivih materija iz soka (89).

2.4.2.2. Fizičke metode

Modifikovana atmosfera

Jabuke se obično čuvaju i skladište na hladno i / ili u modifikovanoj atmosferi koja sadrži 3% ugljen dioksida (CO₂) / 2% kiseonika (O₂) da bi se odložilo starenje, ali, takođe, i sprečilo truljenje jabuka. U uslovima modifikovane atmosfere, produkcija patulina od strane nekoliko sojeva može biti suprimirana ili čak blokirana, mada plesni zadržavaju mogućnost rasta. Različiti sojevi *P. expansum* mogu se razlikovati u odgovorima na rast i proizvodnju patulina pri istim uslovima modifikovane atmosfere. Postoji međudnos temperature i modifikovane atmosfere u

efektima na rast i produkciju toksina. Supstrat (na primer sorta voća) može, takođe, da utiče na rast i produkciju toksina pod određenim uslovima, kao i materijali za pakovanje (90).

Gama zračenje / Elektromagnetno zračenje

Upotreba gama zračenja u supresiji rasta i produkciji mikotoksina je detaljno istražena. Spore *P. expansum* izložene zračenju proizvode manje patulina u odnosu na kontrolnu grupu. Zabeleženo je da pri dozama od 50 i 100 krad, količina patulina koju proizvede *P. expansum* nije smanjena, ali je delimično inhibiran rast *P. expansum* i *P. patulum*. Međutim, ove plesni će proizvoditi manje patulina posle izloženosti dozi većoj od 100 krad, dok će pri dozi od 200 krad, rast i produkcija patulina biti smanjena kod oba soja plesni. Efekat jonizujućeg zračenja na sadržaj patulina u soku od jabuka pokazuje da je koncentracija patulina u soku prepolovljena kada se upotrebi doza zračenja od 0,35 kGy i ta vrednost se ne menja narednih 8 nedelja pri temperaturi skladištenja od 4°C. Međutim, za vreme skladištenja uzoraka koji su ozračeni primećeno je blago povećanje kiselosti i smanjenje sadržaja askorbinske kiseline. Opisana su i neželjena dejstva primene zračenja na voćne sokove i smanjenje štetnih efekata primene zračenja pri niskim temperaturama ili dodavanjem antioksidanata (90).

Zabeleženo je i da je zračenjem voća u dozi od 1,5 i 3,5 kGy značajno smanjen ukupan broj plesni u poređenju sa kontrolnim uzorcima koji nisu ozračeni. Posle 28 dana skladištenja na hladno (ispod 10°C), neozračeno voće bilo je kontaminirano visokim koncentracijama mikotoksina u poređenju sa uzorcima ozračenim sa 3,5 kGy. Proizvodnja mikotoksina u voću opada sa porastom doze radijacije i potpuno je inhibirana kada se primeni zračenje od 5 kGy (91).

Iako postoji veliki broj radova koji ukazuju na to da su plesni veoma osetljive na gama-zračenje i da se proizvodnja mikotoksina smanjila posle ozračivanja hrane, brojni su i izveštaji koji ukazuju da ona može biti povećana ili nepromenjena posle ozračivanja. Soj plesni, skladištenje, vlažnost i doza radijacije utiču na rast plesni i proizvodnju toksina. Rok trajanja sveže hrane, čuvane na hladnom, može se povećati na tri nedelje, primenom niske doze (manje od 10 kGy) jonizujućeg zračenja. Ove doze nisu toksične i ne izazivaju mikrobiološke i nutritivne promene u proizvodu (91).

Pulsno svetlo

Pulsno svetlo (*Pulsed Light, PL*) je netermalna tehnika konzervisanja koja podrazumeva upotrebu intenzivnih i kratkotrajnih impulsa (1 μ s-0,1 s) širokog spektra svetlosti talasnih dužina u rasponu od UV do blizu infracrvenih zraka (200-1100 nm). Ovi impulsi izazivaju promene u DNK, proteinima, membrani i drugim ćelijskim komponentama mikroorganizama. Upotreba PL je odobrena od strane američke Agencije za hranu i lekove. Ispitivan je uticaj impulsa svetlosti na degradaciju patulina u veštački kontaminiranom *McIlvaine* puferu, soku i kaši od jabuke i prirodno kontaminiranoj kaši od jabuke. Izloženost svih uzoraka PL u dozi između 2,4 i 35,8 J/cm² je rezultirala značajnim smanjenjem nivoa patulina. Smanjenje sadržaja patulina u *McIlvaine* puferu nije značajno zavisilo od početne koncentracije mikotoksina, ali je pad u koncentraciji patulina bio veći sa povećanjem vremena zračenja i sa povećanjem doze, dok je u veštački kontaminiranom soku od jabuka smanjenje sadržaja patulina nakon produženja vremena zračenja bilo slabije izraženo. Sa produženjem vremena ozračivanja veštački, kao i prirodno kontaminirane kaše od jabuka, koncentracija patulina je pala na vrednosti ispod limita detekcije. Međutim, zabeleženi su i negativni uticaji primene PL na ukus i antioksidativni kapacitet proizvoda od jabuka. Rezultati su pokazali da bi tretman sa PL mogao biti potencijalna alternativna metoda za smanjenje kontaminacije patulina u proizvodima od jabuka, međutim, potrebna su dalja ispitivanja da bi se zaključilo da su produkti degradacije patulina toksikološki bezbedni (92).

Druga studija je istraživala efikasnost tretmana sa PL na inaktivaciju *P. expansum* inokulisanom u soku od jabuka. Ispitivano je kako faktori kao što su “fluence” (0,2 i 0,4 J/cm² po impulsu), broj impulsa (5, 10, 15, 20, 30 i 40 treptaja (ozračivanje primenjeno sa suprotnih strana proizvoda)), dubina sloja soka (6, 8, 10 mm) i inokulacioni nivo (2.3x10⁴ CFU/mL i 3x10⁵ CFU/mL) (*Colony Forming Unit, CFU*) utiču na mikrobnu inaktivaciju. Sa porastom broja impulsa i “fluence” raste inaktivacija plesni. Tretman je doveo do mikrobialne redukcije i do 3,76 log CFU/mL. Nivo inaktivacije je viši kada se tretmani izvode na tankim slojevima soka (6 mm) nego na dubljim (8 ili 10 mm). Inaktivacija *P. expansum* u uzorcima soka sa nižim početnim nivoima je bila veća nego u uzorcima sa višim nivoima. Posle primene PL primećene su manje promene u pH soka i rastvorljivim materijama. Međutim, primećeno je da sok od jabuka malo potamni nakon primene “fluence” od 32 J/cm² (40 impulsa od 0,4 J/cm² i sa gornje i

sa donje strane). Dobijeni rezultati ukazuju da PL efikasno smanjuje *P. expansum* u soku od jabuka, a ne utiče na kvalitet proizvoda. Što se tiče voćnih sokova, termički tretman u kombinaciji sa aseptičnim punjenjem pruža izvanredan rok trajanja. Ipak, termička obrada može imati nepoželjne efekte na senzorne i nutritivne osobine sveže ceđenog soka. Ne-termička obrada omogućava da se mikroorganizmi inaktiviraju, a da se bolje očuvaju senzorne, nutritivne i funkcionalne osobine hrane (93).

Termička obrada

Deset sojeva *P. expansum* je korišćeno za testiranje patogenosti i proizvodnje patulina u različitim vrstama voća, uključujući jabuke, u različitim temperaturnim režimima. Svi sojevi su proizveli patulin na svim plodovima na 25°C, a devet na 4°C. Proizvodnja patulina je bila veća na 25°C u odnosu na 4°C. Voće koje je inokulirano i skladišteno na 25°C razvilo je lezije od skoro 40 mm za 9 dana, dok je vreme potrebno za formiranje lezije iste veličine na 4°C bilo 45 dana. Ukoliko skladištenje treba da traje duži vremenski period, voće bi trebalo da se čuva na temperaturi ispod 4°C da bi se sprečila dalja proizvodnja patulina. Kada se jabuke ili drugo voće zaraze sporama *P. expansum*, veoma je teško izbeći kvarenje voća, čak i ako se voće čuva na niskim temperaturama ili pod kontrolisanim atmosferskim uslovima. Pokazano je i da se u hladnjači ne može sprečiti rast *P. expansum*, ali, može se znatno smanjiti (94).

Iako *P. expansum* može da raste i proizvodi patulin na 0°C, primećeno je da toksin nije nastao u veštački inokulisanim jabukama skladištenim 6 nedelja na 1°C, mada su lezije bile vidljive. Patulin je nađen kada je voće držano još tri dana na 20°C. Akumulacija patulina je bila viša kada su inicijalne lezije bile veće, a nije bilo značajnih koncentracija patulina u jabukama sa lezijama do 2 cm nakon skladištenja u hladnjačama. Stoga, izloženost jabuka visokim temperaturama trebalo bi da je što kraća, da bi se smanjio rizik od pojave patulina (90).

2.4.2.3. Fizičke i hemijske metode

Praćena je koncentracija patulina u soku od jabuka posle tretmana sa sumpor dioksidom (SO₂) i toplotom. Rezultati studije su pokazali da temperature od 90, 107,5 i 125°C u trajanju od 30 i 268 minuta i SO₂ (0 i 350 mg/kg) imaju najznačajniju ulogu u smanjenju količine patulina. Najbolji efekat je primećen pri pasterizaciji na temperaturi od 125°C i dodatku 350 mg/kg SO₂,

što je rezultiralo smanjenjem nivoa patulina za oko 86%. Rezultati su pokazali da su primena toplote i SO₂ najlakše metode koje se preporučuju u industriji voćnih sokova u prevenciji stvaranja patulina. Primena toplote, kao i kombinacija toplote i SO₂ imaju značajan uticaj na smanjenje patulina, pri čemu veći porast temperature efikasnije umanjuje nivo patulina. Međutim, toplota kao vid pasterizacije nije eradikacioni faktor za patulin u soku od jabuke. Visoka temperatura od 125°C smanjila je koncentraciju patulina za oko 85%, ali je, takođe, uzrokovala niži kvalitet soka od jabuka i dovela do narušavanja boje i bistrine. Pasterizacija soka od jabuka na 90°C nije dovoljna da se smanji koncentracija patulina. Sam tretman na višoj temperaturi, kao što je 125°C za 268 minuta, kao i u kombinaciji sa SO₂, doveo je do smanjenja koncentracije patulina za oko 70% i 85%, redom. Primena SO₂ je pokazala da on inhibira biološku aktivnost patulina. Međutim, kombinacija više temperature i SO₂ narušava boju, smanjuje bistrinu i kvalitet soka od jabuka (95).

2.4.2.4. Hemijske metode

Hemijske metode su efikasne i najpogodnije u odnosu na ostale korišćene metode u prehrambenoj industriji, a uključuju hemijske procese pri kojima dolazi do oksidacije patulina ili njegovog vezivanja i nastanka manje toksičnih jedinjenja. Dve najdelotvornije hemijske metode u detoksifikaciji patulina su tretman amonijakom i oksidacija kalijum permanganatom. Obe metode primenjene pojedinačno smanjuju nivo patulina i do 99,9% u laboratorijskom otpadu i do 99,8% u soku. Ispitivani su i tretmani jedinjenjima koja sadrže sumpor. Većina studija je pokazala da patulin reaguje sa SO₂ i može biti uništen od strane slobodnog SO₂ prisutnog u cideru ili kada se SO₂ koristi kao aditiv (kao antioksidant ili konzervans). Afinitet patulina prema SO₂ je pH zavisian (90). Međutim, podaci o efikasnosti SO₂ se međusobno razlikuju. Studije su pokazale da dodatak 100 mg SO₂/kg smanjuje nivo patulina u soku za 50%, 100 mg SO₂/kg za 42%, 200 mg SO₂/kg za 12% u toku 24h i 2000 mg SO₂/kg za 90% posle dva dana (89).

Ispitivan je uticaj SO₂, natrijum benzoata i kalijum sorbata na rast *B. nivea* i posledičnu proizvodnju patulina u soku. Rast *B. nivea* i proizvodnja patulina su značajno usporeni primenom 75 mg SO₂/kg, 150 mg kalijum sorbata/kg i 500 mg natrijum benzoata/kg soka. U drugoj studiji tretman *B. nivea* sa 50 mg kalijum sorbata/mL potpuno je eliminisao proizvodnju patulina na 37°C. Međutim, veće koncentracije (75 i 100 mg/mL) su potrebne da bi se inhibirao

rast *B. nivea* na nižim temperaturama (21°C). Slična studija je pokazala da 0,1% kalijum sorbata eliminiše proizvodnju patulina u *P. patulum*, ali je zanimljivo da isti tretman povećava proizvodnju patulina u *P. roqueforti*. Studija je pokazala da 0,1 M kalijum sorbata i 0,1 M natrijum propionate, pojedinačno, smanjuju rast *P. expansum* za 83% i 48%, redom, a proizvodnju patulina svaki za 98%. Rađene su zasebne studije sa 0,2% limunovog ulja, pri čemu je pokazano smanjenje proizvodnje patulina, a mešavina 0,05% limunovog i 0,2% narandžinog ulja smanjuje proizvodnju patulina za 90% (89).

SH jedinjenja, kao što su cistein, tioglikolat i tiosulfat, inaktiviraju patulin. Ukazano je na to da je stabilnost patulina u vezi sa nivoom SH jedinjenjau proizvodu. Patulin je stabilniji u proizvodima sa niskim sadržajem SH (sok od jabuka) u odnosu na voće koje ima više SH jedinjenja (sok od crne ribizle ili pomorandže) (90).

Tretmani sa organskim kiselinama i vitaminima, od kojih su mnogi u upotrebi kao aditivi u hrani, koriste se za dekontaminaciju patulina. Istraživanja pokazuju da dodatak askorbata i askorbinske kiseline koncentraciono zavisno smanjuje nivo patulina u rastvoru. Ova reakcija je slabije izražena u soku. Mehanizam reakcije je sledeći: askorbat ili askorbinska kiselina reaguje sa metalnim jonima, proizvodi se kiseonik, koji potom oksiduje patulin. Međutim, nema dokaza za postojanje proizvoda navedene reakcije. Podaci o efikasnosti uklanjanja patulina se razlikuju u različitim studijama: nađeno je da askorbinska kiselina u koncentraciji od 500 mg/kg soka može da smanji nivo patulina za 50%, ali i za svega 5% za 3h ili 36% nakon 44h (89). Eliminacija patulina iz soka od jabuka za oko 85% može se postići kombinovanim korišćenjem askorbinske kiseline i adsorbentnog polimera (90).

Proučavan je kombinovani uticaj askorbinske kiseline i uslova sredine na degradaciju patulina. Svi eksperimenti su izvedeni na pH 4,0 što odgovara pH soku od jabuka. Joni metala, kiseonik, kao i izloženost svetlu smatraju se važnim faktorima koji utiču na stabilnost patulina. Upoređena je degradacija patulina u prisustvu i odsustvu askorbinske kiseline pod različitim uslovima skladištenja. U odsustvu askorbinske kiseline, patulin je bio umereno stabilan u rastvoru pufera tokom perioda od 34 dana. Nije primećena razlika između uzoraka skladištenih sa ili bez svetlosti, kiseonika i slobodnih jona metala. U prisustvu askorbinske kiseline patulin se brže i u većoj meri razgrađuje. Takođe, uslovi skladištenja (svetlost, prisustvo kiseonika i odsustvo

etilendiamin tetrasirćetne kiseline) izazvali su značajne razlike u degradaciji. Posle devet dana, patulin je smanjen za 59% i 37% pod nezaštićenim i zaštićenim uslovima skladištenja, redom. U ovoj studiji, askorbinska kiselina je potpuno oksidovana posle devet dana skladištenja pod nezaštićenim uslovima. Posledično prisustvo slobodnih radikala izazvalo je brzo smanjenje koncentracije patulina. Nasuprot tome, degradacija askorbinske kiseline se odvijala sporo pod zaštićenim uslovima (skladištenje na tamnom mestu, prisustvo azota, heliranje metalnih jona). Moguće je postići brzu indukciju degradacije patulina dodavanjem kombinacije vodonik peroksida i dvovalentnog gvožđa, ili kada se koristi 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal (2,2-*diphenyl-1-picrylhydrazyl*, *DPPH*[•]). Stepen degradacije patulina u prisustvu askorbinske kiseline zavisi od vremena, početne koncentracija patulina i koncentracije askorbinske kiseline i uslova okoline. Podaci iz ove studije pokazuju da je za brzu degradaciju patulina od strane askorbinske kiseline neophodno prisustvo kiseonika i slobodnih radikala. Oksidacija askorbinske kiseline u prisustvu kiseonika i metalnih jona predstavlja mogući izvor tih radikala. Pošto se degradacija patulina završava nakon potpune oksidacije askorbinske kiseline, početna koncentracija askorbinske kiseline i stopa njene degradacije predstavljaju važne faktore (96).

Utvrđeno je i da vitamini B grupe (tiamin hidrohlorid, piridoksin hidrohlorid i kalcijum-D-pantotemat) izazvaju statistički značajno smanjenje sadržaja patulina u sokovima (89).

Jedna od hemijskih metoda detoksifikacije patulina je i upotreba ozona, koja je odobrena za tretman hrane, a pokazala se kao efikasna alternativa pasterizaciji soka. Tretman rastvora patulina od 32 μM sa 10% ozona za 15 s smanjuje sadržaj patulina na nedetektabilan nivo (89).

Joni srebra su jedan od najčešće korišćenih jona metala kao antimikrobni agens. Joni srebra predstavljaju dugo delujući biocid, stabilni su na visokim temperaturama, imaju malu isparljivost i sposobnost delovanja na brojne biološke procese u mikroorganizmima koji uključuju strukturu i funkciju ćelijske membrane. Antimikrobna aktivnost jona srebra zasniva se na interferiranju sa enzimskom aktivnošću, vezivanjem za proteine, što rezultira strukturnim promenama u ćelijskom zidu i membranama mikroorganizama, kao i vezivanju za DNK i RNK i posledičnoj inhibiciji DNK transkripcije, respiracije i sinteze adenzotriposfata (*Adenosine Triphosphate*, *ATP*). Ispitivana je antifungalna aktivnost jona srebra iz rastvora srebro nitrata na *Penicillium vulpinum* *CMI*, patogen koji može da proizvede patulin. Sa povećanjem koncentracije jona srebra

povećava se inhibitorno dejstvo na produkciju patulina od strane *P. vulpinum* CMI. Ovi nalazi ukazuju na mogućnosti korišćenja jona srebra, koji je manje toksičan i isplativiji u odnosu na sintetičke fungicide, u kontroli rasta patogenih plesni i proizvodnje mikotoksina (97).

Proučavan je i uticaj flavonona, kao što su naringin, hesperidin, neohesperidin, prunin, hesperetin glukozid i njihovih glukozidnih estara, na inhibiciju produkcije patulina od strane *P. expansum*, *Aspergillus terreus* i *Byssochlamys fulva*. Svi ispitani flavanoni su potpuno inhibirali produkciju patulina od strane *Aspergillus terreus*. Flavanoni su ispoljili inhibitorni efekat veći od 99% u odnosu na *Byssochlamys fulva* i oko 98% u odnosu na *P. expansum*. Svi testirani flavanoni su smanjili akumulaciju patulina za najmanje 95% u odnosu na kontrolu. Nije bilo razlike u efikasnosti svakog od flavanona testiranih na delovanje na svaku plesan (98).

2.4.2.5. Biološke metode

Tradicionalni pristupi u uklanjanju patulina, koji uključuju prečišćavanje, filtriranje i hemijske procese, nisu široko dostupni zbog visokih troškova, hemijske opasnosti tokom prerade i uticaja na životnu sredinu.

Ishod interakcija između mikroorganizama može biti simbioza, neutralizam ili antagonizam. Antagonizam može nastati zbog različitih uzroka: takmičenje za hranljive materije, kolonizacija hifa, direktne antibioze ili kombinacije sva tri. Primena antagonista (mikroorganizmi izolovani sa površine voća), koji aktivno konkurišu protiv datog patogena, sve se više koristi, jer postupak predstavlja ekološku metodu. Ovi mikroorganizmi su široko poznati kao biokontrolni agensi, a većina ih pripada grupi bakterija i kvasaca (99).

Sve više pažnje se posvećuje biosorbentima zbog njihove niske cene. Mlečno kiselinske bakterije, *Gluconobacter oxydans* i *Saccharomyces cerevisiae* su sposobne da smanje koncentraciju patulina. Pored toga, u procesu vrenja nastaju nusproizvodi koji su izvor različitih funkcionalnih grupa, kao što su karboksil, amino, hidroksil, fosfat i sulfonat, koje su odgovorne za vezivanje mikotoksina (100).

Brojne studije su ispitivale upotrebu kvasaca, bakterija i filamentoznih plesni u biološkoj kontroli nastanka patulina. Utvrđeno je da *Rhodotorula glutinis* uništava patulin u *in vivo* i *in vitro* studijama. Autori su zaključili da ćelije kvasaca prisutne u trulim jabukama mogu da

metabolišu patulin ili da smanje njegovu produkciju. Patulin se uništava tokom procesa fermentacije korišćenjem kvasaca (naročito *Saccharomyces spp.*). Iako mehanizam degradacije nije potpuno shvaćen, jasno je da patulin nije adsorbovan od strane ćelija kvasca, pošto produkti degradacije patulina ostaju u prečišćenom fermentisanom medijumu (90).

Oko 90% patulina se može ukloniti tokom fermentacije kvasaca. U jednoj studiji, šest od osam sojeva kvasaca je smanjilo koncentraciju patulina ispod nivoa detekcije, a svih osam sojeva je rezultiralo smanjenjem nivoa patulina za 99%, ili više. U drugoj studiji, fermentacija kvasca je potpuno uklonila patulin nakon dve nedelje, a zaključeno je da samo aktivni kvasac, a ne i njegovi nusproizvodi, utiče na smanjenje koncentracije patulina. Tretman patulina sa cikloheksamidom (blokator sinteze proteina kvasaca), potpuno prevenira detoksifikaciju patulina. Pokazano je da tri soja *Saccharomices cerevisiae* smanjuju nivo patulina tokom alkoholne fermentacije soka od jabuka. Ovo smanjenje je rezultiralo nastankom dva glavna proizvoda: *E*-askladiola i njegovog izomera *Z*-askladiola. Nastanak ova dva proizvoda primećen je, takođe, pri tretiranju patulina sa natrijum borohidratom. *E*-askladiol je i sam mikotoksin koji reaguje sa sulfhidrilnim jedinjenjima, a manje je toksičan u poređenju sa patulinom. Iako je biološka kontrola sa kvascem efektivna, ona je ograničena na određene proizvode koji mogu da budu fermentirani. Pored toga, i sam kvasac je osetljiv na patulin, a pri koncentracijama višim od 200 mg/mL, kvasac biva kompletno inhibiran, čime je sprečena fermentativna detoksifikacija (89).

Bilo koji process koji dovodi do degradacije mikotoksina, treba da bude praćen toksikološkim studijama, koje bi pokazale da novonastali proizvodi nisu toksični (90).

“*Waste cider yeast*” je prirodni nuz-proizvod koji nastaje u proizvodnji fermentisanih pića. Ćelije kvasca su tretirane sa bazom, etanolom i toplotom. Među ovim tretmanima, najveća adsorpcija patulina je postignuta sa bazom tretiranim ćelijama kvasca. Procenjavani su efekti pH i početne koncentracije patulina. Rezultati su pokazali da se procenat adsorpcije patulina povećava sa povećanjem pH vrednosti. Utvrđeno je da Ca-alginat gel predstavlja dobar biosorbent za uklanjanje patulina i da imobilizacija bazno tretiranih čestica kvasca u gelu povećava biosorpcioni kapacitet gela (100).

Testirana je efikasnost antagoniste kvasca, *Pichia caribbica* u kontroli nastanka plave plesni na trulim jabukama nakon berbe i smanjenju produkcije patulina od strane *P. expansum*. Rezultati ove studije su pokazali da je značajno smanjena pojava truleži jabuka tretiranih sa *P. caribbica* u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Što je veća koncentracija *P. caribbica*, to je manja incidencija bolesti. Pored toga, utvrđeno je da je pri primeni *P. caribbica* prirodno propadanje jabuka značajno smanjeno nakon skladištenja na 20°C tokom 35 dana, ili na 4°C za 45 dana. *P. caribbica* ima potencijal da kontroliše širok spektar patogena koji preživljavaju u različitim uslovima. U kombinaciji sa niskom temperaturom skladištenja koristi se u smanjenju pojave truleži. Rezultati su pokazali da tretman sa *P. caribbica* nije narušio kvalitet jabuka tokom skladištenja, što *P. caribbica* čini moćnim biokontrolnim agensom u kontroli bolesti jabuka posle berbe (101).

Ispitivana je sposobnost *P. ohmeri* 158 u biokontroli protiv *P. expansum* i smanjenju produkcije patulina *in vitro*. Početna koncentracija patulina je sa 223 µg u prisustvu *P. ohmeri* 158 smanjena za preko 83%, nakon inkubiranja na 25°C/48 h i potpuno uništena nakon 15 dana. Rezultati su pokazali da upotreba *P. ohmeri* 158 predstavlja dobru strategiju u degradaciji patulina i inhibiciji rasta *P. expansum*. Smanjenje nivoa patulina korišćenjem kvasca može nastati usled enzimske reakcije tokom fermentacije ili usled adsorpcione sposobnosti kvasca (102).

Primena biokontrolnih agenasa kao što su mlečno kiselinske bakterije (*Lactic Acid Bacteria*, LAB), biološki konzervansi hrane, odavno se koristi kao isplativ i siguran metod u skladištenju hrane. LAB su bezbedne i obezbeđuju dugotrajan efekat. Interakcija LAB i zagađujućih organizama indukuje produkciju organskih kiselina, vodonik peroksida, etanola i bakteriocina uz konkurentno korišćenje resursa. LAB sprečava klijanje spora plesni, usporava rast micelijuma, smanjuje proizvodnju mikotoksina u brojnim prehrambenim proizvodima i količinu patulina nakon inkubacije u tečnom medijumu. Utvrđeno je da biotransformacija dovodi do smanjenja koncentracije patulina kada se koriste mikroorganizmi poput *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus rhamnosus*. Tada nastaju manje toksična jedinjenja, kao što su askladiol i dezoksipatulinska kiselina (103).

Rast *P. expansum* je značajno ograničen kada se tokom 48 h izloži supernatantu dva soja *Lactobacillus plantarum* (B1 i S1). Biotransformacijom patulina pod dejstvom supernatanta *L.*

plantarum se formiraju *E*- i *Z*-askladiol. Proces je izraženiji pri višim vrednostima pH i većoj gustini ćelija. Izlaganje supernatantu ili sonifikovanim ćelijama rezultiralo je potpunom biotransformacijom patulina, pri čemu toplotni tretman inhibira ovaj efekat. Izomeri askladiola se zatim transformišu u novi metabolit hidroaskladiol, koji može biti bolji biomarker od početnog nivoa patulina u nekim prehrambenim proizvodima (103).

Uklanjanje patulina iz tečnog medijuma, pomoću različitih sojeva mlečno kiselinskih bakterija, analizirano je i korišćenjem tečne hromatografija visokih performansi (*High performance liquid chromatography, HPLC*). *Bifidobacterium animalis* VM 12 je smanjio nivo patulina za 80%. Vezivanje ovog jedinjenja zavisi od koncentracije mikotoksina, gustine ćelija, pH vrednosti i od viabilnosti bakterija. Maksimalno uklanjanje patulina je primećeno na pH 5,0. Adsorpcija mikotoksina zavisi od količine bakterija u inkubacionoj smeši. Ispitivanjem na humanim ćelijama jetre (HepG2) pokazano je da su LAB u stanju da zaštite humane ćelije od toksičnih efekata patulina (104).

Rađena je studija sa bakterijom *Gluconobacter oxydans*, koja je izolovana iz jabuke kontaminirane patulinom. Pokazalo se da je *G. oxydans* sposobna da degradira patulina na manje toksično jedinjenje, askladiol. *E*-askladiol je direktni prekursor patulina, dok je *Z*-askladiol proizvod neenzimske transformacije *E*-askladiola koju katalizuju sulfhidrilna jedinjenja, poput homocisteina, cisteina, glutationa ili ditiotreitola. Čini se da *G. oxydans* proizvodi samo *E*-askladiol (105). Svrha druge studije bila je da se izoluje prirodna mikrobna populacija s površine jabuka i istraži moguće inhibitorno delovanje *G. oxydans* 1J na plavu plesan, *P. expansum*. Najveća antifungalna aktivnost bakterije primećena je između trećeg i devetog dana, kada nije zabeležen porast kolonija, a posle dvanaestog dana prečnik kolonije plesni je bio manji za 42,3%. Iako bakterija *G. oxydans* 1J nije u potpunosti inhibirala rast plesni u soku od jabuka, pokazala je visoku efikasnost (od 86 do 95%) (106).

Ispitivana je degradacija patulina od strane kvasca *Rhodospiridium paludigenum* i utvrđena je znatno manja toksičnost proizvoda degradacije (dezoksipatulinična kiselina) (107).

2.4.2.6. Upotreba fungicida i biokontrolnih agenasa

Sintetički fungicidi se i dalje često koriste neposredno pre ili posle berbe za kontrolu kvarenja voća, ali je njihova upotreba ograničena zbog ekoloških i toksikoloških rizika, kao i postojanjem patogena otpornih na fungicide. Zbog toga, alternativne ili integrisane mere postaju sve važnije u kontroli obrade voća posle berbe. Biokontrolni agensi (*Bio-control agents, BCA*) predstavljaju obećavajuće sredstvo u zaštiti od pojave plesnive truleži i minimiziraju upotrebu fungicida. Međutim, biokontrolni agensi ponekad nisu sami dovoljni. Zato je predložen integrisani pristup upotrebe biokontrolnih agenasa i fungicida (108).

Proučavana je kompatibilnost biokontrolnih kvasaca (*Rhodosporidium kratochvilovae LS11* i *Cryptococcus laurentii LS28*) sa fungicidima boskalidom, ciprodinilom i fenheksamidom u kontroli plave plesni na jabukama. Kao kontrola, korišćen je fungicid tiabendazol, koji je dozvoljen u različitim zemljama za upotrebu u tretmanu obrade voća nakon berbe. Oba biokontrolna agensa (*LS11* i *LS28*) su bila kompatibilna *in vitro* sa boskalidom i ciprodinilom, dok su snažno inhibirani od strane fenheksamida. Tiabendazol je bio kompatibilan sa *LS28*, ali je snažno inhibirao *LS11*. Eksperimenti su izvedeni na oštećenim jabukama držanim sedam dana na 21°C. Posle četiri dana skladištenja, kombinacija niske koncentracije biokontrolnih agenasa sa niskom dozom boskalida ili ciprodinila, rezultirala je efikasnim smanjenjem pojave plave plesni (za 83-100%). Suprotno tome, kombinacija biokontrolnih agenasa sa tiabendazolom bila je manje efikasna (smanjenjem pojave plave plesni do 60%). Kada se primenjuju samostalno, u malim dozama, *LS11*, *LS28*, boskalid, ciprodinil i tiabendazol smanjuju pojavu truleži za 35%, 52%, 67%, 72% i 0%, redom. Nakon sedam dana skladištenja, samo je integrisani tretman biokontrolnim agenasima sa boskalidom ili ciprodinilom rezultirao značajnim smanjenjem truleži (čak za 98%). Tretmani zasnovani na korišćenju biokontrolnih agenasa *LS28* ili niske doze ciprodinila nisu bili efikasni, kao ni *BCA LS 11* i *LS28* zajedno sa tiabendazolom. Podaci pokazuju da je integracija biokontrolnih kvasaca sa malim dozama fungicida boskalidom ili ciprodinilom efikasna u kontroli *P. expansum* i posledične kontaminacije jabuka patulinom.

2.4.2.7. Primena prirodnih proizvoda

Ispitivana je aktivnost turskog propolisa na produkciju patulina u soku od jabuke od strane *P. expansum*. Značajno smanjenje sadržaja patulina je postignuto dodavanjem propolisa u sok od jabuka, pri čemu veće doze propolisa više smanjuju nivo patulina. Koncentracija propolisa od 2 mg/mL snažno inhibira produkciju patulina u toku 48 h. Smatra se da etanolni ekstrakt turskog propolisa ima antibakterijsko, antifungalno, antioksidativno i antikancerogeno dejstvo. Uprkos studijama, koje pokazuju da upotreba nekih konzervansa, kao što su sumpor dioksid, natrijum benzoat i kalijum sorbat, inhibira rast i proizvodnju patulina, javlja se potražnja za hranom bez aditiva. Za razliku od aditiva, propolis je jeftin, lako dostupan i prirodan proizvod. Zaključeno je da se propolis može koristiti kao prirodno sredstvo za inhibiciju *P. expansum* umesto hemijskih konzervanasa (109).

2.4.3. Patulin i klimatske promene

Poznato je da su povoljna temperatura i aktivnost vode neophodni za plesni koje proizvode mikotoksine. Patulin može postati manje važan u sada umerenim klimatskim uslovima, ako dođe do povećanja temperature, jer će tada temperatura biti previsoka za plesni koje proizvode ovaj mikotoksin. Međutim, u sada hladnim klimatskim uslovima patulin može postati problem kada temperature postanu više (110). Regije, koje budu mogle da priušte kontrolu nad okruženjem i objektima skladištenja, moći će da izbegnu probleme posle berbe, ali uz finansijske troškove.

3. CILJEVI I HIPOTEZE

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Izabrati i okarakterisati metodu za analizu patulina
 - 1.1. Izabrati metodu za analizu patulina pogodnu za različite vrste proizvoda od jabuka
 - 1.2. Utvrditi karakteristike izvođenja odabrane analitičke metode
2. Kvalitativno i kvantitativno analizirati proizvode od jabuka na tržištu Republike Srbije
 - 2.1. Analizirati proizvode od jabuka, uključujući proizvode iz kategorije hrana za odojčad i malu decu, na prisustvo i sadržaj patulina
 - 2.2. Analizirati proizvode od jabuka na prisustvo i sadržaj ostataka pesticida
 - 2.3. Analizirati proizvode od jabuka na prisustvo i sadržaj toksičnih metala
3. Oceniti bezbednost proizvoda od jabuka na tržištu Republike Srbije
4. Proceniti izloženost patulinu putem konzumiranja proizvoda od jabuka, za definisane populacione grupe u Republici Srbiji

HIPOTEZE

1. Izbor i karakterizacija metode za analizu patulina
 - 1.1. Jedinstvena analitička metoda koja uključuje ekstrakciju uzorka i prečišćavanje sirovog ekstrakta praćene tečnom hromatografijom, omogućava analizu različitih proizvoda od jabuka (tečni, polutečni ili čvrsti matriksi)
 - 1.2. Karakteristike izvođenja odabrane analitičke metode u skladu sa kriterijumima prihvatljivosti za metode za analizu patulina u hrani (limit kvantifikacije ispod 3 µg/kg, prinosi u opsegu 50-120% i 70-105% za koncentracione nivoe ispod 20 µg/kg)

i 20-50 µg/kg, redom, preciznost izražena kao relativna standardna devijacija ispod 20%)

2. Kvalitativna i kvantitativna analiza proizvoda od jabuka

2.1. Visoka učestalost pojavljivanja patulina u proizvodima od jabuka, nizak nivo kontaminacije. Niža učestalost pojavljivanja i niži sadržaj patulina u proizvodima iz kategorije hrana za odojčad i malu decu u odnosu na druge proizvode

2.2. Ostaci pesticida prisutni u proizvodima od jabuka, u koncentracijama ispod maksimalno dozvoljenih

2.3. Toksični metali dominantno odsutni u proizvodima od jabuka, u slučaju detekcije koncentracije ispod maksimalno dozvoljenih

3. Proizvodi od jabuka sa tržišta Republike Srbije zadovoljavaju zakonske zahteve za bezbednost u pogledu sadržaja patulina, ostataka pesticida i toksičnih metala

4. Izloženost patulinu putem proizvoda od jabuka ispod tolerantnog nivoa za sve populacione grupe u Republici Srbiji, najviša izloženost u populaciji dece

4. IZBOR I KARAKTERIZACIJA METODE ZA ANALIZU PATULINA

4.1. IZBOR METODE ZA ANALIZU PATULINA

4.1.1. Metode za analizu patulina

Analitička metoda obuhvata nekoliko važnih koraka: uzorkovanje, pripremu uzoraka, izolaciju, identifikaciju i kvantifikaciju, a svaki od njih je važan za dobijanje pouzdanog krajnjeg rezultata. Uzorkovanje treba da rezultuje odgovarajućom količinom reprezentativnog uzorka. Priprema uzorka je neophodna da se izoluje i / ili koncentruje analit od interesa iz matriksa hrane, vodeći računa o hemijskim svojstvima, osobinama i složenosti kako analita, tako i samog matriksa, nakon čega sledi instrumentalna metoda za identifikaciju i kvantifikaciju analita od interesa (111).

4.1.1.1. Metode za pripremu uzoraka

Više faktora utiče na određivanje sadržaja patulina u hrani, što kvantifikaciju čini težom, kao na primer, nehomogena distribucija patulina u uzorcima i, ponekad, veoma niski nivoi kontaminacije, zbog čega su neophodni različiti pristupi u procesu ekstrakcije i prečišćavanja uzoraka. Važan faktor je i činjenica da je patulin nestabilan pri visokim vrednostima pH, što postavlja određena ograničenja u postupku pripreme uzoraka. Korišćeni su različiti rastvarači sa ciljem izdvajanja patulina iz matriksa hrane. Prečišćavanje finalnog ekstrakta ima za svrhu uklanjanje nečistoća iz matriksa i koncentrisanje patulina. Izbor procedura za prečišćavanje zavisi od potrebnih granica detekcije i kvantifikacije metode. Široko se primenjuje ekstrakcija sa etil acetatom, kao i smešom etil acetata i heksana. Za određene matrikse često se pre ekstrakcije sprovodi postupak depektinizacije (112). Prečišćavanje ekstrakcijom na čvrstoj fazi (*Solid-phase extraction, SPE*) uspešno se koristi poslednjih decenija. Difazna dijaliza, tehnika ekstrakcije na membranama, je takođe korišćena u nekim studijama. Postoje i druge tehnike koje koriste konvencionalne reverzne faze da zadrže toksin, kao što je pre-kondicionirana kolona koja sadrži kopolimer divinilbenzena i *N*-vinilpirolidinona. Imunoafinitetne kolone, koje se smatraju veoma selektivnim, ne koriste se za ekstrakciju i prečišćavanje patulina, jer nisu razvijena specifična

antitela sposobna da prepoznaju patulin (112). Pogodan metod za izdvajanje patulina iz jabuka je i disperzija matriksa na čvrstoj fazi. Mala količina jabuka se homogenizuje sa oktadecil sorbentom, a nakon ispiranja sorbenta sa heksanom, patulin se eluira sa dihlorometanom. Posle uparavanja rastvarača, ekstrakt se rastvara u acetatnom puferu, a zatim se pristupa analizi primenom tečne hromatografije (111).

Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrakcija na čvrstoj fazi je atraktivna tehnika za prečišćavanje matriksa i koncentrisanje analita prisutnih u tragovima. Tehnika se zasniva na hromatografiji: analit je rastvoren ili suspendovan u tečnosti i propušta se kroz čvrstu fazu. SPE koristi pakovane kolone koje sadrže različite količine stacionarne faze - silicijum za koji su vezane specifične funkcionalne grupe, kao što su ugljovodonični lanci različitih dužina, ili kvaternerne amonijum ili amino grupe (anjon izmenjivačka SPE), ili sulfonske kiseline ili karboksilne grupe (katjon izmenjivačka SPE) (111).

Za analizu patulina u sokovima od jabuka opisano je više SPE sistema. Korišćene su polivinilpolipirolidon-oktadecil (PVPP-C18) kolone i kolone punjene hidrofilno-lipofilno uravnoteženim (HLB) makroporoznim kopolimerom, koje se, nakon propuštanja soka od jabuka, eluiraju sa dietil etrom. Posle uparavanja ostatak se rastvori u mešavini acetonitrila i vode i male količine sirćetne kiseline i dalje analizira hromatografski. Publikovani su i radovi u kojima je patulin analiziran u proizvodima od jabuka za odojčad, u kojima je u SPE koloni korišćen nekondicionirani silika gel (111).

Za analizu sirupa od jabuka opisana je procedura pretretmana korišćenjem oktadecil kolone. Uzorak sirupa je razblažen acetatnim puferom i propušten kroz kolonu; nakon ispiranja heksanom, kolona je osušena i eluirana sa mešom heksan / etil acetat / aceton, a patulin je određivan nakon zakišeljavanja primenom tečne hromatografije (111).

Mikroekstrakcija sa upakovanim sorbentom

Razvoj novih analitičkih tehnika podstaknut je potrebom da se ispune brojni zahtevi, poput brzine analize, snižavanje troškova i umanjenja zagađenja životne sredine. U tom pogledu puno se očekuje od mikroekstrakcije sa upakovanim sorbentom (*Microextraction by packed sorbent, MEPS*). MEPS tehnika koristi malu količinu stacionarne faze, upakovanu u bubanj zvani *Barrel*

Insert and Needle Assembly u gas-nepropusnom špricu pod pritiskom. Kao i kod SPE, cilj MEPS je uklanjanje interferencija selektivnom izolacijom i koncentrisanje ispitivanog analita, ali na mikro skali. Koraci u MEPS proceduri su slični koracima opisanim za SPE (111).

4.1.1.2. Metode za identifikaciju / kvantifikaciju

Za identifikaciju i kvantifikaciju patulina koriste se: tankoslojna hromatografija, tečna hromatografija visokih performansi, gasna hromatografija kuplovana sa masenom spektrometrijom, kao i druge metode (112).

Tankoslojna hromatografija

Tankoslojna hromatografija (*Thin Layer Chromatography, TLC*) je prva metoda koja se koristila za određivanje patulina u sokovima od jabuka. Metoda za analizu patulina TLC tehnikom prema Oficijalnoj asocijaciji analitičkih hemičara (*Association of Official Analytical Chemistry, AOAC*) uključuje ekstrakciju sa etil acetatom, prečišćavanje na hromatografskoj ploči sa silika gelom i detekciju pomoću metil-2-benzotiazolinon hidrazona (112).

TLC može da se koristiti za razdvajanje, procenu čistoće i identifikaciju organskih jedinjenja. Normalno-fazna TLC se sastoji od stacionarne faze kao što su silika gel, aluminijum ili celuloza, imobilisani na staklenoj ili plastičnoj ploči, i rastvarača kao mobilne faze. Uzorak može biti tečan ili rastvoren u rastvaraču. Može se primeniti kao jednodimenzionalna, ili dvodimenzionalna TLC za bolje razdvajanje ili uklanjanje interferencija. Hromatografske mrlje se vizualizuju UV svetlošću, fluorescencijom ili drugim tehnikama (113). Alternativne metode za kvantifikaciju patulina su denzitometrija, koja kvantifikuje intenzitet hromatografskih mrlja patulina ekstrahovanog iz matriksa, i fluorodenzimetrija nakon formiranja fluorescentnih derivata dobijenih izlaganjem hromatografskih mrlja patulina parama amonijaka (112).

Tečna hromatografija visokih performansi

Zbog prirodne polarnosti molekula patulina i karakteristične apsorpcije UV svetlosti, reverzno fazna tečna hromatografija visokih performansi sa ultraljubičastim detektorom je u širokoj upotrebi. HPLC tehnika je dala dobre rezultate u izolovanju i kvantifikaciji patulina na talasnim dužinama od 280 do 272 nm. Međutim, prisustvo interferirajućih supstanci otežava identifikaciju patulina, zbog čega je neophodan pred-tretman uzorka. Identifikacija i kvantifikacija se sprovodi

u poređenju sa poznatim količinama standarda patulina. Metod za određivanje patulina primenom tečne hromatografije opisan je u AOAC metodi 995.10, po kojoj se patulin ekstrahuje tri puta sa etil acetatom, nakon čega sledi prečišćavanje pomoću rastvora natrijum karbonata, uparavanje organskog rastvarača, i određivanje patulina na C-18 reverzno faznoj koloni, sa UV detektorom (112).

Patulin je visoko polarni molekul male molekulske mase i može biti uklonjen iz reverzno fazne kolone pomoću mobilne faze sa visokim procentom vode. Mobilne faze koje se koriste u većini analiza su smeše acetonitrila i vode u različitim odnosima, smeše vode i etanola, kao i smeše vode, metanola i sirćetne kiseline (112).

Tečna hromatografija sa masenom detekcijom

Tečna hromatografija sa tandemskim masenim detektorom (*Liquid chromatography with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) omogućava identifikaciju analita na osnovu njihove mase i molekularne strukture. LC-MS/MS se smatra najnaprednijom analitičkom tehnikom za kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikotoksina, uključujući i patulin. Postoji nekoliko opisanih metoda koje omogućavaju pouzdanu detekciju ovog jedinjenja, a uključuju negativnu elektrosprej jonizaciju (*Electrospray ionization, ESI*), hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*) ili fotojonizaciju pod atmosferskim pritiskom (*Atmospheric Pressure Photoionization, APPI*) (114).

Gasna hromatografija

Razvijene su brojne gasno hromatografske metode (*Gas chromatography, GC*), a karakteristično je formiranje trimetilsilil etarskih derivata, da bi se postigla potrebna isparljivost analita, koji se detektuju pomoću detektora zahvata elektrona ili masenom spektrometrijom. Opisano je i formiranje heptafluorobutirat derivata iz odgovarajućeg imidazola. Hromatografsko razdvajanje se postiže na nepolarnoj kapilarnoj silika koloni. U analizi patulina, opisana je procedura direktnog acilovanja pre ekstrakcije uzorka, pri čemu je dobijeni patulin acetat određivan gasnom hromatografijom sa masenom spektrometrijom (*Gas Chromatography Mass Spectrometry, GC-MS*) u režimu monitoringa izabranih jona. Razvijen je *in situ* metod acilovanja u kojem se patulin ekstrahuje pomoću difazne dijalize u dijaliznu cev koja sadrži rastvarač - metilen hlorid, agens za derivatizaciju - anhidrid sirćetne kiseline, derivatizacioni aktivator – 4-

N,N-dimetilaminopiridin i interni standard – nitrobenzen. Smeša se meša 24h na 25°C, zatim se uklanja organska faza iz cevi, a patulin acetat se hromatografski odvaja i detektuje masenom spektrometrijom. Zabeležena je i upotreba *on-column* injektovanja za analizu nederivatizovanog patulina (115).

Kapilarna elektroforeza

Micelarna elektrokinetička hromatografija (*Micellar electrokinetic chromatography, MEKC*) je moderna tehnika razdvajanja, nastala modifikacijom kapilarne elektroforeze. Ova tehnika podrazumeva uvođenje surfaktanta natrijum dodecil sulfata, pri čemu micidele koje se formiraju u rastvoru predstavljaju pseudo-stacionarnu fazu. MEKC sistem razdvajanja je sličan razdvajanju na koloni za tečnu hromatografiju, osim stacionarne faze koja se kreće kroz kolonu, ali sporije od mobilne faze. Mehanizam razdvajanja zavisi od razlike koeficijenata raspodele analita između vodene faze i pseudo-stacionarne faze. Prednost MEKC u odnosu na HPLC je činjenica da promene u drugoj fazi podrazumevaju samo izmene sastava pufera micidele, dok je kod HPLC neophodno promeniti stacionarnu fazu kolone. Ostale prednosti su u tome što MEKC zahteva male količine uzoraka (0,1-10 nL), metoda je brža i jeftinija u odnosu na HPLC i ne zagađuje okolinu, jer koristi vodeni pufer. Ova metoda se pokazala efikasnom i ekonomski pristupačnom za detekciju i kvantifikaciju patulina u jabukama, međutim, nije postignuto efikasno odvajanje patulina od interferenci (112).

Mikroemulziona elektrokinetička hromatografija

Mikroemulziona elektrokinetička hromatografija (*Microemulsion electrokinetic chromatography, MEECK*) je, takođe, korišćena za kvantitativno određivanje patulina u soku od jabuka. Praćeni su efekti ko-surfaktanata, koncentracije surfaktanta, procenta acetonitrila u mikroemulziji, napona i temperature na postizanje optimalnih uslova. U nekim studijama je zabeleženo da se MEECK tehnikom postiže bolje razdvajanje u odnosu na MEKC. Iako se od MEECK tehnike očekivala veća osetljivost, to nije postignuto (66).

Biološke metode

U novije vreme, u proučavanju patulina primenjuju se i metode koje uključuju molekularnu biologiju. Upotreba lančane reakcije polimeraze (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) privukla je značajnu pažnju istraživača, s obzirom na to da metod omogućava detekciju prisustva gena izoepoksidon dehidrogenaza u plesnima koje verovatno proizvode patulin. Ovaj gen predstavlja put ka biosintezi patulina i njegova detekcija može postati nova strategija za identifikaciju vrsta koje proizvode toksične metabolite (112).

4.1.2. Izabrana metoda za analizu patulina

Na osnovu procene komparativnih prednosti dostupnih metoda za analizu patulina, uzimajući u obzir primerenost za različite matrikse hrane, jednostavnost i brzinu u radu, pristupačnost reagenasa i instrumentacije, kao i eksperimentalno osvedočenje za odabrane metode pripreme uzoraka, kao najpogodnija izabrana je metoda zasnovana na ekstrakciji smešom etil acetata i heksana, praćena prečišćavanjem ekstrakcijom na čvrstoj fazi (C18 sorbent), razdvajanjem primenom tečne hromatografije i UV detekcijom (116).

Izabrana metoda omogućava jedinstven postupak za pripremu uzoraka različitih proizvoda od jabuka (tečni, polutečni ili čvrsti matriksi), jednostavna je i brza za izvođenje, koriste se rastvarači i reagensi, kao i pribor i instrumenti, uobičajeno dostupni u laboratorijama za rutinsku kontrolu bezbednosti hrane.

Detaljan opis izabrane analitičke metode dat je u odeljku 4.1.2.1.

4.1.2.1. Analitička metoda za analizu patulina

Standardni rastvori

Osnovni standardni rastvor patulina koncentracije 100 µg/mL u hloroformu (Supelco, Bellefonte, PA, USA) razblažen je metanolom (JT Baker, Deventer, Netherlands) do koncentracije 10 µg/mL. Zatim je 1 mL rastvora 10 µg/mL uparen do suva i rastvoren u 10 mL 0,1% rastvora sirćetne kiseline. Dobijeni rastvor koncentracije 1 µg/mL je korišćen za pravljenje kalibracionih rastvora koncentracija 10-1000 ng patulina/mL.

Napomena: patulin je nestabilan u suvom filmu, zato je nakon uparavanja do suva neophodno odmah rastvoriti suvi ostatak.

Priprema uzoraka

Reagensi: anhidrovani natrijum sulfat (Lach-ner, Neratovice, Czech Republic), natrijum hidrogen karbonat (Alkaloid, Skopje, Makedonija), oktadecil sorbent (C18; Supelco, Bellefonte, PA, USA), etil acetat (Merck, Darmstadt, Germany), heksan (JT Baker, Deventer, Netherlands), sirćetna kiselina (JT Baker, Deventer, Netherlands).

Aparati i pribor: centrifuga (Centurion K₂ Series), vakum manifold (Visiprep, Supelco), rotacioni vakum uparivač (Laborota d4011 digital, Heidolph), automatske mikropipete 20-100 i 100-1000 µL (Socorex), SPE kolone od 6 mL sa fritom (Supelco), polimerne kolone EASIMIP Patulin (R-Bipharm, Rhöne LTD, Glasgow, Scotland), epruvete za centrifugiranje od 50 mL, filter hartija, stakleno posuđe (erlenmajer tikvice, levkovi, graduisane i odmerne pipete, baloni, normalni sudovi).

Postupak: u epruvetu za centrifugiranje odmeriti 15 g anhidrovanog natrijum sulfata, 2 g natrijum hidrogen karbonata i 10 mL smeše etil acetata i heksana (3:2 v/v). Zatim dodati 10 g uzorka za analizu i smešu snažno mućkati na vorteksu u toku 3 minuta. Centrifugiranjem na 2000 g u toku 3 minuta postiže se efikasno razdvajanje organske i vodene faze. Alikvot od 2,5 mL organskog ekstrakta preneti na SPE kolonu sa 0,5 g nekondicioniranog C18 sorbenta, a eluat skupiti u čašu sa 50 µL 3% sirćetne kiseline u etil acetatu. Kolonu isprati sa 3 mL smeše etil acetata i heksana (3:2 v/v). Prečišćeni ekstrakt kvantitativno preneti u balon i upariti do suva na rotacionom vakuum uparivaču (<30°C). Suvi ostatak odmah rastvoriti u 0,5 mL vode pH 4. Finalni rastvor (5 g uzorka/mL), preneti u vialu od tamnog stakla. Pripremljen uzorak čuvati u zamrzivaču (-18°C) do analize.

Napomena: natrijum hidrogen karbonat se dodaje pri ekstrakciji da bi se zadržale potencijalno interferirajuće fenolne komponente u vodenoj fazi, ali je vreme kontakta uzorka sa bazom potrebno ograničiti, jer je patulin po strukturi lakton, što ga čini nestabilnim u baznoj sredini.

HPLC analiza

Reagensi: ultra čista voda (GenPure Water Purification System, Thermo Scientific, Thermoelectron LED, Langenselbold, Germany), acetonitril (LGC Promochem optigrade), perhlorna kiselina 70% (Lach-ner, Neratovice, Czech Republic).

Aparati i pribor: HPLC instrument Agilent 1100 Series sa degaserom (G1322A Degasser), kvaternom pumpom (G1311A Quat Pump), automatskim uzorkivačem za tečne uzorke (G1329A ALS), kompartmanom za kolonu (G1316A ColCom) i UV detektorom (G1314 VWD). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je kolona Agilent Zorbax SB-C18 5 µm 4,6 x 250 mm.

Hromatografski uslovi: injekciona zapremina 100 µL, temperatura kolone 20°C, protok mobilne faze (voda, acetonitril i perhlorna kiselina u odnosu 96:4:0,1) 1 mL/min. Talasna dužina detekcije 276 nm. Vreme analize iznosi 20 minuta.

Izračunavanje: koncentracija patulina u pripremljenim uzorcima određena je korišćenjem kalibracionog grafika zavisnosti površine pika od koncentracije patulina izražene u ng/mL, konstruisanog na osnovu odgovora detektora nakon injektovanja 100 µL kalibracionih rastvora patulina na analitičku kolonu. Sadržaj patulina u uzorku (µg/kg) izračunava se deljenjem analitički određene koncentracija patulina u pripremljenom uzorku (ng/mL) sa faktorom pet. Sadržaj patulina je korigovan za procenat prinosa na najpribližnijem koncentracionom nivou testiranom u validacionoj studiji metode.

4.2. KARAKTERIZACIJA METODE ZA ANALIZU PATULINA

4.2.1. Metodologija za karakterizaciju analitičke metode

Analitička metoda opisana u odeljku 4.1.2.1. okarakterisana je sledećim parametrima: selektivnost, linearnost, limit detekcije i kvantifikacije, tačnost i prinos, preciznost, granica ponovljivosti. Određena je i merna nesigurnost metode.

Selektivnost je proverena na bazi profila hromatograma dobijenih za standardni rastvor patulina i uzorak soka od jabuka u kojem nije detektovan patulin, poređenjem retencionih vremena patulina i drugih uočenih pikova. Ocenjeno je prisustvo interferirajućih signala na retencionom vremenu patulina.

Limit detekcije (*Limit of Detection, LOD*) i **limit kvantifikacije** (*Limit of Quantification, LOQ*) određeni su kao najniža koncentracija analita pripremljenog u blank matriksu koja daje hromatografski pik sa odnosom signal / šum 3 i 10, redom. Odgovarajuća koncentracija patulina (izražena u ng/mL) preračunata je u odnosu na količinu uzorka u finalnom ekstraktu (5 g/mL), i izražena u µg/kg uzorka.

Hromatografski opseg linearnosti ispitivan je analizom standardnih rastvora patulina na sedam koncentracionih nivoa: 10, 20, 50, 100, 250, 500 i 1000 ng/mL. Konstruisana je kalibraciona kriva primenom metode najmanjih kvadrata. Linearnost je ocenjena na osnovu vrednosti regresionog koeficienta (R^2), poređenjem sa kriterijumom prihvatljivosti $\geq 0,995$, kao i na osnovu analize rezidua, sa zahtevom da rezidualne vrednosti ne prelaze 10%.

Tačnost metode je određena na osnovu rezultata učešća u odabranim testiranjima osposobljenosti, u organizaciji akreditovanog provajdera: Šema za procenu performansi analize hrane (*Food Analysis Performance Assessment Scheme, FAPAS*) *Patulin in apple juice (clear) rounds 1647* (117), *1656* (118), poređenjem dobijenih rezultata sa dodeljenim vrednostima za sadržaj patulina.

Na osnovu z skora datog od strane provajdera za šeme ispitivanja osposobljenosti, ocenjena je sposobnost laboratorije za izvođenje analitičkog ispitivanja u odnosu na sledeći kriterijum: $|z| \leq 2$ “zadovoljavajući”, $2 < |z| < 3$ “upitan”, $|z| > 3$ “nezadovoljavajući”.

Prinos metode je određen na osnovu analize fortifikovanih uzoraka za koje je predhodno utvrđeno da ne sadrže patulin, i to soka od jabuka (bistri sok) i mešanog voćnog soka (mutni sok), na po pet koncentracionih nivoa u opsegu 10-100 µg/kg, kao i kašice za odojčad, na tri koncentraciona nivoa u opsegu 5-25 µg/kg, u po pet ponovljenih analiza za svaki fortifikacioni nivo i matriks.

Preciznost metode u uslovima ponovljivosti određena je kao relativna standardna devijacija, izračunata na osnovu pet ponovljenih analiza za svaki od datih fortifikacionih nivoa.

Prinos i preciznost metode ocenjeni su u odnosu na kriterijume prihvatljivosti za metode za određivanje sadržaja patulina u hrani, definisane Regulativom 401/2006 (119).

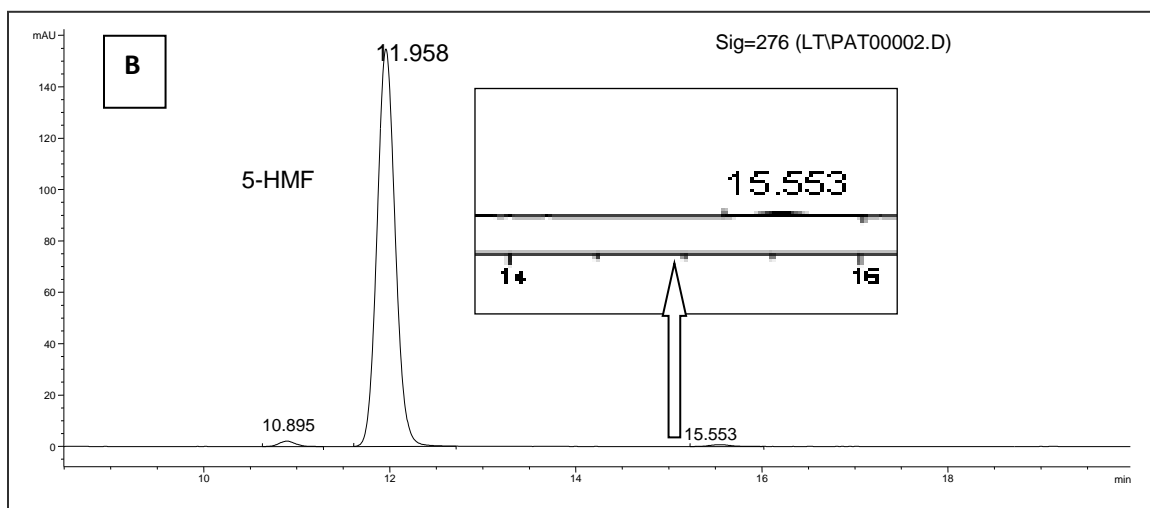
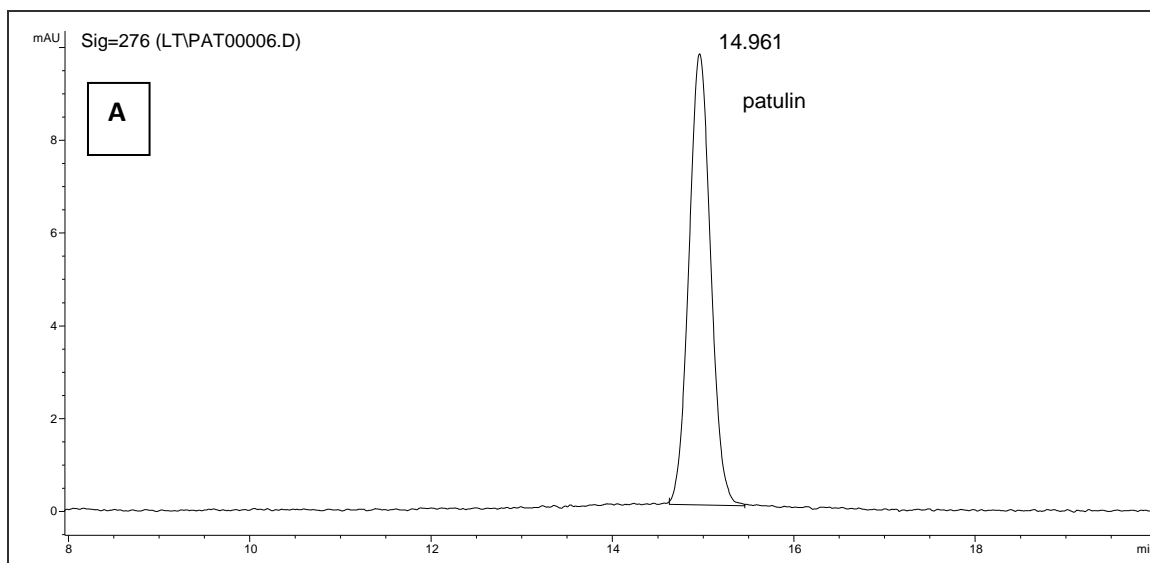
Granica ponovljivosti metode (r) izračunata je kao $2,8 \cdot SD$, gde je SD standardna devijacija u uslovima ponovljivosti.

Merna nesigurnost (*Measurement Uncertainty, U*) metode procenjena je korišćenjem Nordtest smernica (120), na osnovu rezultata učešća u testiranjima osposobljenosti.

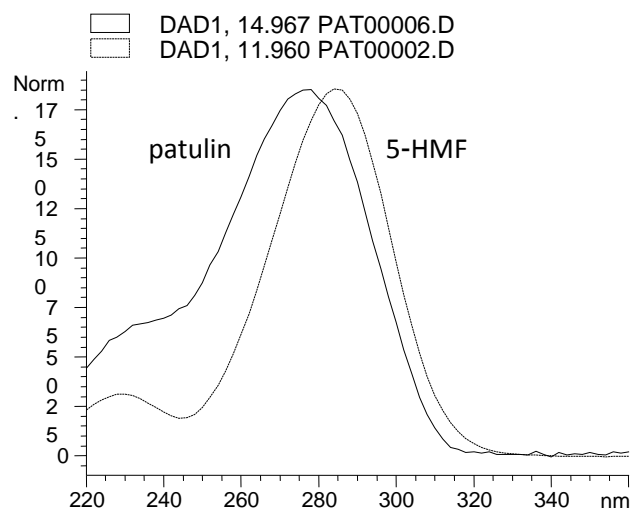
4.2.2. Rezultati i diskusija karakterizacije (validacije) metode za analizu patulina

Selektivnost: hromatogrami standardnog rastvora patulina i uzorka soka od jabuka koji ne sadrži patulin, prikazani na Slici 4.1 (hromatogram A: retenciono vreme patulina 14,96 min), pokazuju odsustvo interferirajućih signala na retencionom vremenu patulina.

Glavna intererena pri određivanju patulina je 5-hidroksimetilfurfural (5-HMF). Većina proizvoda od jabuka biva izložena visokoj temperaturi tokom procesa pasterizacije i isparavanja ($\pm 90^\circ\text{C}$) i stoga je u većini uzoraka prisutan HMF koji nastaje razgradnjom šećera kao što su glukoza i fruktoza pri pH 5 ili nižem. Patulin i HMF pokazuju maksimum apsorpcije u istoj oblasti talasnih dužina, što je prikazano na Slici 4.2, i stoga je za pouzdanu kvantifikaciju patulina neophodno razdvajanje ove dve komponente na baznoj liniji, što je primenjenom analitičkom metodom i postignuto (Slika 4.1 B: retenciono vremena 14,96 i 11,96 min, redom).

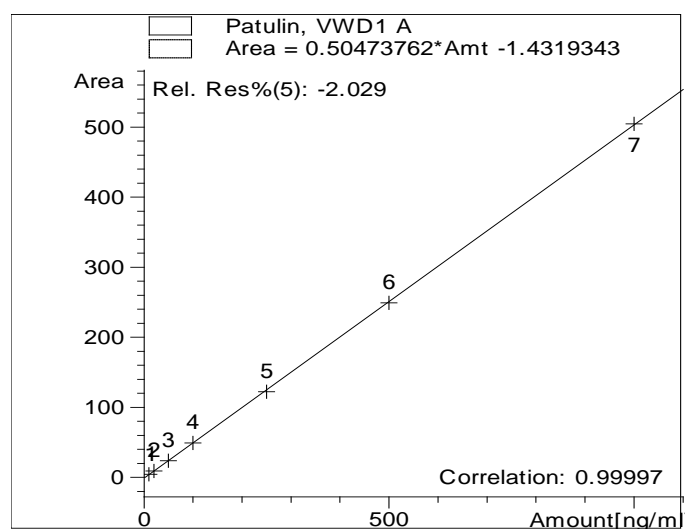


Slika 4.1. Hromatogrami standardnog rastvora patulina (250 ng/mL; A) i uzorka soka od jabuka koji ne sadrži patulin (B)



Slika 4.2. Apsorpcioni spektri patulina i 5-HMF u oblasti talasnih dužina od 220-360nm

Linearnost: rezultati ispitivanja linearnosti hromatografske metode prikazani su na Slici 4.3, zajedno sa jednačinom kalibracione prave. Analizom rezidua utvrđeno je da su odstupanja od jednačine prave na svim kalibracionim nivoima ispod 10%, što zajedno sa visokom vrednošću regresionog koeficijenta ($R^2=0,99997$) pokazuje zadovoljavajuću linearnost analitičkog odgovora.



Slika 4.3. Kalibracioni grafik patulina (c 10-1000 ng/mL)

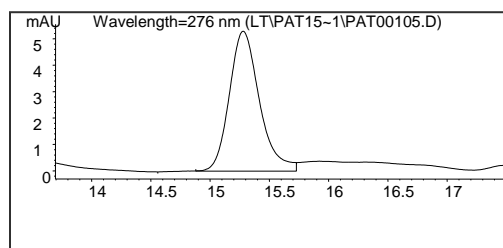
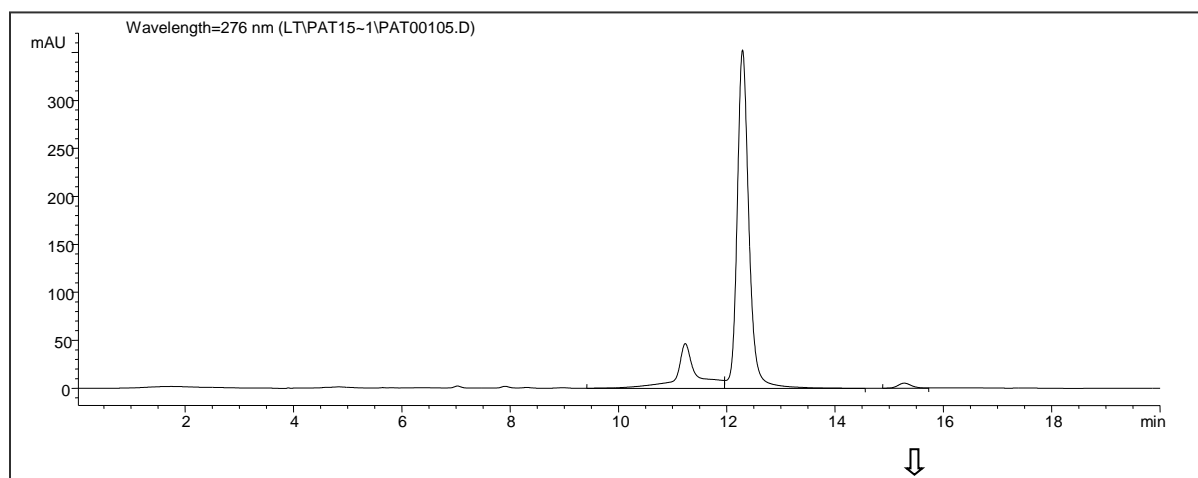
Limit detekcije i limit kvantifikacije: limit detekcije hromatografske metode iznosi 0,4 µg/kg, a limit kvantifikacije 1 µg/kg.

Limit kvantifikacije metode od 1 µg/kg je deset, odnosno pedeset puta niži od maksimalno dozvoljenih nivoa za patulin u hrani za odojčad i malu decu (10 µg/kg) i soku od jabuka (50 µg/kg), što metodu čini pogodnom ne samo za kontrolu bezbednosti hrane u odnosu na zakonske norme, već i za upotrebu rezultata za procenu izloženosti populacije.

Tačnost: rezultati analize uzoraka za testiranje osposobljenosti laboratorije prikazani su u Tabeli 4.1 (hromatogram na Slici 4.4). Tačnost metode se kreće od 105,9 do 117,6%, a potvrđena je i zadovoljavajućim z skorovima (0,3-0,8).

Tabela 4.1. Rezultati analize uzoraka za testiranje osposobljenosti

FAPAS <i>Patulin in apple juice, clear</i>	Dodeljena vrednost (µg/kg)	Laboratorijski rezultat (µg/kg)	z-skor	Tačnost (%)
<i>Round 1647</i>	39,3	46,2	0,8	117,6
<i>Round 1656</i>	45,7	48,4	0,3	105,9



Slika 4.4. Hromatogram uzorka *Fapas 1656 Patulin in apple juice* (sa uveličanim pikom patulina)

Prinos, preciznost i granica ponovljivosti: rezultati studije prinosa i preciznosti, kao i granice ponovljivosti metode prikazani su u Tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Prinos, preciznost i granica ponovljivosti određivanja patulina HPLC-UV metodom.

	Nivo fortifikacije (µg/kg)	Prosečan prinos (%) (n=5)	Preciznost (RSD) (%) (n=5)	Granica ponovljivosti (µg/kg)
Sok bistri (jabuka)	5	92	5,3	0,7
	10	88	2,1	0,5
	25	83	3,7	2,1
	50	81	6,1	6,9
	100	81	1,6	3,6
Sok mutni (mešana)	5	70	1,5	0,1
	10	70	7,9	1,5
	25	72	1,3	0,6
	50	75	4,8	5,0
	100	75	1,2	2,5
Kašica (mešana)	5	56	8,1	0,6
	10	60	4,2	0,7
	25	70	5,4	2,6

RSD – relativna standardna devijacija

Rezultati za prinos i preciznost u skladu su sa zahtevima za prinos i preciznost analitičke metode za određivanje sadržaja patulina propisanim EC Regulativom 401/2006 (119), prikazanim u Tabeli 4.3. Granica ponovljivosti se kreće od 0,5-6,9 µg/kg, zavisno od koncentracionog nivoa.

Tabela 4.3. Zahtevane karakteristike izvođenja analitičke metode za analizu patulina

Koncentracioni nivo (µg/kg)	RSD (%)	Prinos (%)
< 20	≤ 30	50-120
20-50	≤ 20	70-105
> 50	≤ 15	75-105

RSD – relativna standardna devijacija

Merna nesigurnost: proračun merne nesigurnosti metode prikazan je u Tabeli 4.4. Proširena merna nesigurnost metode (U), sa faktorom pokrivanja k=2, iznosi 26,7%.

Tabela 4.4. Proračun merne nesigurnosti metode za analizu patulina

1. Test osposobljenosti		2. Test osposobljenosti		Ukupan broj testova	2
Prosečna vrednost lab	46,2	Prosečna vrednost lab	48,4	Prosečna vrednost s	21,1
Dodeljena vrednost s	39,3	Dodeljena vrednost s	45,7	Prosečan broj lab učesnica	72
Broj lab učesnica	74	Broj lab učesnica	70	RMS u (c ref)	13,10
Bias lab	17,56	Bias lab	5,91	u (bias)	2,49
				U (k=2)	13,33
					26,7

4.2.3. Kontrola kvaliteta analitičkog rada

U cilju obezbeđenja poverenja u pouzdanosti merenja, u svaku analitičku seriju uključeni su i blank i kontrolni uzorak (fortifikovani blank uzorak), pripremljeni prema proceduri pripreme uzoraka, kao i standard za verifikaciju kalibracije.

Za odabrane uzorke za koje je utvrđeno prisustvo patulina, sprovedena je i druga, potvrдна analiza, korišćenjem polimernih kolona, prema proceduri za pripremu uzoraka opisanoj od strane proizvođača (R-Biopharm: Easimip patulin P250B/V1/26.10.11), praćena opisanom HPLC analizom. Potvrдна analiza je bila pozitivna u svim slučajevima. Kao mera eksterne kontrole kvaliteta, analizirani su uzorci za testiranje osposobljenosti *Patulin in apple juice, clear; FAPAS; rounds 1647 (117), 1656 (118)*.

5. ANALIZA PROIZVODA OD JABUKA

5.1. ANALIZA PATULINA

5.1.1. Materijal i metode za analizu patulina

5.1.1.1. Vrsta i brojnost uzoraka za analizu patulina

Analiza prisustva i sadržaja patulina obuhvatila je komercijalno dostupne proizvode od jabuka tipa sokova i hrane za odojčad i malu decu, koji se nalaze u slobodnom prometu u Republici Srbiji. Grupa sokova koji sadrže jabuke, obuhvatila je uzorke proizvedene na teritoriji Republike Srbije, koji čini više od 90% tržišta. Kao posebna grupa izdvojeni su sokovi koji su pakovani u ambalaži sa cevčicom, za koje su ciljna grupa deca. U grupi uzoraka koji pripadaju kategoriji hrane za odojčad i malu decu (sokovi i kašice), pored domaćih, uključeni su i uvozni proizvodi, jer dominiraju na tržištu po broju proizvođača i brendova. Broj uzoraka uslovljen je njihovom raspoloživošću na tržištu, jer se uzorak okarakterisan proizvođačem, brendom i sastavom proizvoda (u okviru grupe) ponavlja samo u različitim godinama uzorkovanja.

S obzirom na to da je za procenu izloženosti populacije važno raspolagati podacima iz dužeg vremenskog perioda, uzorkovanje i analiza proizvoda raspoređeni su u vremenskom okviru od tri godine. Proces uzorkovanja je lokalizovan na prodajne objekte u Novom Sadu, a uzorci su uzeti u jediničnim pakovanjima, kako su dostupni potrošačima, tako da kolekcija uzoraka praktično pokriva potpun spektar proizvoda od interesa raspoloživih na tržištu.

Sakupljeno je ukupno 356 uzoraka koju su primarno razvrstani u grupe prema populaciji kojoj su namenjeni: 114 voćnih sokova i kašica za odojčad i malu decu (pakovanja od 0,125 L, odnosno 0,120-0,190 kg), 100 voćnih sokova namenjenih deci (pakovanja jedinične zapremine 0,2 L, sa cevčicom) i 142 voćna soka namenjena opštoj populaciji (porodična pakovanja jedinične zapremine 0,7-2 L).

U okviru grupe sokovi, kao i sokovi sa cevčicom, uzorci su razvrstani prema tome da li sadrže samo jabuke ili i drugo voće (sokovi od jabuka ili mešani sokovi) i dalje prema sadržaju voća

(50% ili 100%), odnosno prema konzistenciji (bistri ili mutni). U kategoriji hrane za odojčad i malu decu, na sokove je primenjena ista podela kao što je napred navedeno, dok su kaše podeljene na kašice od jabuka i mešane kašice. Klasifikacija uzoraka prema navedenim kriterijumima sprovedena je na osnovu informacija datih na deklaraciji proizvoda. Proizvodi za odojčad i malu decu su kategorizovani i prema poreklu (uvezeni / domaća proizvodnja), dok su ostali sokovi poticali isključivo od domaćih proizvođača, i dodatno su razvrstani u podgrupe prema kriterijumu proizvođač / cenovna kategorija (niske, prosečne ili visoke cene, posmatrano u odnosu na ispitivano tržište).

S obzirom na to da način poljoprivredne proizvodnje, konvencionalni ili organski, može uticati na kontaminaciju jabuka plesnima koje proizvode patulin, a time i na prisustvo patulina u samim jabukama, ili od njih dobijenim proizvodima, uzorci obuhvaćeni studijom okarakterisani su i ovim parametrom. Međutim, kako je organska proizvodnja u Srbiji u začetku, na tržištu je prisutan veoma mali broj organskih proizvoda od jabuka iz domaće proizvodnje, a čak i kada se u obzir uzmu i uvozni proizvodi, zastupljenost organskih proizvoda od jabuka je veoma mala u odnosu na konvencionalne.

Struktura uzoraka prikazana je u Tabeli 5.1, po godinama uzorkovanja, kao i po grupama uzoraka. Tokom svake od tri godine sakupljeni su uzorci iz sve tri osnovne grupe proizvoda. U grupi hrane za odojčad i malu decu tokom sve tri godine bili su zastupljeni i sokovi i kašice. U grupi sokova sa cevčicom, godišnja kolekcija uzoraka je obuhvatala i sokove od jabuka i mešane sokove. Među sokovima namenjenim opštoj populaciji, ukupno 73 uzorka sokova od jabuka sakupljena su tokom leta 2013., 2014. i 2015. godine, dok su svih 69 uzoraka sokova od mešanog voća sakupljeni u leto 2014. godine. Detaljna struktura uzoraka u odnosu na ostale klasifikacione kriterijume biće prikazana u odeljku sa rezultatima istraživanja.

Svi uzorci su skladišteni na sobnoj temperaturi i otvarani neposredno pre analize, u roku trajanja proizvoda. Nakon uzimanja analitičkog dela uzorka, uzorci su skladišteni na -20°C.

Tabela 5.1. Struktura uzoraka za analizu sadržaja patulina, prikazana po godinama uzorkovanja.

Godina uzorkovanja:	2013	2014	2015	Ukupno
Hrana za odojčad i malu decu	27 (14 sokova + 13 kašica)	54 (21 sok + 33 kašice)	33 (13 sokova + 20 kašica)	114 (48 sokova + 66 kašica)
Sokovi (0,2 L sa cevčicom)	30 (10 jabuka + 20 mešani)	38 (13 jabuka + 25 mešani)	32 (11 jabuka + 21 mešani)	100 (34 jabuka + 66 mešani)
Sokovi (0,7-2 L)	23 (23 jabuka)	99 (30 jabuka + 69 mešani)	20 (20 jabuka)	142 (73 jabuka + 69 mešani)
Ukupno	77	191	85	356

5.1.1.2. Analitička metoda za analizu patulina

Za analizu uzoraka primenjena je metoda opisana u odeljku 4.1.2.1.

5.1.1.3. Statističke metode za analizu patulina

Za statistička izračunavanja primenjen je Statistica 13 software program (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

Deskriptivna statistika

Rezultati određivanja sadržaja patulina u proizvodima od jabuka opisani su parametrima deskriptivne statistike: opseg rezultata (minimalna i maksimalna vrednost), srednja vrednost i medijana, standardna devijacija.

Neparametarski testovi

Uzimajući u obzir da dobijeni rezultati za prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka nisu pokazali normalnu raspodelu, za procenu razlika korišćeni su neparametarski testovi:

- Pearson Chi-square test (u kombinaciji sa testom za poređenje proporcija), za ocenu razlika u zastupljenosti uzoraka kontaminiranih patulinom,
- Mann-Whitney i Kruskal-Wallis test (u kombinaciji sa testom višestrukog poređenja), za ocenu razlika u sadržaju patulina.

U okviru svake od pojedinačnih godina uzorkovanja, kao i za sve godine zajedno, statistički je testirana značajnost razlika u udelu kontaminiranih uzoraka i sadržaju patulina među parovima podgrupa u okviru grupe proizvoda od jabuka, kao i među grupama. Višegodišnji program uzorkovanja omogućio je i poređenje rezultata određivanja prisustva i sadržaja patulina u svakoj od grupa proizvoda od jabuka po godinama uzorkovanja. Statistički značajnim smatrane su vrednosti $p < 0,05$.

Logistička regresija

Primenom logističke regresije modelirana je zavisnost pojave / odsustva patulina (zavisno promenljiva) od nezavisno promenljivih faktora: godina uzorkovanja, vrsta voća (jabuka / mešano), sadržaj voća (50% / 100%), konzistencija soka (bistri / mutni), vrsta proizvoda (sok za odojčad i malu decu / sok (pakovanje sa cevčicom i porodično pakovanje)). Napomena: model se odnosi samo na sokove (izuzete su kašice za odojčad i malu decu). Rezultati su iskazani kao odnos šansi (*Odds ratio, OR*). Šansa je količnik verovatnoća pojavljivanja i odsustva pojave ako se posmatraju dve vrednosti faktora (šansa je odnos verovatnoća da se događaj desi prema verovatnoći da se događaj ne desi). OR je količnik dve šanse, a uobičajeno se iskazuje sa 95% intervalom poverenja (IP). U okviru univarijantne analize, ako je OR jednak 1 (približno jednak, statistički se ne razlikuje značajno od 1), tada se vrednosti faktora (moguća stanja u okviru jedne nezavisno promenljive) ne razlikuju u šansama za nastanak pojave koja se posmatra. Formiran je i model koji istovremeno uzima u obzir sve nezavisno promenljive. Rezultati su iskazani kao ROC kriva, a slaganje modela sa eksperimentalnim podacima je ocenjeno na osnovu površine ispod ROC krive.

Višestruka linearna regresija

Primenom višestruke linearne regresije modelirana je povezanost jedne zavisno promenljive (sadržaj patulina) sa više nezavisno promenljivih (godina uzorkovanja, vrsta voća (jabuka / mešano), sadržaj voća (50% / 100%), konzistencija soka (bistri / mutni), vrsta proizvoda (sok za odojčad i malu decu / sok (pakovanje sa cevčicom i porodično pakovanje)). Napomena: model se odnosi samo na sokove (izuzete su kašice za odojčad i malu decu). Zavisna promenljiva u ovom slučaju je neprekidnog tipa (uzima veliki broj vrednosti, za razliku od logističke regresije, gde zavisna promenljiva uzima samo dve vrednosti – ima / nema). Za sadržaj patulina uzete su u

obzir sve vrednosti, uključujući i nedetektovane, kojima je dodeljena vrednost nula. Razmatrano je koji deo ukupne varijacije u sadržaju patulina može biti objašnjen dejstvom faktora (nezavisno promenljiva, jedna ili sve zajedno), a rezultati su iskazani kroz koeficijent determinacije i standardnu grešku ocene modela.

5.1.2. Rezultati i diskusija o prisustvu i sadržaju patulina u proizvodima od jabuka

Karakteristični proizvodi od jabuka dostupni na tržištu su, pre svega, sokovi od jabuka ili jabuka i drugog voća, a kada su u pitanju odojčad i mala deca od interesa su i kašice na bazi voća. Uzimajući u obzir konačni cilj ovog rada, procenu izloženosti populacije posmatrane kroz karakteristične populacione grupe, uzorci proizvoda od jabuka razvrstani su u grupe prema populaciji kojoj su namenjeni: hrana za odojčad i malu decu (sokovi i kašice); sokovi u pakovanju sa cevčicom, namenjeni deci; sokovi u porodičnom pakovanju, namenjeni opštoj populaciji.

5.1.2.1. Rezultati prikazani po godinama uzorkovanja

Rezultati određivanja prisustva i sadržaja patulina u grupama proizvoda od jabuka, razvrstani po godinama uzorkovanja, prikazani su u Tabelama 5.2, 5.3 i 5.4.

Hrana za odojčad i malu decu

Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 5.2, uočava se da su učestalost prisustva i prosečni sadržaj patulina u sokovima za odojčad i malu decu opadali u nizu od 2013. godine (57,1%, 2,1 $\mu\text{g/kg}$), preko 2014. (42,9%, 1,9 $\mu\text{g/kg}$) do 2015. godine (30,8%, 0,6 $\mu\text{g/kg}$). U podgrupi sokova od jabuka utvrđen je znatno viši udeo kontaminiranih uzoraka u 2014. godini (83,3%) u odnosu na 2013. i 2015. godinu (po 33,3%), što je praćeno i znatno višom prosečnom koncentracijom patulina (4,1 u odnosu na 0,7 $\mu\text{g/kg}$). U podgrupi mešanih voćnih sokova, učestalost detekcije patulina bila je približno dvostruko viša u 2013. godini u odnosu na naredne dve godine, a opadajući trend zabeležen je i u pogledu prosečne koncentracije patulina.

Tabela 5.2. Prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka - sokovi i kašice za odojčad i malu decu.

	2013			2014			2015		
	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)
Sok (svi)	8/14 (57,1)	6,3	2,1±2,1	9/21 (42,9)	8,3	1,9±2,7	4/13 (30,8)	2,9	0,6±1,0
Sok od jabuka	1/3 (33,3)	2,2	0,7±1,3	5/6 (83,3)	8,3	4,1±3,4	1/3 (33,3)	2,1	0,7±1,2
100% ^c	0/2	-	-	4/5 (80,0)	8,3	4,2±3,8	1/2 (50,0)	2,1	1,1±1,5
50% ^c	1/1 (100)	2,2	1,1	1/1 (100)	3,2	3,2	0/1	-	-
Bistri ^d	0/2	-	-	3/4 (75,0)	8,3	4,3±4,4	1/2 (50,0)	2,1	1,1±1,5
Mutni ^d	1/1 (100)	2,2	1,1	2/2 (100)	3,8	3,5±0,4	0/1	-	-
Mešani sok	7/11 (63,6)	6,3	2,4±2,2	4/15 (26,7)	4,8	1,0±1,7	3/10 (33,3)	2,9	0,6±1,0
100% ^c	0/1	-	-	2/7 (28,6)	4,8	1,2±2,0	2/3 (66,7)	1,7	0,9±0,9
50% ^c	7/10 (70,0)	6,3	2,7±2,1	2/8 (25,0)	3,6	0,8±1,5	1/7 (14,3)	2,9	0,4±1,1
Bistri ^d	1/2 (50,0)	4,3	2,2	0/5	-	-	¼ (25,0)	1,2	0,3±0,6
Mutni ^d	6/9 (66,7)	6,3	2,5±2,2	4/10 (40,0)	4,8	1,5±2,0	2/6 (33,3)	2,9	0,8±1,2
Kašice (sve)	1/13 (7,7)	4,6	0,4±1,3	6/33 (18,2)	7,7	0,8±1,9	4/20 (20,0)	2,2	0,4±0,8
Kašice od jabuka	0/5	-	-	1/5 (20,0)	2,9	0,6±1,3	0/6	-	-
Mešane kašice	1/8 (12,5)	4,6	0,6±1,6	5/28 (17,9)	7,7	0,8±2,0	4/14 (28,6)	2,2	0,6±0,9
Ukupno	9/27 (33,3)	6,3	1,2±1,9	15/54 (27,8)	8,3	1,2±2,3	8/33 (24,2)	2,9	0,5±0,9

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka

Međusobno poređenje sokova od jabuka i mešanog voća pokazalo je podjednak udeo kontaminiranih uzoraka u 2015. godini, a dvostruko niži u 2013. i trostruko viši u 2014. godini u sokovima od jabuka. Značajnost razlika u učestalosti pojavljivanja patulina, kao i sadržaju patulina, statistički je potvrđena samo između sokova od jabuka i sokova od mešanog voća u 2014. godini ($p < 0,05$).

U kašicama, udeo kontaminiranih uzoraka rastao je u nizu od 2013. do 2015. godine (7,7%, 18,2% i 20,0%, redom), što je, pre svega, rezultat doprinosa kašica od mešanog voća (12,5%, 17,9% i 28,6%, redom), jer u kašicama od jabuka u 2013. i 2015. godini, kao ni u 80% uzoraka analiziranih u 2014. godini, patulin nije detektovan. Maksimalne koncentracije patulina izmerene u kašicama od mešanog voća iznosile su 4,6, 7,7 i 2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, redom po godinama, a prosečni sadržaj patulina u kašicama nije dostigao 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ni u jednoj godini. Potvrđena je statistički značajna razlika u učestalosti prisustva patulina između domaćih i uvezenih kašica u 2015. godini. Statistička analiza nije ukazala na značajnost razlika u rezultatima po godinama uzorkovanja ni u grupi sokova, ni u grupi kašica za odojčad i malu decu.

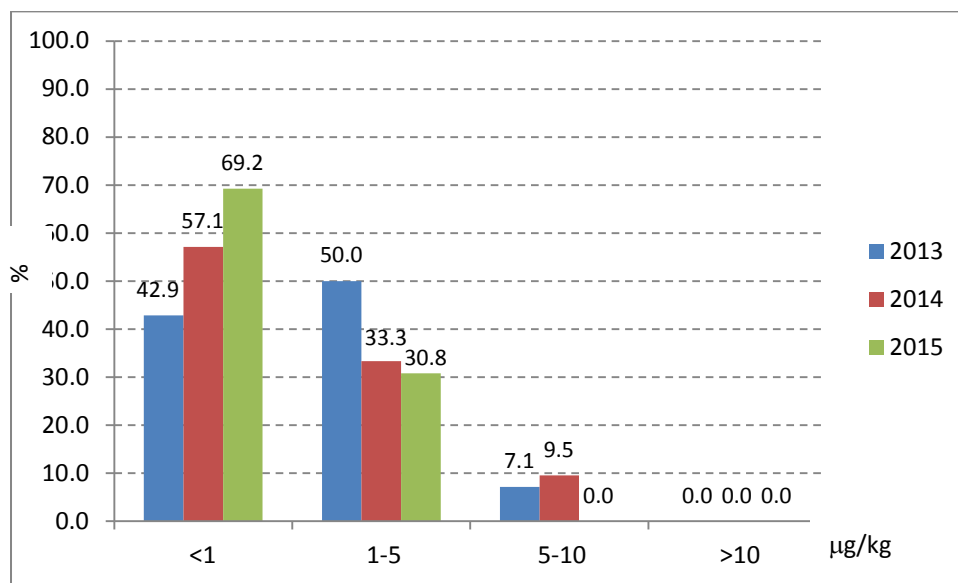
Kada se grupa hrane za odojčad i malu decu posmatra kao celina (i sokovi i kašice zajedno), udeo kontaminiranih uzoraka kretao se od 24,2% u 2015. godini do 33,3% u 2013. godini, a prosečni sadržaj patulina od 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u 2015. do 1,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u 2013. i 2014. godini.

Uz osvrt na poreklo uzoraka, interesantno je da je u 2015. godini prisustvo patulina detektovano samo u jednom od 16 uzoraka (mešani voćni sok) iz uvoza, u poređenju sa sedam od 17 uzoraka domaće proizvodnje.

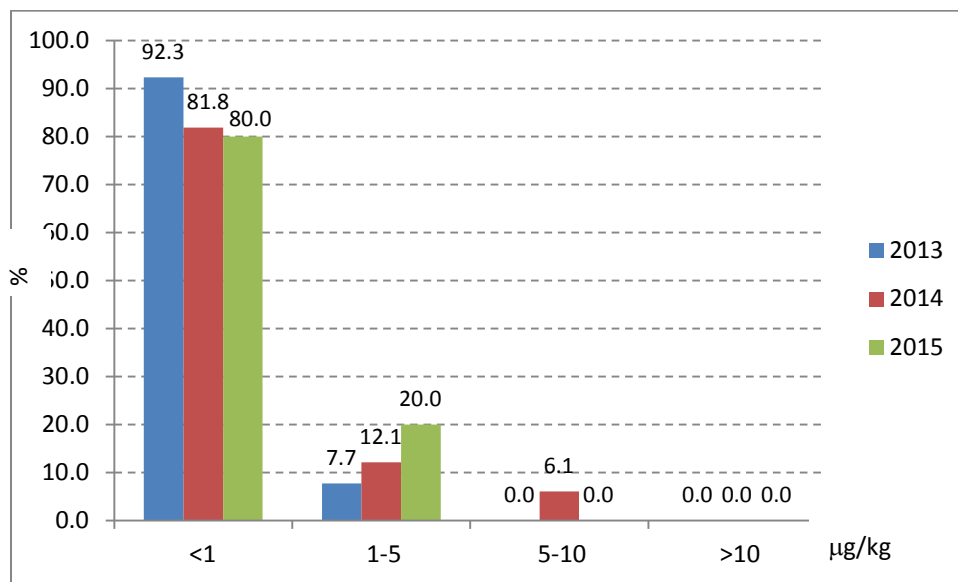
Za rezultate sumirane po godinama uzorkovanja, prikazana je i raspodela koncentracija patulina za sokove i za kašice za odojčad i malu decu (Grafik 5.1 i 5.2).

Raspodela koncentracija patulina prikazana je po karakterističnim opsezima: <1 , 1-5, 5-10, >10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, uzimajući u obzir zakonsko ograničenje za sadržaj patulina u hrani za odojčad i malu decu (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), sa razgraničavanjem opsega do polovine i do pune vrednosti maksimalno dozvoljene koncentracije. Raspodela koncentracija patulina u sokovima pokazala je najpovoljniju situaciju u 2015. godini, sa 69,2% uzoraka u kojima je koncentracija patulina ispod 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a nijedan od uzoraka ne prelazi nivo od 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Najviši udeo uzoraka sa sadržajem patulina u opsegu 5-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zabeležen je u 2014. godini (9,5%). Udeo uzoraka kašica sa

sadržajem patulina preko 1 µg/kg iznosio je maksimalno 20% u 2015. godini, a sadržaj patulina viši od 5 µg/kg zabeležen je samo u 6,1% uzoraka u 2014. godini.



Grafik 5.1. Raspodela koncentracija patulina u proizvodima od jabuka (sokovi) za odojčad i malu decu, prikazana po godinama uzorkovanja.



Grafik 5.2. Raspodela koncentracija patulina u proizvodima od jabuka (kašice) za odojčad i malu decu, prikazana po godinama uzorkovanja.

Sokovi u pakovanju sa cevčicom

Rezultati ispitivanja prisustva patulina u sokovima u pakovanju sa cevčicom pokazali su najvišu učestalost kontaminacije u 2014. godini (52,6%), u poređenju sa 2013. (30,0%) i 2015. godinom (43,8%) (Tabela 5.3). U podgrupi sokova od jabuka, udeo kontaminiranih uzoraka iznosio je 40,0% u 2013. godini, a u naredne dve godine održavao se na nivou oko 54%. U grupi mešanih sokova, najviši udeo kontaminiranih uzoraka zabeležen je u 2014. godini (52,0% u odnosu na 25,0% u 2013. i 38,1% u 2015. godini). Pri upoređivanju podgrupa sokovi od jabuka i mešani sokovi, podjednaka učestalost detekcije patulina zabeležena je u 2014. godini, dok je u 2013. i 2015. godini učestalost bila viša u sokovima od jabuka, ali Pirsonovim χ^2 testom nije potvrđena statistička značajnost razlika. Učestalost prisustva patulina bila je viša u sokovima sa sadržajem voća 100% u odnosu na 50% u svim slučajevima osim kod mešanih sokova u 2013. godini, ali je Pirsonovim χ^2 testom potvrđena značajnost razlike samo u mešanim sokovima iz 2014. godine (udeo kontaminiranih uzoraka 100% u odnosu na 40%).

Prosečna koncentracija patulina za grupu u celosti pokazala je tendenciju opadanja redom po godinama: 2,9, 2,6 i 1,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kada se uporede sokovi od jabuka i mešani sokovi, više prosečne koncentracije utvrđene su u sokovima od jabuka u 2013. i 2015. godini, a u 2014. godini u mešanim sokovima. Više prosečne koncentracije patulina zabeležene su u sokovima sa sadržajem voća 100% u odnosu na 50% u obe podkategorije (sokovi od jabuka i mešani sokovi) u 2014. godini, kao i u 2015. godini u podkategoriji mešanih sokova, ali je Mann-Whitney testom kao statistički značajna ocenjena samo razlika u mešanim sokovima u 2014. godini.

Svi sokovi od jabuka, uzorkovani tokom sve tri godine, bili su bistre konzistencije. Među mešanim sokovima utvrđene su viša učestalost i viša prosečna koncentracija patulina u mutnim u odnosu na bistre sokove u 2013. i 2014. godini, dok je u 2015. godini situacija bila obrnuta. U celokupnoj grupi sokova u pakovanju sa cevčicom, najviši nivoi kontaminacije od 30,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u 2013. i 16,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u 2014. godini, zabeleženi su u mutnom mešanom soku sa 50% voćnog sadržaja, odnosno 23,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u 2015. godini u bistrom soku od jabuka sa 50% voćnog sadržaja.

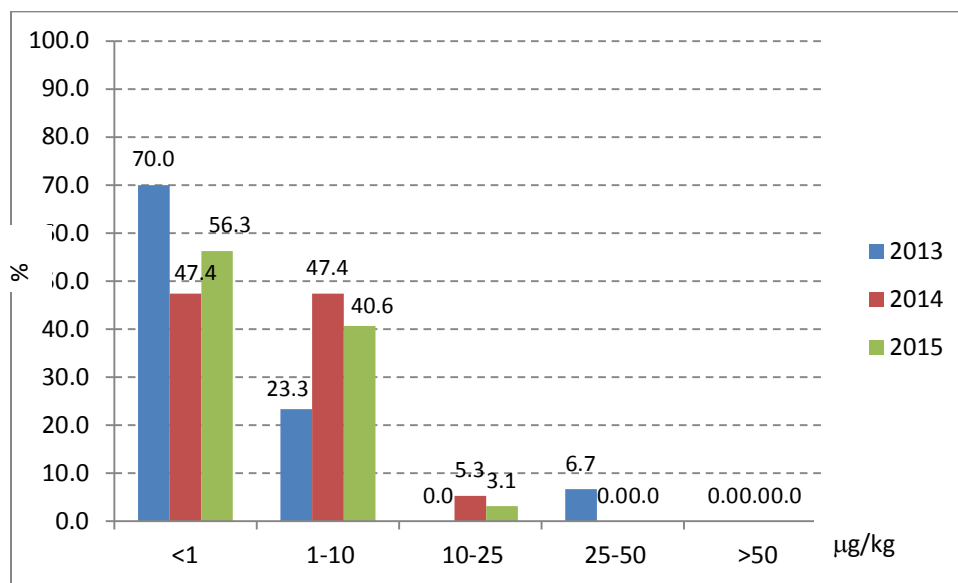
Statistička analiza nije ukazala na značajnost razlika u rezultatima među godinama uzorkovanja, ni u pogledu učestalosti prisustva ni u pogledu sadržaja patulina u grupi sokova u pakovanju sa cevčicom.

Tabela 5.3. Prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka - sokovi u pakovanju sa cevčicom.

	2013			2014			2015		
	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)
Sok (svi)	9/30 (30,0)	30,2	2,9±7,2	20/38 (52,6)	16,4	2,6±4,0	14/32 (43,8)	23,8	1,7±4,3
Sok od jabuka	4/10 (40,0)	26,4	3,6±8,2	7/13 (53,8)	7,9	2,4±2,9	6/11 (54,5)	23,8	3,1±7,0
100% ^c	2/4 (50,0)	5,5	1,8±2,6	3/4 (75,0)	6,9	3,1±2,9	2/3 (66,7)	3,4	1,6±1,7
50% ^c	2/6 (33,3)	26,4	4,7±10,6	4/9 (44,4)	7,9	2,1±3,0	4/8 (50,0)	23,8	3,6±8,2
Mešani sok	5/20 (25,0)	30,2	2,6±8,9	13/25 (52,0)	16,4	2,7±4,6	8/21 (38,1)	5,0	1,0±1,6
100% ^c	1/5 (20,0)	3,9	0,8±1,7	5/5 (100)	15,6	5,4±5,8	2/4 (50,0)	5,0	1,9±2,4
50% ^c	4/15 (26,7)	30,2	3,2±7,9	8/20 (40,0)	16,4	2,0±4,1	6/17 (35,3)	4,7	0,8±1,4
Bistri ^d	1/5 (20,0)	3,8	0,8±1,7	2/6 (33,3)	5,7	1,4±2,4	3/5 (60,0)	4,7	1,5±1,9
Mutni ^d	4/15 (26,7)	30,2	3,2±7,9	11/19 (57,9)	16,4	3,1±5,1	5/16 (31,3)	5,0	0,9±1,5

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka

Za rezultate sumirane po godinama uzorkovanja prikazana je i raspodela koncentracija patulina za sokove u pakovanju sa cevčicom (Grafik 5.3).



Grafik 5.3. Raspodela koncentracija patulina u sokovima od jabuka (pakovanja 0,2 L sa cevčicom) prikazana po godinama uzorkovanja.

Raspodela koncentracija patulina prikazana je po karakterističnim opsezima: <1, 1-10, 10-25, 25-50, >50 µg/kg, uzimajući u obzir zakonsko ograničenje za sadržaj patulina u hrani za odojčad i malu decu (10 µg/kg), koje nije primenjivo na uzorke sokova u pakovanju sa cevčicom, ali je od interesa zbog rangiranja proizvoda, kao i relevantno zakonsko ograničenje za analiziranu vrstu proizvoda od 50 µg/kg (sa razgraničavanjem opsega do polovine i do pune vrednosti maksimalno dozvoljene koncentracije).

Koncentraciju patulina u opsegu 1-10 µg/kg pokazalo je 23,3% uzoraka u 2013. godini, odnosno približno dvostruko više uzoraka u 2014. i 2015. godinu (47,4% i 40,6%, redom). Sadržaj patulina prevazišao je 10 µg/kg u 5,3% i 3,1% uzoraka u 2014. i 2015. godini, redom, a sadržaj patulina veći od 25 µg/kg utvrđen je samo u 6,7% uzoraka iz 2013. godine.

Sokovi u porodičnom pakovanju

U sve tri godine studije zabeležena je visoka učestalost detekcije patulina u sokovima od jabuka, u rasponu od 65,0% (2015. g.) do 80,0% (2014. g.) (Tabela 5.4). U pogledu učestalosti pojavljivanja patulina u sokovima sa 50% i 100% voćnog sadržaja, Pirsonovim χ^2 testom utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika ni u jednoj od tri ispitivane godine ponaosob. Mada su zabeležene približno dvostruko veće prosečne koncentracije patulina u sokovima sa 50% voćnog sadržaja, ni ove razlike nisu bile statistički značajne. Eventualne razlike usled konzistencije soka od jabuka nisu mogle biti istražene zbog malog broja mutnih sokova (ukupno šest u sve tri godine).

Za sokove od mešanog voća dostupni su rezultati samo za 2014. godinu. Patulin je detektovan u 27,5% uzoraka, prosečna vrednost je iznosila 2,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a maksimalna utvrđena 28,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Učestalost detekcije patulina bila je 3,5 puta viša u sokovima sa 50% u odnosu na 100% voćnog sadržaja, što je statističkom analizom potvrđeno kao značajna razlika, što nije slučaj sa prosečnim koncentracijama patulina. Poređenjem bistrih i mutnih mešanih sokova, utvrđena je statistički značajna razlika, kako u pogledu udela kontaminiranih uzoraka, tako i u odnosu na prosečan sadržaj patulina (oko četiri, odnosno dva puta više vrednosti za bistro sokove, redom).

Značajno je da sadržaj patulina u 94,2% mešanih sokova odgovara čak i zahtevima za dečiju hranu (nivo patulina ispod 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Poređenje sokova od jabuka i mešanih sokova iz 2014. godine pokazalo je približno tri puta veći udeo kontaminiranih uzoraka i četiri puta višu prosečnu koncentraciju patulina u sokovima od jabuka, što je i statistički potvrđeno kao značajne razlike.

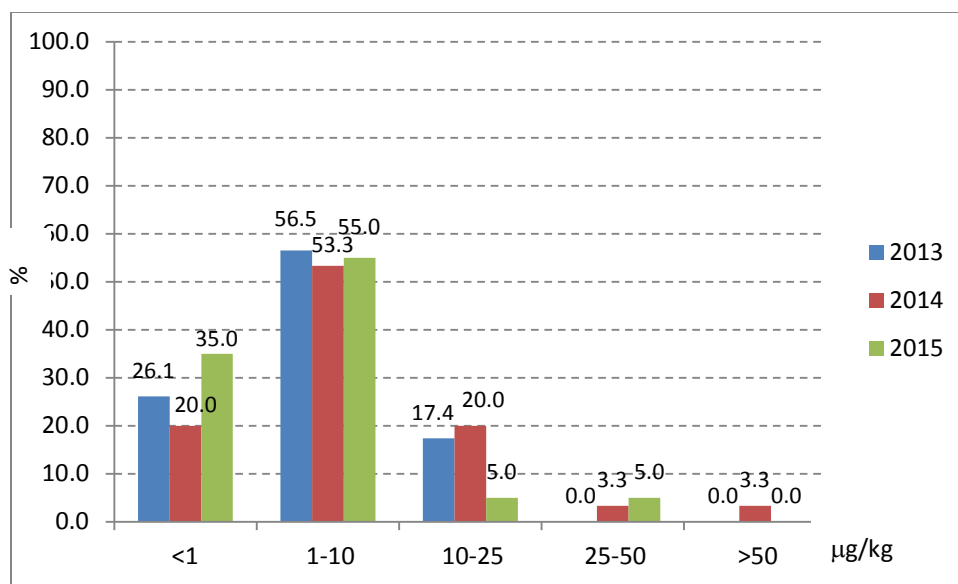
Dalja analiza rezultata usmerena je na ispitivanje mogućeg uticaja godine proizvodnje na prisustvo patulina, a sprovedena je na skupu uzoraka sokova od jabuka. Najviši udeo kontaminiranih uzoraka (80,0%) i najviši prosečni sadržaj patulina (8,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), kao i maksimalna koncentracija patulina u pojedinačnom uzorku (65,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$.) zabeleženi su u 2014. godini, ali statistička analiza nije dokazala značajnost razlika među pojedinačnim godinama uzorkovanja.

Tabela 5.4. Prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka - sokovi u porodičnom pakovanju.

	2013			2014			2015		
	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	N ^b (%) / N	Opseg (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)
Sok (svi)	/	/	/	43/99 (43,4)	65,4	4,0±8,9	/	/	/
Sok od jabuka	17/23 (73,9)	23,3	5,8±6,4	24/30 (80,0)	65,4	8,5±13,6	13/20 (65,0)	41,7	4,0±9,3
100% ^c	7/10 (70,0)	11,0	4,1±4,0	12/16 (75,0)	20,5	5,6±6,1	5/7 (71,4)	4,3	1,9±1,6
50% ^c	10/13 (76,9)	23,3	7,2±7,6	12/14 (85,7)	65,4	11,8±18,6	8/13 (61,5)	41,7	5,1±11,5
Bistri ^d	16/22 (72,7)	23,3	5,7±6,5	20/26 (76,9)	65,4	9,3±14,4	12/19 (63,2)	41,7	4,1±9,6
Mutni ^d	1/1 (100)	9,7	9,7	4/4 (100)	4,3	3,3±1,0	1/1 (100)	1,6	1,6
Mešani sok	/	/	/	19/69 (27,5)	28,0	2,1±4,9	/	/	/
100% ^c	/	/	/	2/20 (10,0)	7,3	0,5±1,8	/	/	/
50% ^c	/	/	/	17/49 (34,7)	28,0	2,7±5,6	/	/	/
Bistri ^d	/	/	/	10/15 (66,7)	10,5	3,2±3,4	/	/	/
Mutni ^d	/	/	/	9/54 (16,7)	28,0	1,7±5,2	/	/	/

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka

Raspodela koncentracija patulina prikazana je po karakterističnim opsezima, formiranim na način kako je to obrazloženo za grupu sokova u pakovanju sa cevčicom, s obzirom da za obe grupe proizvoda važi isto zakonsko ograničenje (50 µg/kg). Nezavisno od godine uzorkovanja, nešto više od polovine uzoraka pokazalo je nizak sadržaj patulina, u opsegu od 1-10 µg/kg, što u zbiru sa 20-35% uzoraka u kojima nije detektovan patulin čini 73-90% uzoraka koji su usaglašeni i sa znatno strožim zakonskim ograničenjem za hranu za odojčad i malu decu od 10 µg/kg (Grafik 5.4).



Grafik 5.4. Raspodela koncentracija patulina u sokovima od jabuka (pakovanja od 0,7-2 L), prikazana po godinama uzorkovanja.

5.1.2.2. Rezultati sumirani za period trajanja istraživanja

Da bi se ojačala osnova za izvođenje zaključaka, i logičkih i statističkih, sumirani su rezultati ispitivanja prisustva i sadržaja patulina po grupama proizvoda od jabuka dostupnih na tržištu Republike Srbije za celokupan trogodišnji period (2013-2015). Sumarni rezultati prikazani su u Tabelama 5.5, 5.6 i 5.7, redom za hranu za odojčad i malu decu, za sokove u pakovanju sa cevčicom i za sokove u porodičnim pakovanjima. Na sumarne rezultate primenjeni su isti statistički testovi kao i na rezultate u grupama uzoraka u okviru pojedinačnih godina uzorkovanja, a upoređene su i međusobno grupe proizvoda od jabuka.

Uzimajući u obzir da su za procenu hronične izloženosti populacije merodavni podaci iz dužeg vremenskog perioda, za potrebe izračunavanja izloženosti sumirani su rezultati za sadržaj patulina u svakoj od grupa proizvoda od jabuka u celosti (svi uzorci iz grupe iz celokupnog perioda 2013-2015).

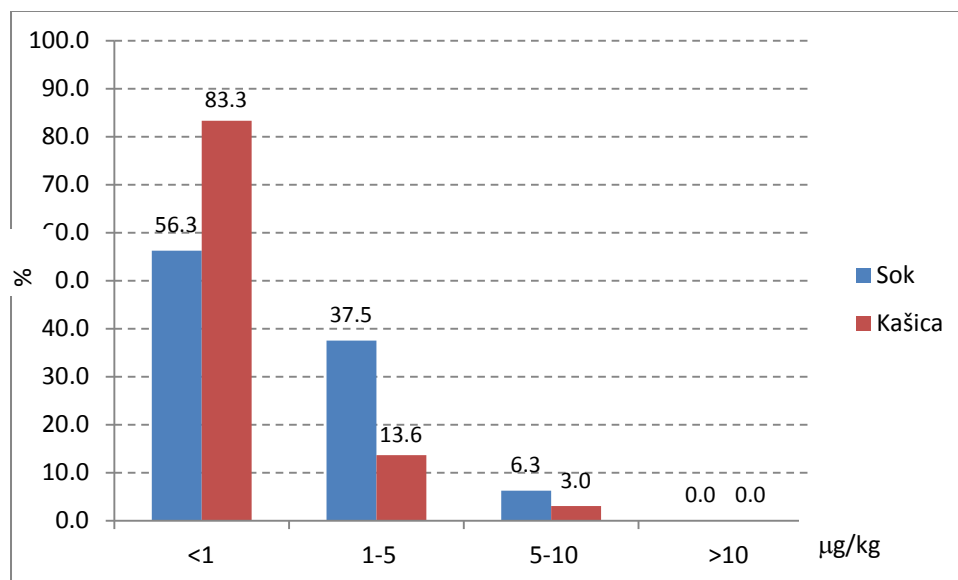
Hrana za odojčad i malu decu

U grupi proizvoda za odojčad i malu decu (Tabela 5.5) patulin je detektovan u 43,8% sokova i 16,7% kašica, u prosečnim koncentracijama od 1,6 i 0,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, redom. Razlike između sokova i kašica su bile statistički značajne ($p < 0,05$) u pogledu udela kontaminiranih uzoraka, dok za sadržaj patulina nisu utvrđene značajne razlike ($p > 0,05$). Maksimalni utvrđeni sadržaj patulina iznosio je 8,3 i 7,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ u sokovima i kašicama, redom. Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u sadržaju patulina ili udelu kontaminiranih uzoraka između parova podgrupa hrane za odojčad i malu decu formiranih na osnovu vrste voća, voćnog sadržaja ili konzistencije ($p > 0,05$). U pogledu porekla uzoraka, zabeležen je viši udeo kontaminiranih uzoraka među domaćim proizvodima (52,2% sokova i 23,3% kašica) u odnosu na uvezene proizvode (36,0% i 11,1%), mada razlike nisu bile statistički značajne, a prosečne koncentracije obe podgrupe su bile približne ukupnoj prosečnoj koncentraciji. Na Grafiku 5.5 izdvojen je uporedni prikaz raspodela koncentracije patulina u sokovima i kašicama za odojčad i malu decu: 18 od 21 kontaminiranih sokova i devet od 11 kontaminiranih kašica sadržali su patulin u koncentraciji do polovine maksimalno dozvoljenog nivoa (koncentracioni opseg 1-5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), što se odrazilo i na nizak prosečni nivo kontaminacije.

Tabela 5.5. Prisustvo patulina u proizvodima od jabuka (sokovi i kašice) za odojčad i malu decu (2013-2015).

	N	N ^b (%)	Koncentracioni opseg (µg/kg) [N (%)]				Maksimum (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	Prosek ^b ± SD (µg/kg)
			< 1	1-5	5-10	>10			
Sok (svi)	48	21 (43,8)	27 (56,3)	18 (37,5)	3 (6,3)	0	8,3	1,6 ± 2,2	3,6 ± 1,9
Sok od jabuke	12	7 (58,3)	5 (41,7)	5 (41,7)	2 (16,7)	0	8,3	2,4 ± 3,0	4,1 ± 2,9
100% ^c	9	5 (55,6)	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)	0	8,3	2,6 ± 3,4	4,7 ± 3,3
50% ^c	3	2 (66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)	0	0	3,2	1,8 ± 1,6	2,7 ± 0,7
Bistri ^d	8	4 (50,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	0	8,3	2,4 ± 3,6	4,9 ± 3,8
Mutni ^d	4	3 (75,0)	1 (25,0)	3 (75,0)	0	0	3,8	2,3 ± 1,7	3,1 ± 0,8
Mešani sok	36	14 (38,9)	22 (61,1)	13 (36,1)	1 (2,8)	0	6,3	1,3 ± 1,8	3,4 ± 1,3
100% ^c	11	4 (36,4)	7 (63,3)	4 (36,4)	0	0	4,8	1,0 ± 1,7	2,8 ± 1,6
50% ^c	25	10 (40,0)	15 (60,0)	9 (36,0)	1 (4,0)	0	6,3	1,4 ± 1,9	3,6 ± 1,1
Bistri ^d	11	2 (18,2)	9 (81,8)	2 (18,2)	0	0	4,4	0,5 ± 1,3	2,8 ± 2,3
Mutni ^d	25	12 (48,0)	13 (52,0)	11 (44,0)	1 (4,0)	0	6,3	1,7 ± 1,9	3,5 ± 1,2
Kašice (sve)	66	11 (16,7)	55 (83,3)	9 (13,6)	2 (3,0)	0	7,7	0,6 ± 1,5	3,4 ± 2,0
Kašice od jabuka	16	1 (6,3)	15 (93,8)	1 (6,3)	0	0	2,9	0,2 ± 0,7	2,9
Mešane kašice	50	10 (20,0)	40 (80,0)	8 (16,0)	2 (4,0)	0	7,7	0,7 ± 1,7	3,5 ± 2,1
Ukupno	114	32 (28,1)	82 (71,9)	27 (23,7)	5 (4,4)	0	8,3	1,0 ± 1,6	3,5 ± 2,2

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka



Grafik 5.5. Raspodela koncentracija patulina u proizvodima od jabuka (sokovi i kašice) za odojčad i malu decu (2013-2015)

Sokovi u pakovanju sa cevčicom

U grupi sokova u pakovanju sa cevčicom, udeo kontaminiranih uzoraka iznosio je 43,0%, a prosečna koncentracija patulina 2,4 µg/kg (Tabela 5.7). Sokovi od jabuka pokazali su višu prosečnu koncentraciju (3,0 µg/kg) i udeo kontaminiranih uzoraka (50,0%) u odnosu na mešane sokove (2,1 µg/kg i 39,4%), ali razlike nisu bile statistički značajne. Statistička analiza, takođe, nije pokazala značajan uticaj voćnog sadržaja niti konzistencije soka na sadržaj patulina i udeo kontaminiranih uzoraka (napomena: svi analizirani sokovi od jabuka bili su bistre konzistencije). Međutim, i sokovi od jabuka i mešani sokovi sa 100% voćnog sadržaja premašili su udeo od 50% kontaminiranih uzoraka, za razliku od sokova sa 50% voćnog sadržaja.

Tabela 5.6. Prisustvo patulina u sokovima od jabuka (pakovanja zapremine 0,2 L sa cevčicom) za decu (2013-2015).

	N	N ^b (%)	Koncentracioni opseg (µg/kg) [N (%)]					Maksimum (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	Prosek ^b ± SD (µg/kg)
			< 1	1-10	10-25	25-50	> 50			
Sok (svi)	100	43 (43,0)	57 (57,0)	38 (38,0)	3 (3,0)	2 (2,0)	0	30,2	2,4 ± 5,2	5,6 ± 6,8
Sok od jabuka	34	17 (50,0)	17 (50,0)	15 (44,1)	1 (2,9)	1 (2,9)	0	26,4	3,0 ± 6,0	5,9 ± 7,5
100% ^c	11	7 (63,6)	4 (36,4)	7 (63,6)	0	0	0	6,9	2,2 ± 2,4	3,4 ± 2,1
50% ^c	23	10 (43,5)	13 (56,5)	8 (34,8)	1 (4,3)	1 (4,3)	0	26,4	3,3 ± 7,2	7,6 ± 9,5
Mešani sok	66	26 (39,4)	40 (60,6)	23 (34,8)	2 (3,0)	1 (1,5)	0	30,2	2,1 ± 4,8	5,4 ± 6,4
100% ^c	14	8 (57,1)	6 (42,9)	7 (50,0)	1 (7,1)	0	0	15,6	2,8 ± 4,1	4,8 ± 4,5
50% ^c	52	18 (34,6)	34 (65,4)	16 (30,8)	1 (1,9)	1 (1,9)	0	30,2	2,0 ± 5,0	5,7 ± 7,2
Bistri ^d	15	6 (40,0)	9 (60,0)	6 (40,0)	0	0	0	5,7	1,3 ± 2,0	3,3 ± 1,8
Mutni ^d	51	20 (39,2)	31 (60,8)	17 (33,3)	2 (3,9)	1 (2,0)	0	30,2	2,4 ± 5,4	6,1 ± 7,2

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka

Raspodela koncentracija patulina pokazala je da 88% kontaminiranih uzoraka (38 od 43) sadrži patulin u koncentracijama koje su čak ispod maksimalno dozvoljenih za hranu za odojčad i malu decu. Podgrupe sokova od jabuka i mešanih sokova pokazale su međusobno sličan udeo uzoraka sa koncentracijom patulina u opsegu 1-10 µg/kg. U kontekstu preporuke date od strane Baert i saradnika (121), usmerene na smanjenje maksimalno dozvoljene koncentracije patulina u sokovima od jabuka na 25 µg/kg kao korisne mere za smanjenje rizika za decu, značajno je da samo 2,9% uzoraka sokova od jabuka i 1,5% mešanih sokova (ukupno 2,0%) analiziranih u ovom radu premašuje sadržaj patulina od 25 µg/kg.

Sokovi u porodičnom pakovanju

Patulin je detektovan u 51,4% sokova u porodičnom pakovanju, prosečna koncentracija je iznosila 4,3 µg/kg, a maksimalna zabeležena 65,4 µg/kg (Tabela 5.8). Sokovi od jabuka su pokazali statistički značajno viši udeo kontaminiranih uzoraka (74,0%) i višu prosečnu koncentraciju patulina (6,4 µg/kg) u odnosu na mešane sokove (27,5% i 2,1 µg/kg) ($p < 0,05$). Utvrđeno je da udeo kontaminiranih uzoraka prevazilazi 70% među sokovima od jabuka u svakoj od formiranih podgrupa prema voćnom sadržaju i konzistenciji, dok su među mešanim sokovima samo bistri pokazali prisustvo patulina u više od 50% uzoraka. U grupi mešanih sokova, statistički je potvrđena značajnost doprinosa bistre konzistencije soka višoj prosečnoj koncentraciji patulina i većem udelu kontaminiranih uzoraka (nasuprot mutnih sokova), dok je niži voćni sadržaj (50% u odnosu na 100%) povezan sa višim udelom kontaminiranih uzoraka. U grupi sokova od jabuka razmatrane razlike nisu bile statistički značajne.

Raspodela koncentracija patulina, izražena u odnosu na kontaminirane uzorke, pokazala je da 75,3% kontaminiranih uzoraka (74,1% sokova od jabuka i 78,9% mešanih sokova) sadrži patulin u veoma niskim koncentracijama, čak ispod 10 µg/kg (maksimalno dozvoljeni nivo patulina u hrani za odojčad i malu decu). Sadržaj patulina u 20,4% kontaminiranih sokova od jabuka i 15,8% mešanih sokova kretao se u opsegu 10-25 µg/kg. Time je ukupno 95% kontaminiranih uzoraka pokazalo sadržaj patulina ispod 25 µg/kg (polovina maksimalno dozvoljene vrednosti), što je nivo označen od strane Baert i saradnika (121) koji bi značajno uticao na smanjenje rizika za decu.

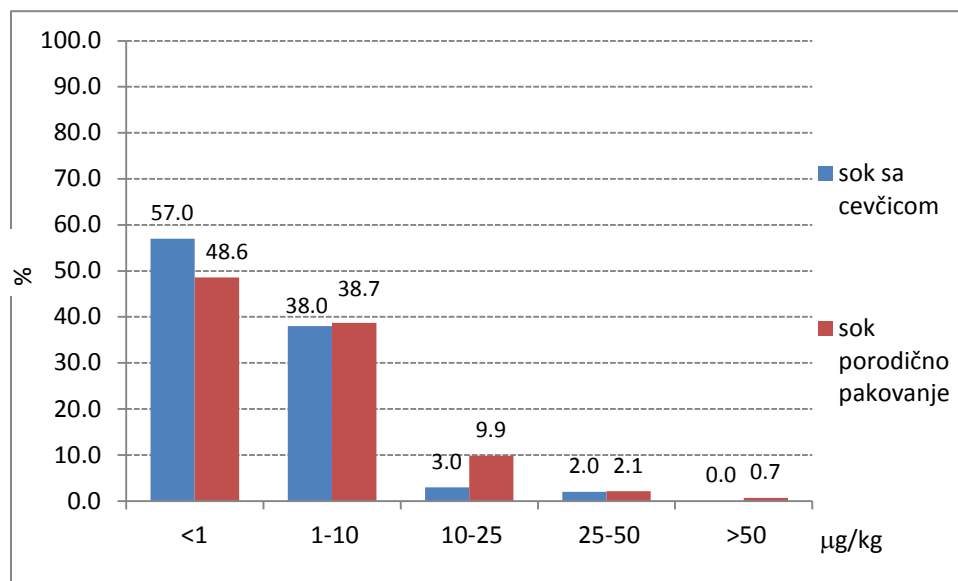
Tabela 5.7. Prisustvo patulina u sokovima od jabuka (pakovanja od 0,7-2 L) (2013-2015).

	N	N ^b (%)	Koncentracioni opseg (µg/kg) [N (%)]					Maksimum (µg/kg)	Prosek ^a ± SD (µg/kg)	Prosek ^b ± SD (µg/kg)
			< 1	1 -10	10-25	25-50	>50			
Sok (svi)	142	73 (51,4)	69 (48,6)	55 (38,7)	14 (9,9)	3 (2,1)	1 (0,7)	65,4	4,3 ± 8,6	8,4 ± 10,5
<i>Sok od jabuka</i>	73	54 (74,0)	19 (26,0)	40 (54,8)	11 (15,1)	2 (2,7)	1 (1,4)	65,4	6,4 ± 10,6	8,7 ± 11,6
100% ^c	33	24 (72,7)	9 (27,3)	19 (57,6)	5 (15,2)	0	0	20,5	4,4 ± 5,0	6,0 ± 4,9
50% ^c	40	30 (75,0)	10 (25,0)	21 (52,5)	6 (15,0)	2 (5,0)	1 (2,5)	65,4	8,1 ± 13,5	10,9 ± 14,6
Bistri ^d	67	48 (71,6)	19 (28,4)	34 (50,7)	11 (16,4)	2 (3,0)	1 (1,5)	65,4	6,6 ± 11,1	9,3 ± 12,1
Mutni ^d	6	6 (100)	0	6 (100)	0	0	0	9,7	4,1 ± 2,9	4,1 ± 2,9
<i>Mešani sok</i>	69	19 (27,5)	50 (72,5)	15 (21,7)	3 (4,3)	1 (1,4)	0	28,0	2,1 ± 4,9	7,5 ± 7,0
100% ^c	20	2 (10,0)	18 (90,0)	2 (10,0)	0	0	0	7,3	0,5 ± 1,8	5,5 ± 2,6
50% ^c	49	17 (34,7)	32 (65,3)	13 (26,5)	3 (6,1)	1 (2,0)	0	28,0	2,7 ± 5,6	7,7 ± 7,3
Bistri ^d	15	10 (66,7)	5 (33,3)	9 (60,0)	1 (6,7)	0	0	10,5	3,2 ± 3,4	4,8 ± 3,1
Mutni ^d	54	9 (16,7)	45 (83,3)	6 (11,1)	2 (3,7)	1 (1,9)	0	28,0	1,7 ± 5,2	10,5 ± 8,9

^asvi uzorci (<LOD=0), ^bkontaminirani uzorci (>LOD), ^cvoćni sadržaj, ^dkonzistencija soka

Napomena: u slučaju mešanih sokova sve godine su isto što i 2014. godina.

Upoređene su i raspodele koncentracije patulina među grupama sokova u pakovanju sa cevčicom i u porodičnom pakovanju, što je prikazano na Grafiku 5.6. Najizraženija je razlika u udelu uzoraka u opsegu koncentracija 10-25 µg/kg, koji je 3,3 puta viši za sokove u porodičnom pakovanju (9,9% u odnosu na 3,0%), za koje je karakterističan i niži udeo uzoraka u kojima patulin nije kvantifikovan (<1 µg/kg).



Grafik 5.6. Raspodela koncentracija patulina u proizvodima od jabuka (sokovi u pakovanju sa cevčicom i sokovi u porodičnom pakovanju) (2013-2015)

5.1.2.3. Razmatranja različitih faktora koji utiču na kontaminaciju patulinom

Oteiza i saradnici (10) naglasili su značaj vrste voća, i istakli daleko najviši udeo kontaminiranih uzoraka među sokovima od jabuka, što je potvrđeno i rezultatima ovog istraživanja. Višu učestalost pojave i viši prosečni sadržaj patulina u soku od jabuka u odnosu na sok od mešanog voća utvrdili su i drugi autori (24). Na pojavu patulina može uticati i sorta jabuka. Na primer, sorta koksoranž (*Cox's Orange pippin*) je više podložna napadu plesni nego sorta zlatni delišes (*Golden Delicious*) (122). Za ispitivanja uticaja sorte na pojavu patulina u soku neophodno je raspolagati podacima o korišćenim sortama jabuka, što nije slučaj kod proizvoda uzetih sa tržišta, jer se ovakvi podaci ne nalaze na deklaraciji proizvoda.

Jedan od prvih izveštaja o razlikama u učestalosti pojavljivanja i sadržaju patulina između sokova sa različitim udelom voća dali su Spadaro i saradnici (24), koji su utvrdili da uzorci sa nižim sadržajem voća generalno pokazuju nižu učestalost kontaminacije i niži sadržaj patulina. Međutim, dostupni su i suprotni podaci, na primer, studija Bonerba i saradnika (62). U ovom istraživanju nije utvrđen značajan uticaj udela voća na pojavu isadržaj patulina.

U pogledu konzistencije soka, Piqué i saradnici (53) ukazali su na mutnoću kao najznačajniji faktor rizika, a znatno viši udeo kontaminiranih uzoraka mutnog u odnosu na bistri sok (67% u odnosu na 13%) utvrdili su i Barreira i saradnici (54). Međutim, razlike između sokova bistre i mutne konzistencije, ispitanih u ovom istraživanju, slabo su izražene i ne podržavaju ovaj nalaz. Objašnjenje može biti u nemogućnosti jasnog razlučivanja razlika usled generalno veoma niskog nivoa patulina u ispitanim uzorcima. Pored toga, svi sokovi od mešanog voća su kao sastojak sadržali i jabuke (glavni faktor rizika), što poređenje čini veoma komplikovanim. Sa druge strane, smatra se da patulin gradi adukte sa proteinskim česticama u gustom soku, koje zatim bivaju odstranjene filtracijom, što rezultuje smanjenjem nivoa patulina u bistrom soku (122). Interesantno je da smanjenju koncentracije patulina doprinosi i sumpor dioksid (122), ali, s obzirom na to da nije dozvoljena upotreba ovog konzervansa u voćnim sokovima, njegov uticaj u ovoj studiji nije razmatran.

Nasuprot ovom istraživanju, koje nije pokazalo značajan uticaj godine proizvodnje na učestalost pojavljivanja patulina, Oteiza i saradnici (10) zabeležili su značajne razlike u voćnim sokovima proizvedenim u Argentini u određenim godinama tokom perioda od 2005. do 2013. godine. Generalni zaključak u pogledu uticaja ovog faktora teško je doneti, između ostalog, i zbog malog broja studija sprovedenih tokom višegodišnjeg perioda.

U literaturi je, takođe, procenjivan uticaj tipa poljoprivredne proizvodnje, organske nasuprot konvencionalnoj, sa neusaglašenim rezultatima, mada je ukazano na višu koncentraciju patulina u organskim proizvodima (na primer, u dečijoj hrani: 45,47,54,55,60; u sokovima od jabuka: 24,53,54,61,67,68).

U ovom istraživanju uticaj organske / konvencionalne proizvodnje nije mogao biti ispitan usled veoma ograničenog broja organskih proizvoda od jabuka dostupnih na tržištu Republike Srbije. Uzorci hrane za odojčad i malu decu iz organske proizvodnje činili su 15,8% proizvoda iz ove

grupe, a svi su poticali od jednog, inostranog proizvođača. Među 27,8% kontaminiranih uzoraka, najviša zabeležena koncentracija iznosila je 7,7 µg/kg, a prosečni sadržaj patulina u organskim proizvodima 1,3 µg/kg. U grupi sokova u pakovanju sa cevčicom ni jedan od sakupljenih uzoraka nije bio deklarisan kao organski proizvod. U grupi sokova u porodičnom pakovanju, svega 4,2% su nosila oznaku za organske proizvode (od dva proizvođača), a pet od ukupno šest uzoraka su bili sokovi od jabuka. Patulin je detektovan u dve trećine uzoraka, ukupna prosečna koncentracija iznosila je 2,7 µg/kg, a maksimalna 10,1 µg/kg.

Veoma značajan faktor koji otežava poređenje proizvoda po drugim osnovama je tržišna cena proizvoda. Kada su rezultati dobijeni u ovom istraživanju sagledani sa tog aspekta, uočeno je da su niski troškovi motiv za manje pažljiv izbor jabuka / voća u proizvodnji soka, što rezultuje višim udelom kontaminiranih uzoraka, kao što je zapaženo i od strane drugih istraživača (62).

Sa tržišnom cenom uzoraka usko su povezani proizvođači, stoga su uzorci u okviru svake od tri osnovne grupe (hrana za odojčad i malu decu, sokovi u pakovanju sa cevčicom, sokovi u porodičnom pakovanju) razvrstani u podgrupe prema kriterijumu proizvođač / cenovna kategorija (niske, prosečne ili visoke cene, posmatrano u odnosu na ispitivano tržište).

Uzorci hrane za odojčad i malu decu poticali su od pet proizvođača, ali je 98,2% uzoraka reprezentovalo četiri proizvođača (udeli od 14,0-34,2%), dva inostrana (53,5%) i dva domaća (44,7%), koji su dalje razmatrani. Zabeležni udeo kontaminiranih uzoraka iznosio je 17,9-27,3% kod inostranih, u odnosu na 6,3-45,7% kod domaćih proizvođača, sa prosečnim sadržajem od 0,6-1,4 µg/kg i 0,2-1,4 µg/kg, redom. Skoro polovina kontaminiranih uzoraka domaćeg proizvođača sa niskim cenama daje nepovoljnu sliku koja je u izvesnoj meri ublažena niskim prosečnim sadržajem patulina.

Među sokovima u pakovanju sa cevčicom bili su zastupljeni proizvodi devet domaćih proizvođača, pet sa udelima od 3-7%, a kao reprezentativni uzeta su četiri proizvođača sa udelima 16-25%. Učestalost detekcije patulina iznosila je 25-50%, a prosečni sadržaj patulina se kretao u opsegu od 0,9 µg/kg (visoke cene) do 2,2 µg/kg (niske i prosečne cene).

U grupi sokova u porodičnom pakovanju, ukupno je bilo zastupljeno 13 domaćih proizvođača, sa udelom proizvoda u odnosu na ukupan broj uzoraka u grupi u rasponu približno od 1 do 25%. Utvrđeno je da najviši udeo kontaminiranih uzoraka (71,4%) i daleko najviši prosečni sadržaj

patulina (11,0 µg/kg) karakteriše upravo proizvođača čiji sokovi pripadaju kategoriji proizvoda sa najnižim cenama, a dodatno je otežavajuća činjenica da čine jednu petinu ove grupe uzoraka. Kod proizvođača sa najvećom zastupljenošću (24,6% od svih uzoraka), i cenama u kategoriji prosečnih i visokih, utvrđen je udeo od 60% kontaminiranih uzoraka, ali sa daleko nižim prosečnim sadržajem patulina od 4,9 µg/kg. Najpovoljnija situacija u pogledu prisustva patulina utvrđena je za proizvode sa visokim cenama: udeo kontaminiranih uzoraka od 16,7% i 18,2%, prosečni sadržaj 0,3 i 0,9 µg/kg (drugi navedeni podatak odnosi se na sokove koji su deklarirani kao ceđeni sokovi).

5.1.2.4. Rezultati statističke analize

Sumirani rezultati neparametarskih testova

Rezultati statističkih testova sumirani su u odnosu na definisane kriterijume, a uzimajući u obzir svaku od grupa proizvoda od jabuka. Izdvojeni su rezultati statističkih testova koji su pokazali značajne razlike u udelu kontaminiranih uzoraka ili sadržaju patulina na nivou pojedinačnih godina uzorkovanja:

- U odnosu na vrstu voća (jabuka / mešani), statističkom analizom dokazana je značajnost razlika i u udelu kontaminiranih uzoraka i u sadržaju patulina u grupi sokova za odojčad i malu decu, kao i u grupi sokova u porodičnom pakovanju, u oba slučaja samo u 2014. godini.
- U odnosu na voćni sadržaj soka (100% / 50%), statističkom analizom dokazana je značajnost razlika u udelu kontaminiranih uzoraka u grupama mešanih sokova u porodičnom pakovanju i mešanih sokova u pakovanju sa cevčicom iz 2014. godine, a u sadržaju patulina samo u mešanim sokovima u pakovanju sa cevčicom iz iste godine.
- U odnosu na konzistenciju soka (bistri / mutni), statističkom analizom dokazana je značajnost razlika kod mešanih sokova u porodičnom pakovanju (uzorkovani 2014. godine) i za udeo kontaminiranih uzoraka i za sadržaj patulina.
- U odnosu na poreklo (uvezeni / domaći), statističkom analizom dokazana je značajnost razlika u udelu kontaminiranih kašica za odojčad uzorkovanih 2015. godine.

Razlike među rezultatima za pojedinačne godine uzorkovanja nisu bile statistički značajne ni u jednoj od grupa proizvoda od jabuka, ni po učestalosti pojavljivanja ni po prosečnoj koncentraciji patulina.

Kada su statistički obrađeni rezultati sumirani za svaku od grupa proizvoda od jabuka za sve tri godine uzorkovanja zajedno, održana je značajnost navedenih razlika samo u grupi sokova u porodičnom pakovanju. Međutim, ova grupa uzoraka je specifična po tome što su samo sokovi od jabuka uzorkovani u sve tri godine, dok su mešani sokovi uzorkovani samo 2014. godine, zbog čega se za podgrupu mešani sokovi izjednačavaju zajedno posmatrane sve godine uzorkovanja sa 2014. godinom. Stoga preostaje da se značajnost razlika u udelu kontaminiranih uzoraka i sadržaju patulina među podgrupama sokova od jabuka i mešanih sokova u porodičnom pakovanju uočena za 2014. godinu, održala i kada su u podgrupi sokovi od jabuka objedinjeni uzorci iz sve tri godine.

Statističkom analizom upoređene su i međusobno grupe proizvoda od jabuke (sokovi za odojčad, kašice za odojčad, sokovi u pakovanju sa cevčicom i sokovi u porodičnom pakovanju; grupa obuhvata uzorke iz svih godina) primenom Pearson Chi-square testa u kombinaciji sa testom za poređenje proporcija (udeo kontaminiranih uzoraka) i Kruskal-Wallis testa u kombinaciji sa testom višestrukog poređenja (sadržaj patulina). Utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika u pogledu prisustva ni sadržaja patulina među grupama sokova, a da razlike postoje između kašica za odojčad i sokova u pakovanju sa cevčicom, odnosno sokova u porodičnom pakovanju. Značajne razlike u sadržaju patulina između kašica za odojčad i sokova u porodičnom pakovanju utvrđene su i na nivou pojedinačno posmatranih 2013. i 2015. godine, a dodatno i između grupa sokova u pakovanju sa cevčicom i u porodičnom pakovanju uzorkovanih 2013. godine.

Rezultati logističke regresije

Za odabrane faktore – vrsta voća, sadržaj voća i godina uzorkovanja, posmatrani su univarijantni modeli, a zatim je formiran model koji istovremeno uzima u obzir sve faktore (nezavisno promenljive).

Za faktor vrsta voća, OR za pojavu patulina u proizvodima od jabuka i proizvodima od mešanog voća iznosi 3,611 (IP 2,207-5,908), odnosno 3,611 puta su veće šanse za pojavu patulina u

proizvodima od jabuka u odnosu na proizvode od mešanog voća. Odnos je statistički značajno različit od 1, odnosno faktor vrsta voća ima uticaja na pojavu patulina.

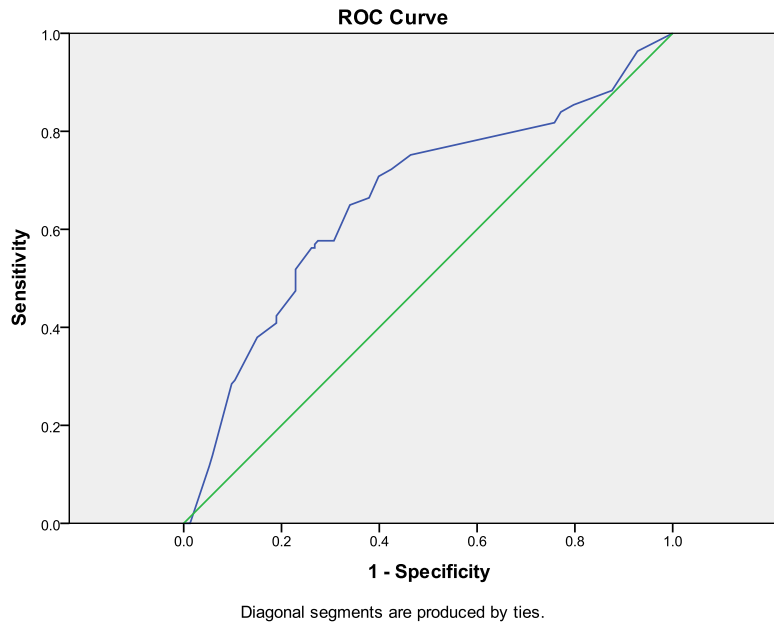
Za faktor sadržaj voća, OR iznosi 1,257 (IP 0,772-2,047) u korist proizvoda sa 100% voćnog sadržaja u odnosu na 50%. Odnos nije statistički značajno različit od 1, odnosno faktor sadržaj voća nema uticaja na pojavu patulina.

Za faktor godina uzorkovanja treba napomenuti da su godine neprekidna, a ne kategorijalna promenljiva, što je značajno za tumačenje rezultata. Koeficijent uz promenljivu godine je -0,62, a negativna vrednost koeficijenta pokazuje da se sa godinama smanjuju šanse za pojavu patulina. OR je 0,939 (IP 0,667-1,322), što znači da su za 6% manje šanse za pojavu patulina za svaku godinu. Ipak, odnos nije statistički značajno različit od 1, odnosno godine nemaju uticaja na pojavu patulina.

Rezultati za model koji istovremeno uzima u obzir sve nezavisno promenljive, prikazani su u Tabeli 5.8., a odgovarajuća ROC kriva na Slici 5.1. Površina ispod ROC krive iznosi 0,663, što pokazuje relativno slabo slaganje modela sa eksperimentalnim podacima.

Tabela 5.8. Linearna regresija za pojavu / odsustvo patulina (zavisno promenljiva) u odnosu na odabrane nezavisno promenljive.

		Koeficijent	Značajnost p-vrednost	Odnos šansi	95% Interval poverenja za odnos šansi	
					Donji	Gornji
Vrsta soka	Sok				Referentna vrednost	
	Sok za odojčad i malu decu	0.083	0.805	1.087	0.562	2.102
Vrsta voća	Mešano voće				Referentna vrednost	
	Jabuka	1.191	0.001	3.29	1.679	6.445
Sadržaj voća	100%				Referentna vrednost	
	50%	0.014	0.958	1.014	0.598	1.720
Konzistencija	Bistri				Referentna vrednost	
	Mutni	0.156	0.635	1.169	0.613	2.230
Godina		-0.060	0.745	0.942	0.658	1.349
	Konstanta	119.738	0.746	-		



Slika 5.1. ROC kriva za pojavu / odsustvo patulina (zavisno promenljiva) u odnosu na odabrane nezavisno promenljive.

Rezultati višestruke linearne regresije

Regresija samo sa promenljivom vrsta voća daje koeficijent 3,09, što pokazuje da sok od jabuka ima u proseku za 3,09 veći sadržaj patulina od mešanog soka. Ovaj koeficijent je značajno različit od nule ($p=0,00015$), dakle, postoji statistički značajna razlika u prosečnom sadržaju patulina u soku od jabuka i mešanom soku. Koeficijent determinacije za model iznosi 0,04876, što znači da samo 4,876% ukupne varijacije u sadržaju patulina može biti objašnjeno uticajem faktora vrsta voća, što se odražava i u visokoj standardnoj grešci ocene modela (6,7443).

Regresija sa svim promenljivima daje model opisan u Tabeli 5.9. Koeficijent determinacije za model je $R^2=0,07049$, što znači da je samo 7,049% ukupne varijacije u sadržaju patulina objašnjeno uticajem faktora grupa proizvoda, godina uzorkovanja, vrsta voća, sadržaj voća i konzistencija, što odražava i visoka standardna greška ocene modela (6,7136). Na osnovu podataka prikazanih u Tabeli 5.9 uočava se da jedino promenljiva vrsta voća daje koeficijent (3,170) značajno različit od nule ($p=0,0045$).

Tabela 5.9. Višestruka linearna regresija za sadržaj patulina (zavisno promenljiva) u odnosu na odabrane nezavisno promenljive.

<i>Regression Summary for Dependent Variable: value (Juice 2.sta)</i>						
N=290	<i>R= 0.26551504 R²= 0.07049824 Adjusted R²= 0.05413377</i>					
	<i>F(5,284)=4.3080 p<0.00086 Std.Error of estimate: 6.7136</i>					
	b*	Std.Err. of b*	b	Std.Err. of b	t(284)	p-value
<i>Intercept</i>			1571.372	1178.133	1.33378	0.183344
Grupa	0.064246	0.058144	1.191	1.078	1.10495	0.270119
Godina	-0.076391	0.057269	-0.780	0.585	-1.33389	0.183309
Vrsta voća	0.226261	0.079021	3.170	1.107	2.86329	0.004505
Sadržaj voća	0.106036	0.058923	1.545	0.858	1.79957	0.072990
Konzistencija	0.006595	0.077148	0.091	1.064	0.08548	0.931939

Na osnovu analize podataka ocenjen je najbolji izbor promenljivih koje treba da uđu u model: grupa proizvoda, godina uzorkovanja, vrsta voća i sadržaj voća (bez konzistencije soka), a rezultati su prikazani u Tabeli 5.10. Međutim, dobijeni model nije se značajno razlikovao od predhodnog (koeficijent determinacije 0,07047, standardna greška ocene modela 6,7019).

Tabela 5.10. Višestruka linearna regresija za sadržaj patulina (zavisno promenljiva) u odnosu na odabrane nezavisno promenljive.

<i>Regression Summary for Dependent Variable: value (Juice 2.sta)</i>						
N=290	<i>R= 0.26547000 R²= 0.07047432 Adjusted R²= 0.05742835</i>					
	<i>F(4,285)=5.4020 p<0.00033 Std.Error of estimate: 6.7019</i>					
	b*	Std.Err. of b*	b	Std.Err. of b	t(285)	p-value
<i>Intercept</i>			1567.709	1175.301	1.33388	0.183309
Grupa	0.064267	0.058042	1.192	1.076	1.10725	0.269119
Godina	-0.076212	0.057131	-0.778	0.584	-1.33398	0.183275
Vrsta voća	0.230750	0.058950	3.233	0.826	3.91431	0.000113
Sadržaj voća	0.106562	0.058499	1.552	0.852	1.82161	0.069562

Zaključno, rezultati statističke analize pokazuju da odabrani faktori nemaju dominantan uticaj na sadržaj patulina u analiziranim proizvodima od jabuka. Kao što je navedeno u odeljku 5.1.2.3., pored odabranih statistički razmatranih faktora, i drugi faktori mogu imati značajan uticaj na prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka. U istom odeljku data je procena uticaja cenovne kategorije proizvoda, koji je veoma značajan, ali nije statistički razmatran jer su cene

proizvoda arbitrarno kategorizovane kao niske, prosečne ili visoke, u odnosu na ispitivano tržište. Značajan uticaj na prisustvo i sadržaj patulina u proizvodima od jabuka može imati i pravilna primena pesticida za sprečavanje rasta plesni na voću, tokom rasta ili skladištenja. Ostaci pesticida su, takođe, ispitani u ovom istraživanju, a rezultati su prikazani u odeljku 5.2.2.1. Međutim, za procenu uticaja ovog faktora bilo bi neophodno dizajnirati posebnu studiju koja bi omogućila direktno povezivanje rezultata između primene pesticida i pojave patulina, što nije moguće samo na osnovu analize proizvoda sa tržišta.

5.1.2.5. Podaci u literaturi o prisustvu patulina u proizvodima od jabuka

U poslednjoj deceniji publikovano je više studija koje su istraživale prisustvo patulina u hrani za odojčad i malu decu baziranoj na voću.

Vremenski najbliskija studija sprovedena je u Republici Češkoj (2015. g.), a utvrđeno je odsustvo patulina u uzorcima na bazi kajsije i banana, nasuprot 20% kontaminiranih uzoraka od jabuka, sa maksimalnim nivoom patulina od 5 µg/kg (50). Među italijanskim studijama, studija publikovana 2014. godine, nije utvrdila prisustvo patulina (123), dok je studija sprovedena od 2008. do 2009. godine pokazala 65% kontaminiranih uzoraka od kojih nijedan nije premašio ograničenje od 10 µg/kg (124). Pet španskih studija sprovedenih tokom 2008-2011. godine dale su veoma različite rezultate u pogledu udela kontaminiranih uzoraka: 0% (37,51), 34% (52), 70% (125) i 91% (69), poslednje dve sa 35% i 91% uzoraka koji nisu usaglašeni sa zakonskim zahtevima. Najviši nivo patulina dostignut među 6% kontaminiranih uzoraka sakupljenih u Portugalu, u periodu od 2007. do 2009. godine, iznosio je 5,7 µg/kg (54). Zapaža se da studije izvedene od strane Bonerba i saradnika (124) u Italiji, Cano-Sancho i saradnika (52) u Španiji i Barreira i saradnika (54) u Portugalu, sve tri zasnovane na velikom broju uzoraka i u vremenskim periodima koji se preklapaju (2009.-2010. g.), pokazuju relativno visoku (65%), umerenu (34%) i nisku (6%) učestalost detekcije patulina, redom, kada se uporede međusobno. Sa druge strane, nizak nivo patulina u hrani za odojčad i malu decu zasnovanoj na jabukama je zajednički zaključak, slično ovom istraživanju, uz umerenu do visoku učestalost prisustva patulina.

Razmatrani su i rezultati studija novijeg datuma u evropskim zemljama koje su za predmet istraživanja imale prisustvo patulina u voćnim sokovima namenjenim opštoj populaciji. U studiji

sprovedenoj u Hrvatskoj, u periodu od 2013. do 2016. godine, prisustvo patulina je utvrđeno u 21,3% od ukupno 122 analizirana uzorka ceđenog soka od jabuka, prosečna koncentracija je iznosila 6,6 µg/kg, a udeo uzoraka koji su premašili maksimalno dozvoljenu koncentraciju 4,1% (maksimalna utvrđena koncentracija iznosila je 154 µg/kg) (126). U poređenju sa hrvatskim rezultatima, u uzorcima soka od jabuka sa tržišta Republike Srbije ispitanim u ovom istraživanju utvrđen je 3,5 puta viši udeo kontaminiranih uzoraka (74%), vrlo sličan prosečni sadržaj patulina (6,4 µg/kg), i oko 2,5 puta niža maksimalna izmerena koncentracija (65,4 µg/kg). U Rumuniji, ispitivanja sokova od jabuka su utvrdila zastupljenost od 20% (127), odnosno 82% (128) kontaminiranih uzoraka, u drugom slučaju sa 6% uzoraka čiji sadržaj patulina je premašio maksimalno dozvoljenu vrednost. U Grčkoj, patulin je detektovan u svim komercijalno dostupnim voćnim sokovima, u prosečnom sadržaju od 5,6 µg/kg i sa maksimalnim nivoom od 11,8 µg/kg (25). Udeo kontaminiranih sokova od jabuka na tržištu Italije iznosio je 89%, sa prosečnim sadržajem od 18,1 µg/kg, bez uzoraka preko maksimalno dozvoljene koncentracije (62). U sedam španskih studija publikovanih u periodu 2007.-2013., učestalost pojavljivanja patulina varirala je od 7% (37) do 100% (69,129), a udeo neusaglašanih uzoraka od 0% (37,52,53,69) do 35,2% (44). U španskoj studiji zasnovanoj na najvećem broju uzoraka (100), udeo kontaminiranih sokova od jabuka iznosio je 66%, sa prosečnim sadržajem patulina od 19,4 µg/kg, a 11% uzoraka je premašilo ograničenje za maksimalno dozvoljenu koncentraciju (68). U sokovima analiziranim u Portugalu (46,54,67) nije utvrđen sadržaj patulina iznad zakonskog ograničenja.

I pored uočenih značajnih varijacija, uobičajen asortiman voćnih sokova u evropskim zemljama, generalno mogu biti opisane relativno visokom učestalošću pojave patulina sa povremenim prekoračenjima maksimalno dozvoljene koncentracije, a ova konstatacija se odnosi i na nalaze ovog istraživanja.

5.2. ANALIZA OSTATAKA PESTICIDA

5.2.1. Materijal i metode za analizu ostataka pesticida

5.2.1.1. Vrsta i brojnost uzoraka za analizu ostataka pesticida

Ispitivanje prisustva i sadržaja ostataka pesticida sprovedeno je na delu uzoraka iz 2014. godine, i to na 166 uzoraka, koji reprezentuju sve kategorije uzoraka, čime je uključena približno polovina (47%) sveukupnog broja uzoraka obuhvaćenih ovim istraživanjem (Tabela 5.11)

Tabela 5.11. Struktura uzoraka za analizu ostataka pesticida

Godina uzorkovanja: 2014	
Hrana za odojčad i malu decu	54 (20 domaća proizvodnja (8 sok + 12 kašice); 34 iz uvoza (13 sok + 21 kašica))
Sokovi (0,2 L sa cevčicom)	29 (9 voćni sadržaj 100% + 20 voćni sadržaj 50%)
Sokovi (0,7-2 L)	83 (34 voćni sadržaj 100% + 49 voćni sadržaj 50%)
Ukupno	166

5.2.1.2. Analitička metoda za analizu ostataka pesticida

Za određivanje ostataka pesticida primenjena je tehnika tačne hromatografije sa elektrosprej jonizacijom i tandemskim masenim detektorom (LC-MS/MS ESI) nakon pripreme uzoraka QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) metodom, prema standardu EN 15662 (130).

Analiza je urađena na Agilent 1200 HPLC sistemu opremljenom sa reverzno-faznom C18 analitičkom kolonom Agilent Zorbax Eclipse 50 × 4.6mm, 1,8 µm. Korišćena je mobilna faza sastavljena od metanola i vode sa 0,1% mravljom kiselinom, u gradijentnom modu, pri protoku od 0,6 mL/min. Za spektrometriju masa korišćen je Agilent 6410B Triple-Quad LC/MS sistem.

Primenjena metoda je obuhvatila ostatke 49 odabranih pesticida: acetamiprid, aldikarb, aldikarb sulfon, aldikarb sulfoksid, azoksistrobin, karbaril, karbendazim, karbofuran, klomazon, klotianidin, ciprokonazol, ciprokonazol 2, ciprodinil, ciromazin, difenkonazol, dimetomorf, endosulfan alfa, endosulfan beta, fenheksamid, fenoksikarb, fenpropimorf, flusilazol, flutriafol,

fliroksipir metil, imazalil, imidaklopid, indoksakarb, metalaksil M, metkonazol, metomil, metiokarb, miklobutanil, metsulfuron metil, oksadiksil, oksamil, pencikuron, foksim, pirimifos metil, propoksur, piraklostrobin, pirimetanil, piriproksifen, spiroksamin, tebukonazol, tebufenpirad, tiametoksam, tiodikarb, trifloksistrobin, zoksamid.

Utvrđene su sledeće karakteristike izvođenja metode: limit detekcije i kvantifikacije od 0,0005 i 0,01mg/kg, redom, prinos i preciznost u skladu sa zahtevima definisanim za metode za određivanje ostataka pesticida u hrani, datim u vodiču SANCO/12571/2013 (131) (prinos 70-120%; preciznost kao RSD <20%), opseg linearnosti od 5-250 ng/mL. Proširena merna nesigurnost određivanja procenjena je na 50%.

5.2.1.3. Statističke metode za analizu ostataka pesticida

Rezultati određivanja ostataka pesticida opisani su parametrima deskriptivne statistike: opseg rezultata (minimalna i maksimalna vrednost), prosečna vrednost i medijana, standardna devijacija.

5.2.2. Rezultati i diskusija o ostacima pesticida u proizvodima od jabuka

5.2.2.1. Prisustvo i sadržaj ostataka pesticida u proizvodima od jabuka

Sumirani rezultati ispitivanja prisustva ostataka pesticida u odabranim uzorcima proizvoda od jabuka, prikazani su u Tabelama od 5.12 do 5.15. U grupi hrana za odojčad i malu decu, kao klasifikacioni kriterijumi uzeti su u prvom redu poreklo proizvoda (domaći / uvezeni), a zatim vrsta proizvoda (sok / kašica), dok je u grupama sokovi i sokovi sa cevčicom klasifikacija zasnovana na voćnom sadržaju (100% / 50%). Prikazani su učestalost detekcije pojedinačnih pesticida, kao i prosečne i maksimalne koncentracije. U Tabeli 5.16 iskazani su brojevi pozitivnih uzoraka i broj ukupno detektovanih pesticida po grupi uzoraka, kao i udeo pojedinačnih uzoraka sa zastupljenim višestrukim ostacima pesticida.

Tabela 5.12. Ostaci pesticida u hrani za odojčad i malu decu proizvedenoj u Srbiji

Pesticid	Svi uzorci (20)		Sokovi (8)		Kašice (12)	
	N* (%)	Prosečna koncentracija* (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)
Acetamiprid	80,0	0,012	87,5	0,012	75	0,070
Karbendazim	70,0	0,005	75	0,014	66,7	0,015
Flutriafol	35,0	0,003	62,5	0,003	16,7	0,003
Pirimetanil	30,0	0,006	50	0,012	16,7	0,005
Ciprodinil	25,0	0,005	12,5	0,003	33,3	0,007
Piraklostrobin	20,0	0,007	12,5	0,002	25	0,013
Fenoksikarb	15,0	0,006	12,5	0,013	16,7	0,003
Trifloksistrobin	15,0	0,002	-	-	25	0,003
Difenkonazol	10,0	0,003	-	-	16,7	0,003
Fenpropimorf	10,0	0,001	12,5	0,01	8,3	0,001
Klotianidin	5,0	0,004	-	-	8,3	0,004
Fenheksamid	5,0	0,002	-	-	8,3	0,002
Flusilazol	5,0	0,002	-	-	8,3	0,002
Metkonazol	5,0	0,001	12,5	0,001	-	-
Tebufenpirad	5,0	0,004	-	-	8,3	0,004

*- pozitivni uzorci

Tabela 5.13. Ostaci pesticida u hrani za odojčad i malu decu uvezenoj u Srbiju

Pesticid	Svi uzorci (34)		Sokovi (13)		Kašice (21)	
	N* (%)	Prosečna koncentracija* (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)
Karbendazim	23,5	0,002	15,4	0,004	28,6	0,005
Azoksistrobin	5,9	0,002	7,7	0,002	4,8	0,002
Metkonazol	5,9	0,004	15,4	0,004	-	-
Pirimetanil	5,9	0,002	-	-	9,5	0,002
Difenkonazol	2,9	0,001	-	-	4,8	0,001
Dimetomorf	2,9	0,012	-	-	4,8	0,012
Flusilazol	2,9	0,005	-	-	4,8	0,005
Metalaksil M	2,9	0,002	-	-	4,8	0,002

*- pozitivni uzorci

Tabela 5.14. Ostaci pesticida u sokovima u pakovanju sa cevčicom

Pesticid	Svi (29)		100% voćni sadržaj (9)		50% voćni sadržaj (20)	
	N* (%)	Prosečna koncentracija* (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)
Karbendazim	55,2	0,004	44,4	0,010	60,0	0,006
Acetamiprid	51,7	0,003	55,6	0,007	50,0	0,004
Pirimetaniil	37,9	0,004	44,4	0,005	35,0	0,011
Azoksistrobin	13,8	0,003	11,1	0,007	15,0	0,004
Endosulfan I	6,9	0,007	11,1	0,013	5,0	0,002
Spiroksamin	6,9	0,004	11,1	0,005	5,0	0,003
Ciprodinil	3,4	0,005	-	-	5,0	0,005
Fenheksamid	3,4	0,010	-	-	5,0	0,010
Fenoksikarb	3,4	0,006	11,1	0,006	-	-
Flutriafol	3,4	0,002	11,1	0,002	-	-
Imazalil	3,4	0,002	-	-	5,0	0,002
Propoksur	3,4	0,002	11,1	0,002	-	-
Piriprosifen	3,4	0,003	11,1	0,003	-	-

*- pozitivni uzorci

Tabela 5.15. Ostaci pesticida u sokovima u porodičnom pakovanju

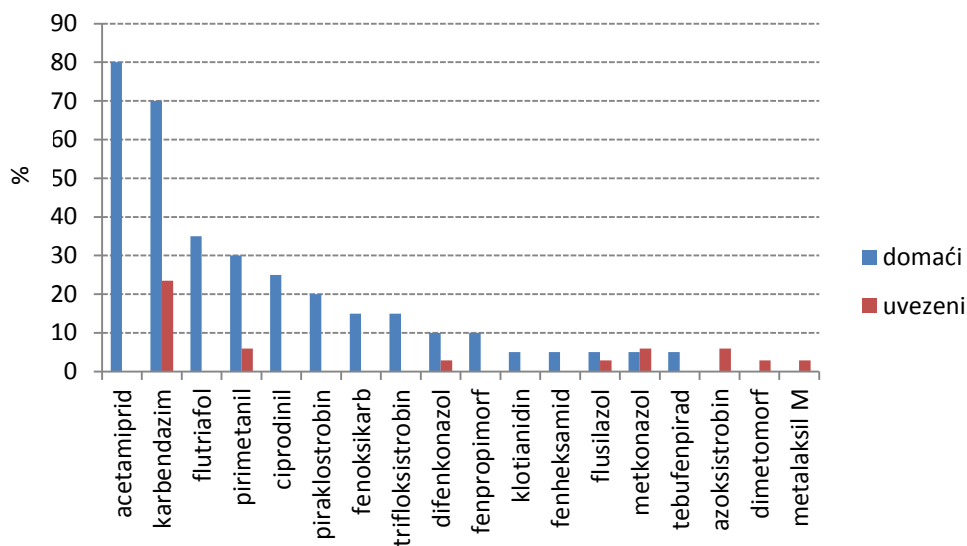
Pesticid	Svi uzorci (83)		100% voćni sadržaj (34)		50% voćni sadržaj (49)	
	N* (%)	Prosečna koncentracija* (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)	N* (%)	Maksimalna koncentracija (mg/kg)
Karbendazim	51,2	0,005	58,8	0,023	44,9	0,014
Acetamiprid	34,1	0,004	55,9	0,011	20,4	0,006
Pirimetaniil	17,1	0,009	20,6	0,027	14,3	0,020
Imazalil	8,5	0,005	5,9	0,005	10,2	0,004
Flutriafol	7,3	0,003	14,7	0,004	2,0	0,002
Spiroksamin	7,3	0,111	-	-	12,2	0,629
Flusilazol	2,4	0,003	5,9	0,003	-	-
Imidakloprid	2,4	0,004	2,9	0,004	2,0	0,003
Metkonazol	2,4	0,003	2,9	0,003	2,0	0,002
Karbofuran	1,2	0,004	-	-	2,0	0,002
Klotianidin	1,2	0,004	-	-	2,0	0,004
Ciprodinil	1,2	0,012	-	-	2,0	0,012
Fenoksikarb	1,2	0,019	2,9	0,019	-	-
Metalaksil M	1,2	0,002	2,9	0,002	-	-
Trifloksistrobin	1,2	0,001	-	-	2,0	0,001

*- pozitivni uzorci

Tabela 5.16. Uporedni prikaz prisustva ostataka pesticida po kategorijama uzoraka

	Hrana za odojčad i malu decu		Sokovi u pakovanju sa cevčicom	Sokovi u porodičnom pakovanju
	Domaći	Uvezeni		
Pozitivni uzorci (%)	85	39	79	76
Broj detektovanih pesticida	15	8	13	15
Udeo uzoraka sa višestrukim ostacima pesticida (≥ 3) (%)	75	0	38	18

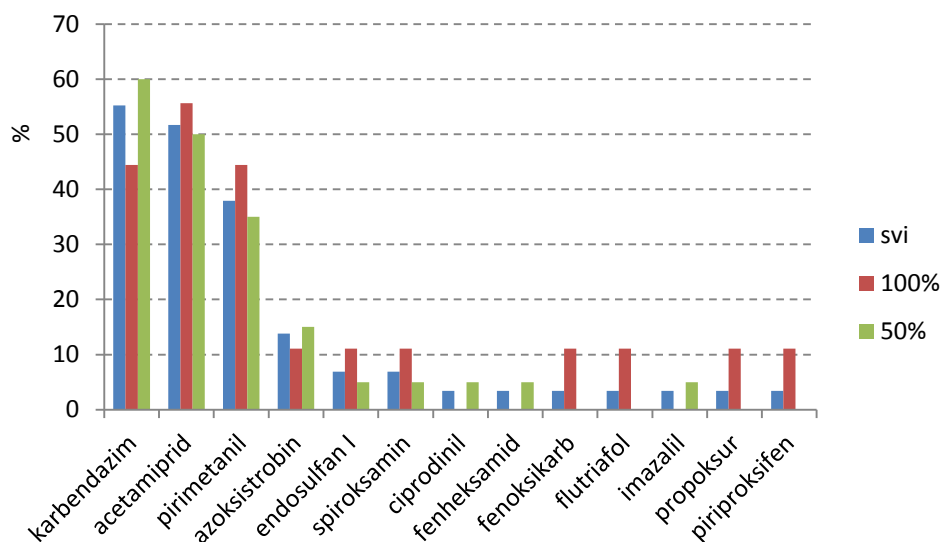
U hrani za odojčad i malu decu, ostaci pesticida su detektovani u 85% uzoraka iz domaće proizvodnje (100% sokova, 75% kašica) i 39% uzoraka iz uvoza (31% sokova, 43% kašica), što čini ukupno 56% pozitivnih uzoraka (Tabele 5.12, 5.13 i 5.16). Od 49 pesticida obuhvaćenih analitičkom metodom, 15 je detektovano u bar jednom od uzoraka proizvedenih u Srbiji (Tabela 5.12), a osam u uzorcima iz uvoza (Tabela 5.13). Najčešće detektovani pesticidi u domaćim proizvodima su bili acetamiprid (80%) i karbendazim (70%), a slede flutriafol (35%), pirimetanil (30%) i ciprodinil (25%) (Tabela 5.12). Među uvezenim proizvodima, najviša učestalost detekcije od 24% utvrđena je za karbendazim (Tabela 5.13). Najviše koncentracije izmerene u domaćim proizvodima odnosile su se na acetamiprid i karbendazim (0,070 i 0,015 mg/kg), čije su prosečne koncentracije, posmatrano u odnosu na kontaminirane uzorke, iznosile 0,012 i 0,005 mg/kg, redom. Najviša koncentracija u uvezenim proizvodima zabeležena je za dimetomorf (0,012 mg/kg). Kao zabrinjavajući ističe se nalaz višestrukih ostataka pesticida u pojedinačnim uzorcima, sa 75% uzoraka iz domaće proizvodnje, u kojima su detektovani ostaci tri ili više pesticida (maksimalno sedam), dok ni u jednom od uvezenih uzoraka nisu nađeni ostaci više od dva pesticida (Tabela 5.16). Zaključno, u domaćim, u odnosu na uvezene proizvode, utvrđena je značajno viša učestalost prisustva ostataka pesticida (Grafik 5.7) i udeo uzoraka sa višestrukim ostacima, mada u niskim koncentracijama.



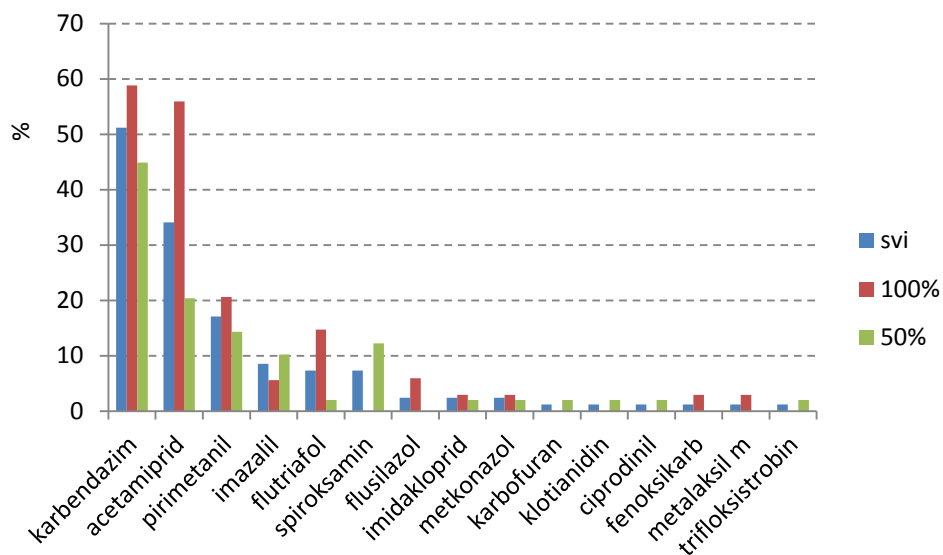
Grafik 5.7. Učestalost prisustva ostataka pesticida u hrani za odojčad i malu decu

U grupama sokovi sa cevčicom i sokovi za opštu populaciju, ostaci pesticida detektovani su u 79% i 76% uzoraka, redom (Tabela 5.14 i 5.15). Od 49 pesticida obuhvaćenih analitičkom metodom, 15 je detektovano u bar jednom od uzoraka sokova (Tabela 5.15), a 13 u uzorcima sokova sa cevčicom (Tabela 5.14). Najveća učestalost detekcije utvrđena je za karbendazim (51% sokova i 55% sokova sa cevčicom), acetamiprid (34% i 52%) i pirimetanil (17% i 38%) (Tabela 5.14 i 5.15). Učestalost detekcije imazalila, flutriafola i spiroksamina u sokovima se kretala od 7-8%, a azoksistrobin je detektovan u 14% sokova sa cevčicom. Generalno, nisu uočene značajne razlike u učestalosti detekcije pesticida među podgrupama uzoraka sa 100% i 50% voćnog sadržaja, izuzev acetamiprida u sokovima (55,9% naspram 20,4%) (Grafik 5.8 i 5.9). Najviše koncentracije karbendazima u sokovima i sokovima sa cevčicom iznosile su 0,023 i 0,010 mg/kg, redom, acetamiprida 0,011 i 0,007 mg/kg, pirimetanila 0,027 i 0,011 mg/kg. U obe grupe proizvoda, posmatrano u odnosu na pozitivne uzorke, prosečna koncentracija karbendazima je iznosila oko 0,005 mg/kg, a acetamiprida 0,003 mg/kg, dok se prosečna koncentracija pirimetanila kretala od 0,004 mg/kg u sokovima sa cevčicom do 0,009 mg/kg u sokovima. Najviša izmerena koncentracija zabeležena je za spiroksamin u sokovima (0,629 mg/kg) i endosulfan alfa u sokovima sa cevčicom (0,013 mg/kg). Višestruki ostaci pesticida (tri ili više) nađeni su u 18% sokova i 38% sokova sa cevčicom (maksimalno pet i šest, redom)

(Tabela 5.16). Zaključno, utvrđena je visoka učestalost detekcije ostataka pesticida, mada su izmerene koncentracije veoma niske.



Grafik 5.8. Učestalost prisustva ostataka pesticida u sokovima pakovanim sa cevčicom



Grafik 5.9. Učestalost prisustva ostataka pesticida u sokovima u porodičnom pakovanju

5.2.2.2. Podaci u literaturi o prisustvu ostataka pesticida u sokovima od voća

Objavljeno je nekoliko studija koje su za predmet ispitivanja imale ostatke pesticida u proizvodima na tržištu Republike Srbije. U 50 uzoraka dečije hrane na bazi voća i povrća (14 sokova i 36 kašica), proizvedenih u Srbiji i prikupljenih sa tržišta 2010. godine (132), ispitivano je prisustvo ostataka ukupno 50 pesticida dvema metodama, LC-MS/MS ESI (28 pesticida) i GC-MS (40 pesticida). Ostaci pesticida nađeni su u 38% uzoraka analizom GC-MS metodom, odnosno u 12% uzoraka LC-MS/MS metodom, što je znatno niže od 85% pozitivnih uzoraka zabeleženih u ovom istraživanju. Najzastupljeniji su bili cipermetrin (GC-MS metoda) i karbendazim (LC-MS/MS), ali su koncentracije svih detektovanih pesticida, dobijene korišćenjem obe tehnike, bile ispod 0,00005 mg/kg. Karbendazim je i u ovom radu bio drugi najčešće detektovani pesticid (70% uzoraka hrane za odojčad i malu decu iz domaće proizvodnje), ali sa znatno višom maksimalnom koncentracijom od 0,015 mg/kg. U studiji iz 2009. godine (133), LC-MS tehnikom ispitano je prisustvo ostataka 12 pesticida u voćnom soku, pri čemu je u 83,3% pozitivnih uzoraka detektovan bar jedan od tri pesticida: karbendazim (77,8%), dimetoat i monokrotofos (po 22,2%). Najviša zabeležena koncentracija iznosila je za karbendazim 0,0745 mg/L, dimetoat 0,00121 mg/L i monokrotofos 0,00583 mg/L. Kada su u pitanju višestruki ostaci, 27,7% uzoraka sadržalo je ostatke dva pesticida, a 5,55% ostatke tri pesticida. Podaci prikazani u ovom istraživanju potvrđuju visoku zastupljenost karbendazima u voćnim sokovima, a veći procenat uzoraka sa višestrukim ostacima može biti posledica znatno većeg broja analiziranih pesticida (49 u odnosu na 12). I u studiji objavljenoj 2005. godine (134) pokazano je da većina ispitanih voćnih sokova sadrži karbendazim (drugi pesticid nisu ispitivani), a najviša zabeležena koncentracija iznosila je 0,055 mg/L (LC-MS/MS).

Slična istraživanja sprovedena su i u drugim državama. U studiji u kojoj je LC-MS metodom ispitivano prisustvo pesticida u 102 bezalkoholna napitka od voća, sakupljena sa tržišta 16 država, ostaci pesticida nađeni su u 83,3% uzoraka (135). Detektovano je sedam pesticida, sa učestalošću detekcije: karbendazim 73%, imazalil 68%, imazalil metabolit 60%, tiabendazol 56%, prochloraz 50%, prochloraz metabolit 40% i iprodion 1%. Najveće koncentracije utvrđene su za imazalil (0,032 mg/L) i tiabendazol (0,0098 mg/L). Čak 58% pozitivnih uzoraka sadržalo je ostatke četiri ili više pesticida, mada su koncentracije bile niske. U istraživanju sprovedenom u Španiji (2011. g.) (136) ispitivano je prisustvo pesticida u 108 voćnih sokova, metodom LC-

MS/MS, a ostaci pesticida nađeni su u 43% uzoraka. Od 53 ispitana pesticida, detektovano je devet (karbendazim, imazalil, triadimenol, metalaksil, metoksifenozid, tebukonazol, ometoat, uključujući i dva pesticida neautorizovana u Evropskoj uniji: diazinon i DEET (dietiltoluamid)). Najzastupljeniji pesticidi bili su karbendazim i imazalil, sa najvišim koncentracijama od 0,043 i 0,279 mg/L, redom. Ranija istraživanja u Španiji (2008. g.) (137) obuhvatila su ispitivanje 90 pesticida u voćnim sokovima UPLC-MS/MS metodom, pri čemu je detektovano četiri (karbendazim (0,006-0,0336 mg/L), tiabendazol (0,0092-0,0249 mg/L), ciprodinil i u tragovima tiametoksam), a udeo pozitivnih uzoraka iznosio je 26%, kao i ispitivanje organofosfornih pesticida (2003. g.) (138), gde je od devet ispitanih pesticida u ukupno 95% pozitivnih uzoraka detektovano tri (diazinon 75%, hlörpirifos 50%, etion), u veoma niskim koncentracijama.

U ispitivanju sprovedenom u Portugaliji (2015. g.) (139) utvrđeno je prisustvo dva od 14 ispitivanih organohlornih pesticida: metoksihlor u kori i komercijalnoj pulpi biljke tamarind i heksahlorbenzin u voću, ali nijedan od ovih pesticida detektovanih pomoću gasne hromatografije sa detektorom zahvata elektrona (*Gas Chromatography - Electron Capture Detector, GC-ECD*) nije potvrđen GC-MS/MS metodom.

Studija sprovedena u Turskoj (2005. g.) (140) ispitivala je prisustvo četiri fungicida (folpet, hlörotalonil, kvinometionat, tetradifon) i jednog herbicida (trifluralin) u voćnim sokovima, koji nisu detektovani ni u jednom od uzoraka.

Studija sprovedena u Iranu (2016. g.) (141) ispitivala je prisustvo pesticida u voćnim sokovima i svežem voću. Od sedam ispitivanih pesticida, detektovano je dva: diazinon u soku od jagoda (0,050 mg/L), jabuka (0,025 mg/L) i grožđa (0,031 mg/L) i hlörpirifos (0,042 mg/L) u soku od jagoda.

U istraživanju sprovedenom u Kini (2014. g.) (142) ispitano je prisustvo 10 piretroida u voćnim sokovima, a detektovana su dva: lamda-cihalotrin u svežem soku od jabuke, u koncentraciji oko 0,002 mg/kg i tau-fluvalinat u pulpi od pomorandže, oko 0,003 mg/kg.

U istraživanju sprovedenom u Sjedinjenim Američkim Državama (2012. g.) (143) ispitano je prisustvo 174 pesticida u sokovima od egzotičnog voća (akai, godži, mangostin, noni, nar, mešavina uključujući i akai), metodom LC-MS/MS. Imidaklopid je nađen u mangostin i godži soku, kao i u mešanom soku koji sadrži i akai, metalaksil u mangostin soku i u mešanom soku koji sadrži i akai, a fludioksonil je detektovan u soku od nara. Sadržaj ostataka većine pesticida

bio je daleko ispod dozvoljenog nivoa. Mešani sok koji sadrži i akai sadržao je najveći broj ostataka pesticida, čak 14.

Na osnovu iznetog pregleda podataka o prisustvu ostataka pesticida u voćnim sokovima u različitim državama i različitim vremenskim periodima, može se konstatovati da su ostaci pesticida široko rasprostranjena i uvek aktuelna opasnost po bezbednost hrane, koju je potrebno kontrolisati brižljivom primenom dobre poljoprivredne i dobre proizvođačke prakse, i nadgledati redovnim programima monitoringa širokog opsega.

5.3. ANALIZA TOKSIČNIH METALA

5.3.1. Materijal i metode za analizu toksičnih metala

5.3.1.1. Vrsta i brojnost uzoraka za analizu toksičnih metala

Ispitivanje prisustva i sadržaja toksičnih metala sprovedeno je na delu uzoraka iz 2015. godine, i to na 33 uzorka hrane za odojčad i malu decu, što čini 29% svih uzoraka iz kategorije hrane za odojčad i malu decu obuhvaćenih ovim istraživanjem (Tabela 5.17).

Tabela 5.17. Struktura uzoraka za analizu sadržaja toksičnih metala

Godina uzorkovanja:	2015
Hrana za odojčad i malu decu	33 (13 sok + 20 kašica; domaća proizvodnja i uvoz)

5.3.1.2. Analitička metoda za određivanje toksičnih metala

Analiza proizvoda od jabuka na sadržaj toksičnih metala urađena je tehnikom induktivno kuplovane plazme sa spektrometrijom masa (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS*) nakon mikrotalasne digestije sa azotnom kiselinom i vodonik peroksidom, prema standardnoj metodi SRPS EN 15763:2012 (144).

Analiza je urađena na instrumentu Agilent Technologies 7700 Series ICP-MS.

Primenjenom metodom su obuhvaćeni olovo (Pb), kadmijum (Cd), živa (Hg) i arsen (As), kao najznačajniji toksični metali koji su uobičajeni kontaminanti hrane. Analiti su praćeni na sledećim karakterističnim masama: Pb: 206, 207, 208 amu; Cd: 111 amu; Hg: 200, 202 amu; As: 75 amu.

Karakteristike izvođenja metode: limit kvantifikacije 0,03 mg/kg za Pb, 0,008 mg/kg za Cd, 0,002 mg/kg za Hg i 0,02 mg/kg za As.

5.3.2. Rezultati i diskusija o toksičnim metalima u proizvodima od jabuka

5.3.2.1. Prisustvo i sadržaj toksičnih metala u proizvodima od jabuka

Analizom nije detektovano prisustvo olova, kadmijuma, žive ni arsena u ispitanim uzorcima hrane za odojčad i malu decu.

Odsustvo detektabilnih količina najznačajnijih toksičnih metala ukazuje na pravilnu upotrebu resursa u pogledu kvaliteta sirovina, tj. voća, kao i adekvatnu kontrolu proizvodnog procesa.

5.3.2.2. Podaci u literaturi o prisustvu toksičnih metala u sokovima od voća

Publikovana ispitivanja toksičnih metala u proizvodima od voća, prvenstveno od jabuka, pokazala su različitosti u pogledu prisustva i sadržaja, a preovlađuju studije u kojima toksični metali nisu detektovani, kao ni u ovom istraživanju. Daleko najbrojnije su studije koje su istraživale prisustvo i sadržaj olova i kadmijuma u proizvodima od voća, dok su živa i arsen bili manje zastupljeni u istraživanjima.

Austrijsko-hrvatska studija objavljena 2011. godine (145), pokazala je da su koncentracije olova u uzorcima sokova od jabuka (kupljenim u različitim evropskim zemljama), određene metodom induktivno kuplovane plazme sa atomskom emisionom spektroskopijom (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, ICP-AES*), ispod limita detekcije (napomena: limit od detekcije od 0,240 mg/L se smatra vrlo visokim). Nizak nivo kontaminacije olovom u sokovima od jabuka zabeležen je i u Italiji (2006.g.) (146), u Rumuniji (uzorci organski, ceđeni sokovi) (147), gde se koncentracija, određivana ICP-MS metodom, kretala od 0,00002-0,01102 mg/L, zatim u Brazilu 0,0002 mg/L (2011. g.) (148), u Sjedinjenim Američkim Državama (2014. g.) u organskim sokovima od jabuka od 0,00084 do 0,0012 mg/L i od 0,00099 do 0,0074 mg/L u lokalnim proizvodima (149). Visoke koncentracije olova u sokovima od jabuka zabeležene su u studijama u Nigeriji (2009. g.) u kojima je sadržaj olova određen atomskom apsorpcionom spektrometrijom (*Atomic Absorption Spectrometry, AAS*) iznosio 0,08 mg/kg (150), u Gani 0,186 mg/L (2014. g.) (151) i dvema poljskim studijama (2005., 2013. g.) u kojima je sadržaj olova dostigao nivoe od 0,46 i 0,67 mg/L (152,153). U kategoriji voćnih sokova od drugog voća primećena je visoka varijabilnost u pogledu prisustva i sadržaja olova (154). Veoma niski ili nedektabilni nivoi olova u voćnim sokovima zabeleženi su u brazilskim studijama iz 2009. g.

(ispod limita kvantifikacije, odnosno 0,129 mg/L) (155) i 2012. godine (156), kao i u nigerijskoj studiji (2014. g.) na voćnim sokovima, uključujući i sokove od jabuka (157). Nizak nivo kontaminacije olovom u voćnim sokovima zabeležen je u istraživanjima u Brazilu (2011. g.) sa 100% pozitivnih uzoraka u opsegu koncentracija od 0,0003-0,002 mg/L (148), u Turskoj (2010. g.) na uzorcima soka od nara sa sadržajem od 0-0,02 mg/L (158). Brazilsko-čileanska studija (2008. g.) pokazala je da se nivo olova u soku od gvožđa kretao od 0,0165-0,1718 mg/L (159), u studiji na Siciliji (2009. g.) nivo olova u soku od crvene narandže iznosio je od <0,0002-0,085 mg/kg (160), a u istraživanju sprovedenom u Italiji (2006. g.) sadržaj olova u soku od kruške kretao se od 0,0082-0,0188 mg/kg (146). Rezultati studije u Turskoj (2011. g.) pokazali su prisustvo olova u svim ispitanim voćnim uzorcima: džemovima, nektarima i sokovima, među kojima su džem od jagode (0,28 mg/kg), nektar od breskve (0,23 mg/kg) i sok od breskve (0,24 mg/kg) imali najviši srednji sadržaj olova (161). Rezultati poljske studije (2005. g.) (152) pokazali su prisustvo olova u ispitanim voćnim sokovima u rasponu od 0,02 do 0,43 mg/L (najveća koncentracija nađena je u soku od aronije), a voćni sokovi ispitani 2013. godine (153) takođe su imali visoku koncentraciju olova od 0,091 mg/L u soku od pomorandže do 0,786 mg/L u soku od šljive. Visoki nivoi olova zabeleženi su u nigerijskoj studiji (2009. g.) (150), od 0,08 do 0,57 mg/L (najveća koncentracija nađena je u soku od limuna), u studijama u Gani (2014. g.) u soku od ananasa i voćnim koktelima (151) i u soku od limuna (2011. g.) (162). Rezultati pakistanske studije (2014. g.) (163), koja je obuhvatila 50 voćnih sokova uključujući i sokove od jabuka, ukazali su na različite koncentracije olova u sokovima pakovanim u različitoj ambalaži, pa je tako koncentracija olova u soku u tetrapaku iznosila od 0,098-1,061 mg/L, u vrećicama od 0,363-0,754 mg/L, a u plastičnim bocama od 0-0,116 mg/L (metoda AAS). Interesantna studija sprovedena u Turskoj (154) ispitivala je prisustvo toksičnih metala, između ostalih, olova i kadmijuma, u voću pokraj puteva, sakupljenog u 2008. godini, metodom ICP AES. Rezultati istraživanja su pokazali nizak nivo kadmijuma, za razliku od nivoa olova, koji je dostigao visok nivo zagađenja u voću poput jabuke, šljive, ruže. Smatra se da su pored ostalih, glavni izvori sadržaja teških metala u voću pokraj puteva zemljište i emisija gasova iz vozila.

Koncentracije kadmijuma u sokovima od jabuka kretale su se od nedetektabilnih u studijama u Nigeriji (2009., 2014. g.) (150,157), Brazilu (2011. g.) (148), Poljskoj (2013. g.) (153) i hrvatsko-austrijskoj studiji (2011. g.) (145), do 0,044 mg/L u istraživanju u Gani (2014. g.) (151)

i 0,06 mg/L u Poljskoj (2005. g.) (152). Niske vrednosti kadmijuma zabeležene su u organskim sokovima od jabuka u studiji u Rumuniji (2011. g.) (147), od 0,00014 do 0,00106 mg/L (ceđeni sokovi, incidencija 100%), kao i Sjedinjenim Američkim Državama (2014. g.) (149), od 0,00039 do 0,00070 mg/L, a vrednosti zabeležene u italijanskoj studiji (2006. g.) (146), kretale su se kod pozitivnih uzorka u opsegu 0,0024-0,0029 mg/kg. Veoma niski ili nedetektibilni nivoi kadmijuma u voćnim sokovima, zabeleženi su u brazilskim (2009., 2012. g.) (155,156) i nigerijskim studijama (2009., 2014. g.) (150,157), na voćnim sokovima uključujući i sok od jabuka, kao i u turskoj studiji (2010. g.) (158) u uzorcima soka od nara. Nizak nivo kontaminacije kadmijumom u voćnim sokovima zabeležen je u istraživanjima u Brazilu (2011. g.) (148) sa incidencijom od 72% i opsegom koncentracija od 0,0003-0,0011 mg/L, kao i u Turskoj (2012. g.) (164). Brazilsko-čileanska studija (2008. g.) (159) pokazala je da je nivo kadmijuma u soku od grožđa iznosio od 0,0022-0,0045 mg/L, u studiji na Siciliji (2009. g.) (160) nivo kadmijuma u soku od crvene narandže kretao se od <0,0002-0,0057 mg/kg, a u istraživanju sprovedenom u Italiji (2006. g.) (146), sadržaj kadmijuma u soku od kruške kretao se u opsegu 0,0026-0,003 mg/kg kod pozitivnih uzoraka. Rezultati poljske studije (2005. g.) (152) pokazali su prisustvo kadmijuma u voćnim sokovima u rasponu od 0,004 do 0,049 mg/L (najveća koncentracija nađena je u soku od crne ribizle), a u studiji iz iste zemlje iz 2013. godine (153) dve trećine uzoraka voćnih sokova je sadržalo kadmijum u koncentraciji od 0,010-0,041 mg/L. Rezultati pakistanske studije (2014. g.) (163) ukazali su na različite koncentracije kadmijuma u sokovima u različitoj ambalaži, pa je tako koncentracija u plastičnim bocama iznosila od 0 do 0,016 mg/L, u tetrapaku od 0 do 0,032 mg/L, a u vrećicama od 0,0091 do 0,249 mg/L. Visoki nivoi kadmijuma, oko 0,040 mg/L, zabeleženi su u Gani u soku od ananasa (151), u Poljskoj u soku od grejpfruta (153) i sokovima od pomorandže, aronije i crne ribizle (152).

Prisustvo i sadržaj žive ispitivani su u studiji sprovedenoj na Siciliji (2009. g.) (160) u kojoj živa nije detektovana korišćenjem atomske apsorpcione spektroskopije sa generisanjem hladnih para (*Cold Vapor Atomic Absorption Spectroscopy, CV-AAS*) u soku od crvene narandže, kao ni u organskim sokovima od jabuka u studiji sprovedenoj u Sjedinjenim Američkim Državama (2014. g.), dok su se rezultati za lokalne uzorke kretali od nedetektovanih do 0,00014 mg/L (149).

Prisustvo i sadržaj arsena istraživani su u Španiji (2007. g.) (165), gde je koncentracija arsena u sokovima od jabuka, određena metodom atomske fluorescentne spektrometrije sa generisanjem

hidrida (*Hydride Generation Atomic Fluorescence Spectrometry, HGAFS*), iznosila 0,0022-0,014 mg/L, dok je u studiji u Rumuniji (2010. g.) (147) nivo kontaminacije arsenom u organskim sokovima od jabuka, određen ICP-MS tehnikom, bio oko deset puta niži (0,00018-0,00114 mg/L). U istraživanju na Siciliji (160) srednja koncentracija arsena u soku od crvene narandže iznosila je 0,0008 mg/kg. U Argentini (2008. g.) (166) zabeležen je nivo arsena od 0,0012-0,0038 mg/kg u sokovima od limuna, u Gani (2011. g.) (162) od 0,0112 do 0,0168 mg/kg u ceđenom sokovima od limete, a nije detektovan u ceđenim sokovima od pomorandže, kao ni od limuna. U studiji u Sjedinjenim Američkim Državama objavljenoj 2014. godine (149), ukupni arsen u lokalnim uzorcima kretao se od 0,0037 do 0,0085 mg/L, dok je raspon bio dvostruko niži u organskim sokovima od jabuka.

6. OCENA BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA

6.1. METODOLOGIJA ZA OCENU BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA

Analitičke metode primenjene u ovom istraživanju, po svojim karakteristikama izvođenja, primerene su za ocenu bezbednosti ispitanih proizvoda, prvenstveno u smislu najmanjih količina analita koje se mogu detektovati / kvantifikovati.

Ocena bezbednosti ispitivanih uzoraka data je na osnovu poređenja dobijenih rezultata sa relevantnim maksimalno dozvoljenim nivoima definisanim zakonskom osnovom u Republici Srbiji, odnosno Evropskoj uniji. Praćen je procenat uzoraka iznad maksimalno dozvoljenih nivoa, u odnosu na kategorije uzoraka i prisutne toksične supstance od interesa: patulin, ostaci 49 pesticida i četiri toksična metala.

6.2. ZAKONSKA OSNOVA

6.2.1. Patulin

Prema regulativi koja je na snazi u Evropskoj uniji, maksimalni dozvoljeni nivo patulina u voćnim sokovima, rekonstituisanim koncentrovanim voćnim sokovima i voćnim nektarima iznosi 50 µg/kg, dok se za hranu za odojčad i malu decu (sok od jabuka i čvrsti proizvodi od jabuka, uključujući kompot i pire od jabuka), deklarisanog i iznetog na tržište, primenjuje znatno stroži maksimalni nivo od 10 µg/kg (167). Zakonska osnova u Republici Srbiji usklađena je sa zakonodavstvom koje se primenjuje u Evropskoj uniji (11,12).

6.2.2. Ostaci pesticida

Hrana za odojčad i malu decu ne sme da sadrži ostatke pojedinačnih pesticida u količini većoj od 0,01 mg/kg, a izdvojen je određen broj pesticida koji se ne smeju koristiti u proizvodnji sastojaka namenjenih za proizvodnju hrane za odojčad i malu decu, koji ne smeju biti detektovani (11).

Sa izuzetkom hrane za odojčad i malu decu, ograničenja za sadržaj ostataka pesticida propisana su za sirove poljoprivredne kulture, uključujući i voće, dok je za prerađene namirnice, kakav je i voćni sok, potrebno uzeti u obzir promene nivoa ostataka pesticida izazvane preradom ili mešanjem hrane (12).

6.2.3. Toksični metali

Maksimalni dozvoljeni nivoi za sadržaj toksičnih metala u hrani za odojčad i malu decu postavljeni su na 0,08 mg/kg za olovo, 0,02 mg/kg za kadmijum, 0,005 mg/kg za živu i 0,08 mg/kg za arsen (11). Maksimalni nivo olova u voćnim sokovima, rekonstituisanim koncentrovanim voćnim sokovima i voćnim nektarima definisan je na nivou 0,050 mg/kg, dok je za kadmijum, živu i arsen definisan maksimalni sadržaj u svežem voću od 0,050, 0,02 i 0,3 mg/kg, redom (12).

6.3. REZULTATI I DISKUSIJA O OCENI BEZBEDNOSTI PROIZVODA OD JABUKA

6.3.1. Patulin

Ni u jednom od 114 uzoraka hrane za odojčad i malu decu ispitanih u ovom istraživanju nije utvrđen sadržaj patulina preko 10 µg/kg, iz čega proizilazi da svi ispitani uzorci u pogledu sadržaja patulina odgovaraju zakonskim zahtevima (11).

Ispitivanje 100 uzorka sokova u pakovanju sa cevčicom za rezultat je dalo koncentracije patulina ispod 50 µg/kg, čime je utvrđena usaglašenost svih ispitanih uzoraka u pogledu sadržaja patulina sa zakonskim zahtevima (12).

Među 114 ispitanih sokova u porodičnom pakovanju, samo za jedan je utvrđen sadržaj patulina preko 50 µg/kg, što čini 0,7% uzoraka iz ove grupe. Uzimanjem u obzir proširene merne nesigurnosti metode od 26,7% za nivo poverenja od 95%, rezultat od 65,4 µg/kg bi bio proširen za interval od $\pm 17,5$ µg/kg (47,9-82,9 µg/kg), čime bi bila obuhvaćena i maksimalno dozvoljena koncentracija od 50 µg/kg, odnosno, uzorak bi odgovarao zakonskim zahtevima (12). Ipak, ukoliko bi se kao zahtev postavio viši nivo poverenja, ocena bi mogla biti da uzorak sa sadržajem patulina od 65,4 µg/kg nije usaglašen sa zakonskim zahtevima.

6.3.2. Ostaci pesticida

U hrani za odojčad i malu decu u kojoj su detektovani ostaci pesticida, njihov sadržaj je bio ispod maksimalno dozvoljene koncentracije, a u određenom broju slučajeva pri oceni je u obzir uzeta i proširena merna nesigurnost metode. Izuzetak je nalaz acetamiprida u jednoj kašici domaće proizvodnje, u kojoj je ovaj pesticid nađen u količini od 0,070 mg/kg, što uzorak čini neusaglašenim sa zakonskim zahtevima.

Potrebno je naglasiti da su u određenom broju uzoraka detektovani ostaci pesticida (ukupno pet pesticida) čija upotreba nije dozvoljena u Evropskoj uniji. U hrani za odojčad i malu decu detektovani su karbendazim i flusilazol u 70% i 5% domaćih uzoraka, odnosno u 23% i 2,9% uzoraka iz uvoza, redom. U grupi sokova u pakovanju sa cevčicom detektovani su karbendazim (55%), endosulfan (6,9%) i propoksur (3,4%), a u sokovima u porodičnom pakovanju karbendazim (51%), flusilazol (2,4%) i karbofuran (1,2%).

Da bi se ocenila usaglašenost ispitanih uzoraka sokova u pakovanju sa cevčicom i sokova u porodičnim pakovanjima sa relevantnim zakonskim zahtevima, bilo bi neophodno poznavati procesne faktore za preračunavanje uvrđenih koncentracija pesticida u analiziranim sokovima na sadržaj pesticida u svežem voću od kojeg su sokovi pripremljeni, jer su maksimalno dozvoljene koncentracije definisane upravo za sveže voće. Procesni faktori su dostupni samo za vrlo ograničen broj pesticide / voće / proces prerade kombinacija, i njihovo određivanje predstavlja područje veoma intenzivnog istraživanja. Ipak, s obzirom na veoma niske utvrđene koncentracije pesticida, može se sa značajnom sigurnošću očekivati da su uzorci analizirani u ovom istraživanju usaglašeni sa zakonskim zahtevima (12).

Nalaz spiroksamina u količini od 0,629 mg/kg u soku u porodičnom pakovanju odnosi se na sok koji je mešavina deset vrsta voća, između ostalih i banana, u kojima je spiroksamin dozvoljen do 3,0 mg/kg. Pirimetanil je nađen u dva uzorka soka u porodičnom pakovanju, u koncentracijama od 0,20 mg/kg (sok od kajsija i jabuka) i 0,027 mg/kg (sok od malina, jabuka i grožđa). S obzirom da je prisustvo pirimetanila dozvoljeno do 15 mg/kg u jabukama i malinama, do 10 mg/kg u kajsijama i do 8 mg/kg u grožđu, procena je da su i ovi uzorci usklađeni sa zakonom.

6.3.3. Toksični metali

Uzimajući u obzir limite kvantifikacije primenjene analitičke metode (0,03 mg/kg za olovo, 0,008 mg/kg za kadmijum, 0,002 mg/kg za živu i 0,02 mg/kg za arsen), na osnovu činjenice da ni u jednom od ispitanih uzoraka hrane za odojčad i malu decu nije detektovano prisustvo toksičnih metala od interesa, može se izvesti pouzdan zaključak da su ispitani uzorci usaglašeni sa zakonskim zahtevima u pogledu sadržaja olova, kadmijuma, žive i arsena (11).

7. PROCENA IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU I KARAKTERIZACIJA RIZIKA

7.1. METODOLOGIJA ZA PROCENU IZLOŽENOSTI I KARAKTERIZACIJU RIZIKA

Za procenu izloženosti populacije patulinu kao ulazni elementi potrebni su: definisane populacione grupe od interesa, podaci o prosečnoj telesnoj masi za definisane populacione grupe, podaci o konzumiranoj količini proizvoda od jabuka na dnevnom nivou, podaci o sadržaju patulina u proizvodima od jabuka.

Unos patulina je procenjen primenom dva matematička principa, determinističkog i probabilističkog, na osnovu kojih je okarakterisan i sledstveni zdravstveni rizik.

7.1.1. Ulazni elementi

Populacione grupe

Pri proceni rizika, zasebno se razmatraju populacione grupe od interesa. Karakteristično je da se proizvodi od jabuka konzumiraju posebno tokom nekoliko prvih godina života, i stoga su odojčad i mala deca više izložena patulinu, nego odrasli (89). Dodatno, odojčad i mala deca su i osetljivija na delovanje toksina u odnosu na odrasle, zbog specifičnih zahteva u ishrani, manje telesne mase, intenziteta metaboličkih procesa, smanjene mogućnosti detoksifikacije i nedovoljne razvijenosti pojedinih organa i tkiva (168).

U ovom istraživanju, populacija je posmatrana kroz sledeće populacione grupe: odojčad, deca predškolskog uzrasta, deca (7-10 godina), adolescenti (11-14 godina) i odrasli (preko 15 godina).

Prosečna telesna masa različitih populacionih grupa

Za populacione grupe odojčad i mala deca u Republici Srbiji nisu dostupni zvanični nacionalni podaci o prosečnoj telesnoj masi. Stoga su u proračun izloženosti za ove populacione grupe uzete vrednosti zasnovane na podacima iz literature (10 i 20 kg, redom) (na primer: 68,121). Za ostale

populacione grupe vrednosti prosečne telesne mase su dobijene iz podataka prikupljenih u okviru nacionalnog izveštaja o zdravstvenom stanju stanovništva Republike Srbije, sprovedenog 2013 godine (33,17 kg, 51,78 kg i 76,27 kg za decu (7-10 godina), adolescente (11-14 godina) i odrasle, redom) (169).

Potrošnja proizvoda od jabuka

Proizvodi od jabuka su grupisani prema nameni proizvoda, ili od koga se može razložno očekivati da budu konzumirani. Hrana za odojčad i malu decu je, u skladu sa zakonskim propisima, jasno označena, dok je za proizvode za decu mlađeg uzrasta karakteristična ambalaža sa njima privlačnim likovnim elementima, ili, pak, jedinična veličina i sam način pakovanja, kao što su pakovanja sokova malih zapremina sa cevčicom.

S obzirom da za populacione grupe odojčad i mala deca nisu dostupni zvanični nacionalni podaci o potrošnji proizvoda od jabuka, u proračun izloženosti za ove populacione grupe uzete su vrednosti zasnovane na podacima iz literature koje okvirno odgovaraju veličini jediničnih pakovanja (0,125 L/dan za sokove za odojčad, 0,120 kg/dan za kašice za odojčad, 0,200 L/dan za voćne sokove namenjene deci) (68,121). Za određivanje potrošnje voćnog soka od strane odraslih osoba iskorišćeni su podaci iz nacionalnih godišnjih anketa o potrošnji domaćinstava u Republici Srbiji za godine u kojima je sprovedeno istraživanje (0,05 L/dan) (170-172), kao i studije koja je istraživala potrošnju prerađenog voća u regionu zapadnog Balkana, uključujući Republiku Srbiju, sprovedene u okviru FOCUS-BALKANS projekta (173). U studiji zasnovanoj na upitniku, više od polovine ispitanika izjasnilo se da na dnevnom nivou konzumira voćni sok, najčešće kupljen u supermarketima, bez generalnih razlika u pogledu pola, starosti, gradskog i seoskog stanovništva. Kada su u pitanju deca, čaša voćnog soka (0,2 L) je smatrana uobičajenom dnevnom konzumacijom, dok je za adolescente ova vrednost dvostruko niža.

Sadržaj patulina u proizvodima od jabuka

Kako su za procenu hronične izloženosti populacije patulinu od značaja podaci o kontaminaciji iz dužeg vremenskog perioda, za izračunavanje su korišćeni sumirani rezultati za sadržaj patulina za svaku od grupa proizvoda od jabuka u celosti (svi uzorci iz grupe iz celokupnog perioda 2013-2015).

7.1.2. Procena izloženosti populacije determinističkim pristupom

Deterministička procena izloženosti populacije patulinu sprovedena je korišćenjem Microsoft Excel 2010 softvera (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). U pogledu koncentracije patulina u uzorcima razmatrana su četiri scenarija: tri zasnovana na različitom tretmanu rezultata za uzorke u kojima patulin nije detektovan ($<LOD$): nula (H1), 1/2 LOD (H2) i LOD (H3) (174), kao i jedan scenario u kojem su u obzir uzeti samo kontaminirani uzorci (H4). Dnevni unos patulina je izračunat množenjem srednje koncentracije patulina u specifičnom scenariju sa dnevnom potrošnjom datog proizvoda, i zatim izražen po kilogramu telesne mase.

7.1.3. Procena izloženosti populacije probablističkim pristupom

Probabilistička procena izloženosti populacije patulinu sprovedena je korišćenjem @Risk[®] for Microsoft Excel version 6 (Palisade Corporation, USA) programa. Unos patulina je procenjen na bazi podataka o kontaminaciji ispitanih proizvoda patulinom i napred navedenih vrednosti za konzumirane količine proizvoda i telesnu masu različitih populacionih grupa (korišćenih kao fiksne vrednosti). U pogledu podataka o kontaminaciji uzoraka patulinom, za odabir najprimerenije funkcije raspodele verovatnoće korišćena je “*best fit*” funkcija @Risk programa, zasnovano na Akaike’s Information Criterion (AIC). Slično determinističkom pristupu, razmatrana su tri scenarija (H1, H2 i H3) za podatke o kontaminaciji. Primenom Monte Carlo simulacije kroz 100 000 iteracija u obzir su uzete i svojstvena varijabilnost i nesigurnost podataka o kontaminaciji (“*bootstrap*” tehnika). Određene su vrednosti procenjenog unosa patulina pri različitim percentilima unosa (P50, P75, P90, P95, P97,5) koje su zatim iskorišćene za karakterizaciju rizika (175).

7.1.4. Karakterizacija rizika

Rizik je okarakterisan odnosom između procenjenog dnevnog unosa patulina i referentne doze (PMTDI) za patulin od 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TM (9), koji se označava kao količnik opasnosti (*hazard quotient*, HQ). Prema Evropskoj agenciji za bezbednost hrane (176), HQ < 1 ukazuje na tolerantan nivo izloženosti, dok HQ > 1 označava izloženost preko tolerantnog nivoa.

7.2. REZULTATI I DISKUSIJA O PROCENI IZLOŽENOSTI POPULACIJE PATULINU I KARAKTERIZACIJI RIZIKA

7.2.1. Deterministička procena izloženosti i karakterizacija rizika

Deterministička procena unosa patulina putem proizvoda od jabuka i sledstvena karakterizacija rizika za različite uzrasne grupe populacije u Republici Srbiji prikazana je u Tabeli 7.1.

Deterministička procena izloženosti patulinu (Tabela 7.1) pokazala je nivoe izloženosti znatno ispod PMTDI u svim razmatranim scenarijima. HQ za odojčad nisu prevazišli vrednost od 0,1, izuzev u slučaju H4 scenarija u kom su izdvojeni samo kontaminirani uzorci. Za predškolsku decu, maksimalna vrednost HQ od 0,140 izračunata je za konzumaciju sokova sa cevčicom, dok je u slučaju konzumacije sokova u porodičnom pakovanju vrednost HQ znatno porasla, na 0,210, što je i dalje znatno niže od 1. U populacionoj grupi dece uzrasta od 7-10 godina, unos patulina je okarakterisan HQ vrednostima do 0,068 u H1-H3 scenarijima, i maksimalnih 0,127 u najkonzervativnijem H4 scenariju. U slučaju adolescenata i odraslih, procenjeni unos patulina je bio vrlo nizak, što je za rezultat dalo maksimalne HQ vrednosti u H4 scenariju od 0,041 i 0,014, redom.

Međutim, postavlja se pitanje kontrole izloženosti dece mlađeg uzrasta, koja konzumiraju voćne sokove koje zakon ne razlikuje kao posebnu kategoriju hrane, kao što su voćni sokovi u ambalaži sa cevčicom, na koje se primenjuje ograničenje od 50 µg patulina/kg. Uzimajući u obzir manju telesnu masu dece u odnosu na odrasle, konzumiranje sokova sa sadržajem patulina ispod 50 µg/kg, ali koji se približava navedenoj granici, moglo bi se dovesti do prekoračenja prihvatljivog dnevnog unosa u populaciji dece.

Tabela 7.1. Unos patulina (deterministički pristup) putem proizvoda od jabuka i karakterizacija rizika na osnovu HQ.

Populaciona grupa (uzrast)	Proizvod od jabuka	H1: < LOD = 0		H3: < LOD = LOD		H4: kontaminirani uzorci	
		Unos patulina (ng/kg TM/dan)	HQ	Unos patulina (ng/kg TM/dan)	HQ	Unos patulina (ng/kg TM/dan)	HQ
Odojčad (8-12 m.)	Sok za odojčad	20,0	0,050	22,5	0,056	45,0	0,112
	Kašica	7,2	0,018	10,8	0,027	40,8	0,102
Predškolska deca	Sok sa cevčicom	26,0	0,060	26,0	0,065	56,0	0,140
	Sok	43,0	0,108	45,0	0,113	84,0	0,210
Deca (7-10 g.)	Sok	25,9	0,065	27,1	0,068	50,6	0,127
Adolescenti (11-14 g.)	Sok	8,3	0,021	8,7	0,022	16,2	0,041
Odrasli (15+ g.)	Sok	2,8	0,007	3,0	0,008	5,5	0,014

Napomene: telesna masa: odojčad = 10 kg; predškolska deca = 20 kg; deca = 33,17 kg; adolescent = 51,78 kg; odrasli = 76,27 kg.
Konzumirana količina: hrana za odojčad i malu decu - sok = 0,125 L/dan, kašica = 0,120 kg/dan; sok sa cevčicom = 0,200 L/dan;
sok = 0,200 L/dan za predškolsku decu i decu, 0,1 L/dan za adolescente, 0,05 L/dan za odrasle.

HQ su izračunati uzimanjem u obzir vrednosti unosa i PMTDI izvedenog od strane JECFA (9) za patulin (400 ng/kg TM/dan).

H2 scenario nije prikazan zbog uskog raspona između H1 i H3, u kom je obuhvaćen i H2.

7.2.2. Probabilistička procena izloženosti i karakterizacija rizika

Probabilistička procena unosa patulina putem proizvoda od jabuka za različite uzrasne grupe populacije u Republici Srbiji prikazana je u Tabeli 7.2, a sledstvena karakterizacija rizika na Graficima 7.1, 7.2 i 7.3 (scenariji H1-H3, redom).

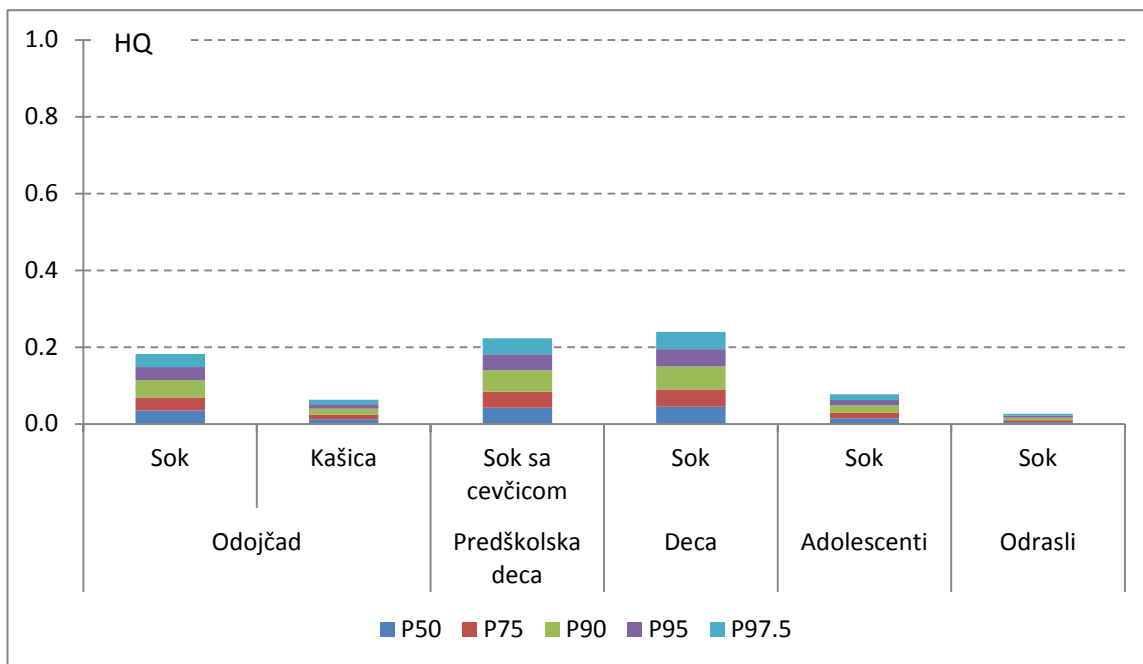
Probabilistička procena izloženosti patulinu (Tabela 7.2) i sledstvena karakterizacija rizika (HQ) (Grafici 7.1, 7.2 i 7.3), prema tri razmatrana scenarija (H1, H2 i H3) pokazale su uporedive rezultate sa procenom proisteklom iz determinističkog pristupa. Čak i u H3 scenariju ($<LOD = LOD$), HQ za najviši percentil unosa (P97,5) za predškolsku decu je ispod 0,4 (HQ 0,39), mada znatno viši u odnosu na odgovarajući HQ za odojčad (0,27). Pri nižim percentilima unosa razlike između grupa nisu tako jasno izražene. Preostali scenariji sledili su isti put. U poređenju sa ostalim populacionim grupama, najviši rizik utvrđen je za grupu dece (7-10 g.), mada znatno ispod 1. Za najviši razmatrani percentil unosa (P97,5), HQ za decu je iznosio 0,46, dakle manje od 50% od PMTDI (400 ng/kg TM/dan). Dobijeni rezultati pokazuju da unos patulina putem ispitanih proizvoda od jabuka ne predstavlja zdravstveni rizik za populaciju u Republici Srbiji.

Tabela 7.2. Unos patulina (probabilistički pristup) putem proizvoda od jabuka

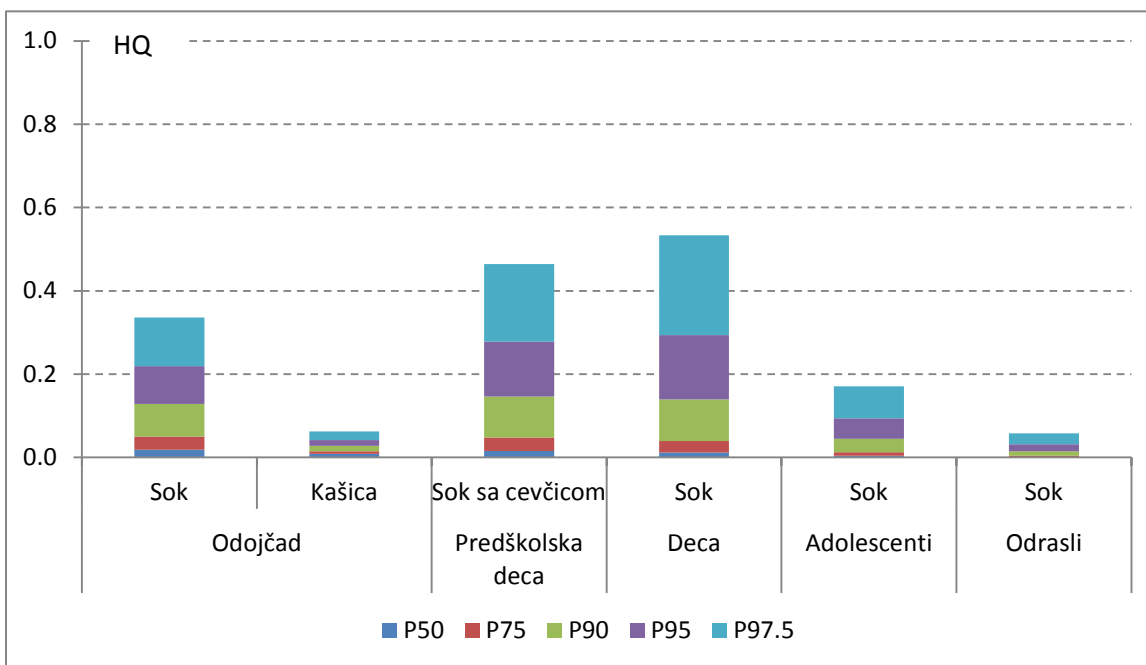
Populaciona grupa (uzrast)	Unos patulina (ng/kg TM/dan)																	
	H1: < LOD = 0						H2: < LOD = ½ LOD						H3: < LOD = LOD					
	Prosek	P50	P75	P90	P95	P97,5	Prosek	P50	P75	P90	P95	P97,5	Prosek	P50	P75	P90	P95	P97,5
Odojčad (8-12 m.)	19,8	13,7	27,4	45,5	59,2	72,9	21,2	7,4	19,9	51,2	87,6	134,4	22,7	12,1	26,1	52,5	77,5	106,5
	6,8	4,8	9,5	15,8	20,5	25,3	5,9	3,4	6,0	11,1	16,8	24,9	8,5	6,3	9,8	15,5	20,9	27,7
Predškolska deca	21,2	16,8	33,5	55,7	72,5	89,2	25,3	6,2	19,2	58,5	111,3	185,7	36,8	8,6	18,9	46,0	85,2	155,2
Deca (7-10 g.)	26,0	18,0	36,0	59,8	77,8	95,8	26,6	4,6	15,7	55,6	117,4	213,5	27,1	8,0	23,2	64,8	116,4	185,6
Adolescenti (11-14 g.)	8,3	5,8	11,5	19,2	24,9	30,7	8,5	1,5	5,0	17,8	37,6	68,4	8,7	2,6	7,4	20,8	37,3	59,5
Odrasli (15+ g.)	2,8	2,0	3,9	6,5	8,5	10,4	2,9	0,5	1,7	6,1	12,8	23,2	3,0	0,9	2,5	7,0	12,7	20,2

Napomene: telesna masa: odojčad = 10 kg; predškolska deca = 20 kg; deca = 33,17 kg; adolescent = 51,78 kg; odrasli = 76,27 kg.

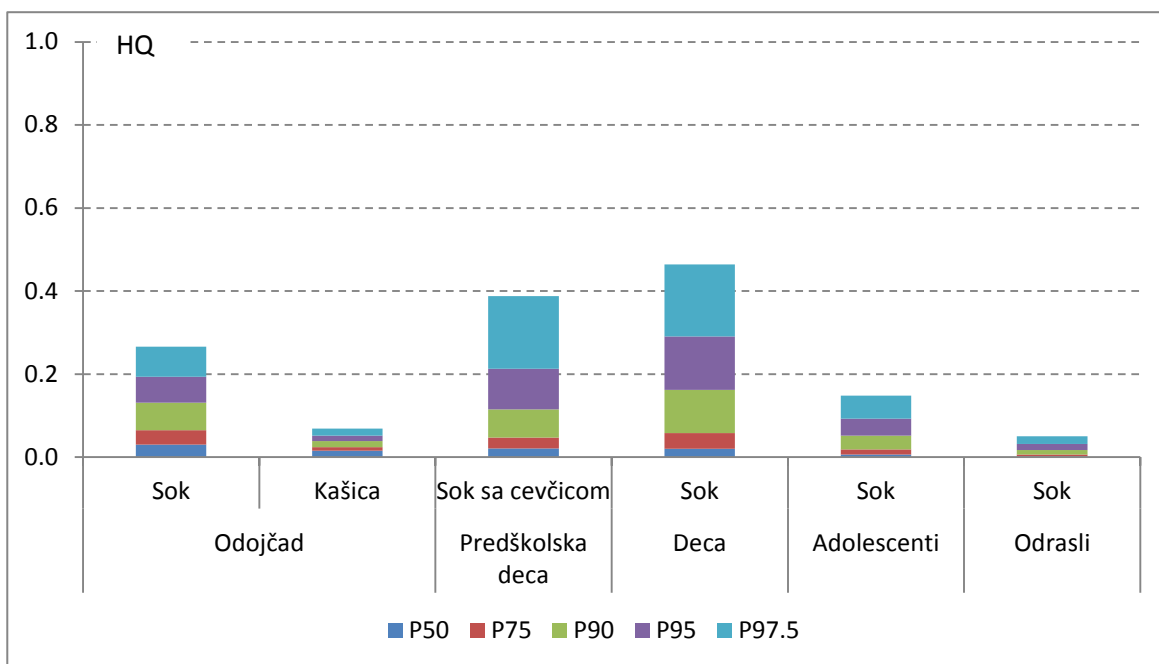
Konzumirana količina: hrana za odojčad i malu decu - sok = 0,125 L/dan, kašica = 0,120 kg/dan; sok sa cevčicom = 0,200 L/dan; sok = 0,200 L/dan za predškolsku decu i decu, 0,1 L/dan za adolescente, 0,05 L/dan za odrasle.



Grafik 7.1. Karakterizacija rizika usled izloženosti patulinu za različite starosne grupe populacije u Republici Srbiji (H1 scenario: $\langle LOD = 0 \rangle$).



Grafik 7.2. Karakterizacija rizika usled izloženosti patulinu za različite starosne grupe populacije u Republici Srbiji (H2 scenario: $\langle LOD = \frac{1}{2} LOD \rangle$).



Grafik 7.3. Karakterizacija rizika usled izloženosti patulinu za različite starosne grupe populacije u Republici Srbiji (H3 scenario: $\text{LOD} = \text{LOD}$).

7.2.3. Uticaj biodostupnosti patulina na procenu izloženosti populacije

Pri proceni potencijala toksičnog jedinjenja da u interakciji sa humanim organizmom ispolji svoje toksične efekte, potrebno je razmotriti koja frakcija od ukupne količine jedinjenja je potencijalno dostupna za apsorpciju (biodostupna frakcija) nakon ingestije kontaminirane hrane.

Za ispitivanje biodostupnosti razvijen je standardizovani statički *in vitro* digestioni model, predložen u okviru konzenzus dokumenta i validiran u međulaboratorijskom ispitivanju u okviru COST INFOGEST mreže (177,178). Osnovna prednost standardizovanih modela je u uporedivnosti i pouzdanosti rezultata dobijenih u različitim laboratorijama.

Za potrebe ovog istraživanja, biodostupnost patulina procenjena je ispitivanjem četiri soka na bazi jabuka sa 50% voćnog sadržaja (dva bistra i dva mutna), kontaminirana sa po 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ patulina. Standardni protokol (177,178) je modifikovan kao što je to opisano od strane Assunção i saradnika (179), u cilju karakterizacije biodostupnosti patulina duž tri faze digestionog procesa – oralne, gastrične i intestinalne. Biodostupnost patulina je izražena kao procenat početne količine patulina koji dostiže kraj oralne, gastrične i intestinalne faze digestije. Prosečne

vrednosti biodostupnosti patulina za svaku od digestionih faza iznosile su 77,8%, 79,3% i 21,6%, redom. Ovi rezultati su pokazali statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje biodostupnosti u intestinalnoj fazi, u poređenju sa oralnom i gastričnom fazom digestije (180). Uočene su i razlike u biodostupnosti između bistrih i mutnih sokova, što može biti objašnjeno uticajem matriksa hrane dokumentovanim u literaturi, pored nivoa kontaminacije i načina na koji je hrana kontaminirana (prirodno ili namerni dodatak kontaminanta) na biodostupnost (181). Ranije studije (182) pokazale su slične vrednosti za biodostupnost patulina iz sokova na bazi jabuka u intestinalnoj fazi i, takođe, pokazale značajno smanjenje biodostupnosti, što nameće hipotezu da pH može biti ključni uticajni faktor.

Iz rezultata za biodostupnost patulina proizilazi da su koncentracije patulina znatno umanjene tokom digestionog procesa. Uzimajući u obzir procenjeni unos patulina (P97,5 unosa dece (7-10 g.) – prema H-3 scenariju najviše izložena populacija sa 185,58 ng/kg TM/dan (Tabela 7.2)) i prosečnu intestinalnu biodostupnost (21,6%), interna izloženost (40,09 ng/kg TM/dan) je znatno niža od eksterne. Ovi rezultati podržavaju nalaz da je izloženost putem konzumiranja ispitanih proizvoda u okviru tolerantnih granica i da je sledstveni rizik za populaciju Republike Srbije nizak.

Iz perspektive procene rizika, rezultati koji uključuju biodostupnost doprinose preciznijoj proceni rizika, uzimanjem u obzir količine toksikanta koja je dostupna za apsorpciju u tankom crevu. Nedavno publikovani vodič Evropske agencije za bezbednost hrane (183) izneo je informaciju je o većoj osetljivosti odojčadi uzrasta do 16 nedelja na uticaj kontaminanata iz hrane. Važno je imati u vidu da značajan udeo unosa hrane od strane dece predstavljaju komercijalni proizvodi, a mnogi od njih sadrže jabuke. Kako je patulin uglavnom prisutan u jabukama i proizvodima od jabuka, ovi proizvodi mogu biti važan put izloženosti patulinu. Dodatno, isti izveštaj je naglasio da gastrična, pankreasna i bilijarna funkcija nisu potpuno razvijene kod odojčadi. Rezultati ispitivanja biodostupnosti patulina pokazali su visoku gastričnu biodostupnost koja može predstavljati zdravstveni problem za populaciju odojčadi. Potrebne su nove toksikološke studije, koje bi povezale biodostupnost patulina i potencijalni rizik usled apsorpcije patulina u želucu, sa posebnom pažnjom usmerenom na decu, kao najosetljiviju i najviše izloženu populacionu grupu.

7.2.4. Podaci u literaturi o izloženosti različitim populacija patulinu

Skorašnje studije koje su se bavile problemom procene rizika usled unosa patulina putem proizvoda od jabuka u evropskoj populaciji prikazane su u Tabeli 7.3. Potrebno je napomenuti da različite postavke studija i metode izračunavanja ne omogućavaju lako poređenje rezultata; dodatno, ni jedna od prikazanih studija nije uzela u obzir biodostupnost patulina iz matriksa hrane. Kao najvažnije, neophodno je istaći da je izloženost svih populacionih grupa ispod tolerantnog nivoa zajednički nalaz svih studija, bez obzira na države i vremenske periode sprovođenja studija. Međutim, uočavaju se značajne razlike između država – na primer, značajno viši unos patulina kod dece u Rumuniji nego u Holandiji, kao i u okviru jedne države, što se može prikazati na primeru pet španskih studija sa prosečnim unosom koji varira u opsegu od 4-252 ng/kg TM/dan za odojčad i od <3-155 ng/kg TM/dan za decu. Prema proceni izloženosti patulinu, odojčad i predškolska deca u Republici Srbiji su približna svojim vršnjacima u Holandiji, odnosno Belgiji, redom, dok je procenjena izloženost dece u susednoj Rumuniji dvostruko viša u odnosu na Republiku Srbiju.

Izloženost odrasle populacije u Republici Srbiji je uporediva sa izloženošću španske odrasle populacije prema proceni u studiji iz najpribližnijeg vremenskog perioda, kao i sa prosečnom izloženošću odrasle populacije na nivou Evropske unije, procenjenom 2002. godine na 3 ng/kg TM/dan (5). Sa druge strane, procenjena izloženost odrasle populacije u Republici Srbiji dvostruko je niža u odnosu na istu populacionu grupu u Republici Hrvatskoj, odnosno 13 puta niža u odnosu na Rumuniju.

Tabela 7.3. Unos patulina putem proizvoda od jabuka od strane dece i odojčadi u Evropi (studije publikovane od 2007. g.).

Država (godina)	Populaciona grupa (uzrast)	Telesna masa (kg)	Napomena za proizvod ^a	Potrošnja (mL) ili (g) /dan	Sadržaj patulina (µg/kg) ili (µg/L)	Unos patulina (ng/kg TM/dan)	Referenca		
Belgija	Predškolska deca	nn	konvencionalni	200	4,1	9 (6-13) prosek, 59 (31-85) P95	121		
			organski		8,8	19 (10-32) prosek, 72 (27-117) P95			
			zanatski		4,4	10 (5-15) prosek, 65 (27-102) P95			
Holandija	Odojčad (8-12 m.)	nn	konvencionalni	nn	Holandija: 11,3,	20,3 (17,3-23,6) P50, 107 (97,1-123) P95	184		
	Deca (13-20 m.)		organski		9,8 sos; Nemačka:	32,7 (23,2-44) P50, 199 (138-307) P95			
	Deca (24-48 m.)		konvencionalni		12,4, 4,0 sos; Belgija:	10,7 (8,5-12,5) P50, 105 (80,9-122) P95			
Španija (2008)	Odojčad (0-3 g.)	11,3	konvencionalni	22,2+58,3+20,4 prosek 130+130+135,5 P95	7,4; 6,9; 7,5 (pozitivni)	21 (17-31,4) P50, 212 (185-342) P95	52		
	Deca (4-18 g.)	48,2	organski			43,1 organski		7,8 (6,4-9,1) P50, 33,1 (28,2-40) P95	
	Odrasli	74,6	mešani +sok jabuka			64,53		15,8 (10,8-22,2) P50, 67,6 (47,7-91,5) P95	
Španija	Odojčad	10	/	130	19,4	40 prosek, 130 P95	68		
	Deca	25	/	200		8			
	Odrasli	70	/	200		5			
Španija (2008)	Odojčad (~1 g.)	10	/	130	8	252	125		
Španija (2008)	Odojčad i mala deca (0-3 g.)	11,3	/	100	<2,1	104	37		
	Deca (4-18 g.)	48,2	/	64	<10	12 (najviše)			
	Odrasli	74,6	/	64	<2				
Španija (2011-2012)	Odojčad i mala deca (0-3 g.)	12	konvencionalni	20,4 prosek, 135,5 P95	2,3	4,0 prosek, 26,3 P95	53		
	Deca (4-18 g.)	organski	22,2 prosek, 130 P95			9,1		15,5 prosek, 103 P95	
		organski pire	22,2 prosek, 130 P95			1,0		1,9 prosek, 10,8 P95	
Rumunija	Odojčad	10	konvencionalni	100	13,3 (medijana)	12,7 prosek, 74,3 P95	128		
	Deca	25	organski			6,9		3,8	
	Odrasli	70	organski			2,3		14,7	
Hrvatska (2013-2016)	Odojčad	10	konvencionalni	66 prosek, 181 P95	6,6 (<LOQ=0)	2,1	126		
	Deca	25	organski			9,1		8,3	
	Odrasli	70	organski			2,3		8,0 prosek, 20,0 P95	
Hrvatska (2013-2016)	Odrasli	48-130	/	66 prosek, 181 P95	8,6 (<LOQ=1/2 LOQ)	2,1	126		
	Odrasli	48-130	/			66 prosek, 181 P95		8,6 (<LOQ=1/2 LOQ)	8,3
									9,1

^a odnosi se na sok od jabuka ukoliko nije drugačije navedeno, P50 – 50. percentil, P95 – 95. percentil, nn – nije navedeno.

7.3. NESIGURNOSTI POVEZANE SA PROCENOM RIZIKA

Nesigurnosti povezane sa prikazanom procenom rizika potiču uglavnom od podataka za potrošnju proizvoda od jabuka, kao i činjenice da nisu svi proizvodi od jabuka uzeti u obzir. Prema FOCUS-BALKANS projektu (173), potrošnja drugih proizvoda od voća, osim voćnih sokova, manje je zastupljena u regionu Balkana. Stoga se može razumno očekivati da je doprinos ovih proizvoda unosu patulina mali, a da ukupna izloženost putem hrane ostaje znatno ispod tolerantnog nivoa.

8. ZAKLJUČAK

U radu su postignuti sledeći rezultati:

- Izabrana je i okarakterisana jedinstvena metoda za analizu patulina pogodna za različite vrste proizvoda od jabuka.
 - Na osnovu dostupnih podataka i preliminarnih eksperimenata, izabrana je jedinstvena metoda za analizu patulina, zasnovana na ekstrakciji uzoraka pomoću etil acetata i heksana, prečišćavanju ekstrakcijom na oktadecil čvrstoj fazi i kvantifikaciji primenom tečne hromatografije sa ultraljubičastom detekcijom, primenjiva za različite vrste proizvoda od jabuka.
 - Utvrđeno je da su karakteristike metode primerene za nameravanu upotrebu, odnosno da metoda ispunjava zakonske kriterijume za metode za analizu patulina u hrani: metoda je selektivna, limit kvantifikacije iznosi 1 µg/kg, prinosi u opsegu koncentracija od 5 do 20 µg/kg kreću se u rasponu od 56-92%, za koncentracije od 20-50 µg/kg 70-83%, a u oblasti koncentracija preko 50 µg/kg prinosi su 75-81%; preciznost izražena kao relativna standardna devijacija u celom opsegu od 5-100 µg/kg kreće se od 1,2-8,1%, a granica ponovljivosti od 0,5-6,9 µg/kg. Proširena merna nesigurnost metode iznosi 26,7%.

Time je potvrđena prva hipoteza istraživanja.

- Kvalitativno i kvantitativno su analizirani proizvodi od jabuka, koji reprezentuju tržište Republike Srbije u periodu od 2013-2015. godine.
 - Proizvodi od jabuka su analizirani na prisustvo i sadržaj patulina
- Prisustvo patulina je detektovano u 44% i 17% uzoraka sokova i kašica za odojčad i malu decu, sa maksimalnim koncentracijama od 8,3 i 7,7 µg/kg, redom. Udeo kontaminiranih uzoraka među sokovima za decu iznosio je 43%, sa najvišom koncentracijom patulina od 30,2 µg/kg. Patulin je detektovan u 51% sokova u porodičnom pakovanju, a prosečna koncentracija iznosila je 4,3 µg/kg. Sokovi od

jabuka namenjeni opštoj populaciji pokazali su značajno viši udeo kontaminiranih uzoraka (74% u odnosu na 28%), kao i viši prosečni sadržaj patulina (6,4 u odnosu na 2,1 µg/kg) u poređenju sa sokovima od mešanog voća. Primenom statističke analize ocenjeno je da odabrani faktori (vrsta voća, voćni sadržaj, konzistencija soka) nemaju dominantan uticaj na sadržaj patulina u analiziranim proizvodima od jabuka. Sa druge strane, ukazano je da cena proizvoda može biti značajan indikator prisustva patulina.

– Proizvodi od jabuka su analizirani na prisustvo i sadržaj ostataka pesticida

U hrani za odojčad i malu decu, ostaci pesticida su detektovani u 85% uzoraka iz domaće proizvodnje i 39% uzoraka iz uvoza. Od 49 pesticida obuhvaćenih analitičkom metodom, 15 je detektovano u bar jednom od uzoraka proizvedenih u Srbiji, a osam u uzorcima iz uvoza. Najčešće detektovani pesticidi u domaćim proizvodima su bili acetamiprid (80%) i karbendazim (70%), a među uvezenim proizvodima karbendazim (24%). Kao zabrinjavajući ističe se nalaz višestrukih ostataka pesticida u pojedinačnim uzorcima, sa 75% uzoraka iz domaće proizvodnje u kojima su detektovani ostaci tri ili više pesticida (maksimalno sedam), mada u niskim koncentracijama, dok ni u jednom od uvezenih uzoraka nisu nađeni ostaci više od dva pesticida. U grupama sokova namenjenih deci i sokova za opštu populaciju, ostaci pesticida detektovani su u 79% i 76% uzoraka, redom. Ostaci 15 pesticida su detektovani u bar jednom od uzoraka sokova, a 13 u uzorcima sokova sa cevčicom. Najveća učestalost detekcije utvrđena je za karbendazim (51% sokova i 55% sokova sa cevčicom), acetamiprid (34% i 52%) i pirimetanil (17% i 38%). Višestruki ostaci pesticida (tri ili više) nađeni su u 18% sokova i 38% sokova sa cevčicom (maksimalno pet i šest, redom), mada su izmerene koncentracije veoma niske.

– Proizvodi od jabuka su analizirani na prisustvo i sadržaj toksičnih metala

Analizom nije detektovano prisustvo olova, kadmijuma, žive ni arsena u ispitanim uzorcima hrane za odojčad i malu decu.

Time je druga hipoteza istraživanja potvrđena u delu očekivane visoke učestalosti pojave patulina i niskog nivoa kontaminacije proizvoda od jabuka, kao i odsustva toksičnih

metala. Međutim, u delu koji se odnosi na prisustvo ostataka pesticida u proizvodima od jabuka, druga hipoteza je delom opovrgnuta.

- Ocenjena je bezbednost proizvoda od jabuka na tržištu Republike Srbije

Svi uzorci hrane za odojčad i malu decu, kao i uzorci sokova namenjenih deci, ocenjeni su kao bezbedni u pogledu sadržaja patulina u odnosu na zakonske zahteve u Republici Srbiji. U grupi sokova namenjenih opštoj populaciji, 0,7% uzoraka sadržalo je patulin u koncentraciji iznad zakonske granice.

U hrani za odojčad i malu decu ostaci pesticida su bili prisutni u količinama ispod maksimalno dozvoljene, a u određenom broju slučajeva pri oceni je u obzir uzeta i proširena merna nesigurnost metode. Izuzetak je nalaz acetamiprida u jednoj kašici domaće proizvodnje, u kojoj je ovaj pesticid nađen u količini od 0,070 mg/kg, što uzorak čini neusaglašenim sa zakonskim normama. U određenom broju uzoraka detektovani su ostaci pesticida čija upotreba nije dozvoljena u Evropskoj uniji: u hrani za odojčad i malu decu detektovani su karbendazim i flusilazol u 70% i 5% domaćih uzoraka, odnosno u 23% i 2,9% uzoraka iz uvoza, redom; u grupi sokova u pakovanju sa cevčicom detektovani su karbendazim (55%), endosulfan (6,9%) i propoksir (3,4%), a u sokovima u porodičnom pakovanju karbendazim (51%), flusilazol (2,4%) i karbofuran (1,2%). Navedeni rezultati, kao i prisustvo višestrukih rezidua pesticida u velikom broju uzoraka iz domaće proizvodnje, ukazuju na potrebu za pojačanom kontrolom primene pesticida u poljoprivrednoj praksi, kao i kontrolom ostataka pesticida u proizvodnji (sirovine i gotovi proizvodi) i na tržištu.

Uzimajući u obzir limite kvantifikacije primenjene analitičke metode za analizu toksičnih metala, iz činjenice da ni u jednom od ispitanih uzoraka hrane za odojčad i malu decu nije detektovano prisustvo olova, kadmijuma, žive i arsena, proizilazi zaključak da su svi ispitani uzorci usaglašeni sa zakonskim normama, čime je potvrđen odgovarajući izbor sirovina i adekvatnost proizvodnog procesa.

Time je treća hipoteza istraživanja potvrđena u delu zadovoljenja zakonskih zahteva za proizvode od jabuka u pogledu prisustva patulina i toksičnih metala, ali je opovrgnuta u odnosu na bezbednost u pogledu prisustva ostataka pesticida.

- Procenjena je izloženost patulinu i sledstveni zdravstveni rizik za različite populacione grupe u Republici Srbiji

Procena rizika usled unosa patulina od strane odojčadi, dece, adolescenata i odrasle populacije u Republici Srbiji, sprovedena primenom determinističkog i probabilističkog pristupa, uključujući podatke o biodostupnosti patulina, pokazala je da je odnos između procenjenog dnevnog unosa i toksikološke referentne doze za patulin od 0,4 µg/kg telesne mase, koji se označava kao “*hazard quotient*”, najviši u populaciji dece, mada znatno ispod 1, što ukazuje na tolerantan nivo izloženosti i nepostojanje razloga za zabrinutost za zdravlje populacije. Za procenu rizika primenjena je naučno zasnovana metodologija, unapređena uključivanjem podataka o biodostupnosti patulina iz matriksa proizvoda od jabuka, što je omogućilo merodavnu karakterizaciju rizika koja može da podrži proces upravljanja rizikom.

Dobijeni rezultati su potvrdili četvrtu hipotezu istraživanja.

9. LITERATURA

1. Lawley R. *Patulin*. Food Safety Watch. 2013. Dostupno na: <http://www.foodsafetywatch.org/factsheets/patulin/> (pristupljeno 12.04.2017.)
2. Birkinshaw JH, Michael SE, Bracken A, Raistrick H. Patulin in the common cold collaborative research on a derivative of *Penicillium patulum* Bainier. II. Biochemistry and Chemistry. *Lancet*. 1943;245:625.
3. Puel O, Galtier P, Oswald IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins*. 2010;2:623-31.
4. Food and Drug Administration. Centre for Food Safety and Applied Nutrition. Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. Washington FDA: 2001 Sep [citirano 15.09.2016.]. Dostupno na: http://vm.cfsan.fda.gov/_dms/patubck2.html.
5. Majerus P, Kapp K. Assessment of dietary intake of patulin by the population of EU Member States. Report on tasks for scientific cooperation (SCOOP). Task 3.2.8. Directorate General Health and Consumer Protection. Germany. 2002. Dostupno na: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf (pristupljeno 14.09.2015.)
6. Maresca M, Yahi N, Younès-Sakr L, Boyron M, Caporiccio B, Fantini J. Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: Stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1 β effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;228:84-92.
7. Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, Lea TE. Characterization of *in vitro* effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicol Lett*. 2016a;250:47-56.
8. [IARC] International Agency for Research on Cancer. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1986:40:83-98.
9. [JECFA] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants: forty-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (WHO technical report series 859). Geneva: WHO, 1995.

10. Oteiza JM, Khaneghah AM, Campagnollo FB, Granato D, Mahmoudi MR, Sant'Ana AS, et al. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. *Food Sci Technol - Leb.* 2017;80:200-7.
11. Ministarstvo zdravlja RS. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, Sl. Glasnik RS 45/2010.
12. Ministarstvo poljoprivrede RS. Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama ostataka sredstava za zaštitu bilja u hrani i hrani za životinje i o hrani i hrani za životinje za koju se utvrđuju maksimalno dozvoljene količine ostataka sredstava za zaštitu bilja, Sl. Glasnik RS 29/2014.
13. Republički zavod za statistiku, Republika Srbija. Beograd. Dostupno na: <http://webrzs.stat.gov.rs/WebSite/Default.aspx> [pristupljeno 20.01.2017]
14. Ministarstvo poljoprivrede RS. Strategija poljoprivrede i ruralnog razvoja Republike Srbije (2014-2024). Beograd, 2013.
15. European Commission. Commission Recommendation on the prevention and reduction of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. *Off J Eur Union.* 2003;L203:54-9.
16. Jackson LS, Al-Taher F. Factors affecting mycotoxin production in fruits. In: Barkai-Golan R, Paster N, editors. *Mycotoxins in fruits and vegetables.* San Diego, CA: Academic Press; 2008. p. 75-104.
17. Forouzan S, Madadlou A. Incidence of patulin in apple juices produced in West Azerbaijan Province, Iran. *J Agric Sci Technol.* 2014;16:1613-22.
18. Ministarstvo poljoprivrede RS. Pravilnik o kvalitetu voćnih sokova, koncentrisanih voćnih sokova, voćnih sokova u prahu, voćnih nektara i srodnik proizvoda. Sl. Glasnik RS 27/2010 i 77/2011.
19. Iha MH, Sabino M. Incidence of patulin in Brazilian apple-based drinks. *Food Control.* 2008;19:417-22.
20. Harris KL, Bobe G, Bourquin LD. Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in Michigan. *J Food Prot.* 2009;72:1255-61.
21. Guo Y, Zhou Z, Yuan Y, Yue T. Survey of patulin in apple juice concentrates in Shaanxi (China) and its dietary intake. *Food Control.* 2013;34:570-3.

22. Zaied C, Abid S, Hlel W, Bacha H. Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. *Food Control*. 2013;31:263-7.
23. Lee TP, Sakai R, Manaf NA, Rodhi AM, Saad B. High performance liquid chromatography method for the determination of patulin and 5-hydroxymethylfurfural in fruit juices marketed in Malaysia. *Food Control*. 2014;38:142-9.
24. Spadaro D, Ciavarella A, Frati S, Garibaldi A, Gullino ML. Incidence and level of patulin contamination in pure and mixed apple juices marketed in Italy. *Food Control*. 2007;18:1098-02.
25. Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC-DAD and GC-MSD techniques. *Food Chem*. 2008;109:860-7.
26. Selmanoğlu G, Koçkaya EA. Investigation of the effects of patulin on thyroid and testis, and hormone levels in growing male rats. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:721-7.
27. Tachampa K, Takeda M, Khamdang S, Noshiro-Kofuji R, Tsuda M, Jariyawat S, et al. Interactions of organic anion transporters and organic cation transporters with mycotoxins. *J Pharmacol Sci*. 2008;106:435-43.
28. Speijers GJA. Patulin. In: Magan N, Olsen M, editors. *Mycotoxins in food-detection and control*. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd; 2004. p. 339-52.
29. Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, Fantini J. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181:209-18.
30. Liu BH, Wu TS, Yu FY, Su CC. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicol Sci*. 2007;95(2):340-7.
31. Pfeiffer E, Groß K, Metzler M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis*. 1998;19(7):1313-8.
32. Glaser N, Stopper H. Patulin: Mechanism of genotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:1796-801.
33. Schumacher DM, Müller C, Metzler M, Lehmann L. DNA–DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin. *Toxicol Lett*. 2006;166:268-75.

34. De Melo FT, De Oliveira IM, Greggio S, Dacosta JC, Guecheva TN, Saffi J, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:3548-55.
35. Marin ML, Murtha J, Dong W, Pestka JJ. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. *J Toxicol Environ Health.* 1996;48:379-96.
36. Koçkaya EA, Selmanoğlu G, Özsoy N, Gul N. Evaluation of patulin toxicity in the thymus of growing male rats. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60:411-8.
37. Marín S, Mateo EM, Sanchis V, Valle-Algarra FM, Ramos AJ, Jiménez M. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. *Food Chem.* 2011;124:563-8.
38. Gökmen V, Acar J. Long-term survey of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *Food Addit Contam.* 2000;17(11):933-6.
39. Cheraghali AM, Mohammadi HR, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, et al. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. *Food Control.* 2005;16:165-7.
40. Mhadhbi H, Bouzouita N, Martel A, Zarrouk H. Occurrence of mycotoxin patulin in apple-based products marketed in Tunisia. *J Food Prot.* 2007;70(11):2642-5.
41. Zouaoui N, Sbaili N, Bacha H, Abid-Essefi S. Occurrence of patulin in various fruit juice marketed in Tunisia. *Food Control.* 2015;51:356-60.
42. Yuan Y, Zhuang H, Zhang T, Liu J. Patulin content in apple products marketed in Northeast China. *Food Control.* 2010;21:1488-91.
43. Leblanc JC, Tard A, Volatier JL, Verger P. Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Addit Contam.* 2005;22(7):652-72.
44. González-Osnaya L, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit Contam.* 2007;24(11):1268-74.
45. Boonzaaijer G, Bobeldijk I, Van Osenbruggen WA. Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control.* 2005;16:587-91.
46. Cunha SC, Faria MA, Fernandes JO. Determination of patulin in apple and quince products by GC-MS using 13C5-7 patulin as internal standard. *Food Chem.* 2009;115:352-9.

47. Piemontese L, Solfrizzo M, Visconti A. Occurrence of patulin in conventional and organic fruit products in Italy and subsequent exposure assessment. *Food Addit Contam.* 2005;22(5):437-42.
48. Leggott NL, Shephard GS. Patulin in South African commercial apple products. *Food Control.* 2001;12:73-6.
49. Tangni EK, Theys R, Mignolet E, Maudoux M, Michelet JY, Larondelle Y. Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam.* 2003;20(5):482-9.
50. Vaclavikova M, Dzuman Z, Lacina O, Fenclova M, Veprikova Z, Zachariasova M, et al. Monitoring survey of patulin in a variety of fruit-based products using a sensitive UHPLC-MS/MS analytical procedure. *Food Control.* 2015;47:577-84.
51. Valle-Algarra FM, Mateo EM, Gimeno-Adelantado JV, Mateo-Castro R, Jiménez M. Optimization of clean-up procedure for patulin determination in apple juice and apple purées by liquid chromatography. *Talanta.* 2009;80:636-42.
52. Cano-Sancho G, Marin S, Ramos AJ, Sanchis V. Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake. *Food Addit Contam Part B.* 2009;2(1):59-65.
53. Piqué E, Vargas-Murga L, Gómez-Catalán J, De Lapuente J, Llobet JM. Occurrence of patulin in organic and conventional apple-based food marketed in Catalonia and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 2013;60:199-204.
54. Barreira MJ, Alvito PC, Almeida CMM. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem.* 2010;121:653-8.
55. Ritieni A. Patulin in Italian commercial apple products. *J Agric Food Chem.* 2003;51:6086-90.
56. Funes GJ, Resnik SL. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control.* 2009;20:277-80.
57. Zhou Y, Kong W, Li Y, Logrieco AF, Xu J, Yang M. A new solid-phase extraction and HPLC method for determination of patulin in apple products and hawthorn juice in China. *J Sep Sci.* 2012;35:641-9.

58. Katerere DR, Stockenström S, Shephard GS. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. *Food Control*. 2008;19:389-92.
59. Malir F, Ostry V, Grosse Y, Roubal T, Skarkova J, Ruprich J. Monitoring the mycotoxins in food and their biomarkers in the Czech Republic. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:513-8.
60. Beretta B, Gaiaschi A, Galli CL, Restani P. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam*. 2000;17(5):399-406.
61. Versari A, Parpinello GP, Mattioli AU. Survey of patulin contamination in Italian apple juices from organic and conventional agriculture. *J Food Technol*. 2007;5(2):143-6.
62. Bonerba E, Ceci E, Conte R, Tantillo G. Survey of the presence of patulin in fruit juices. *Food Addit Contam Part B*. 2010;3(2):114-9.
63. Katerere DR, Stockenström S, Thembo KM, Balducci G, Shephard GS. Investigation of patulin contamination in apple juice sold in retail outlets in Italy and South Africa. *Food Addit Contam*. 2007;24(6):630-4.
64. Baert K, De Meulenaer B, Kamala A, Kasase C, Devlieghere F. Occurrence of patulin in organic, conventional, and handcrafted apple juices marketed in Belgium. *J Food Prot*. 2006;69(6):1371-8.
65. Thuvander A, Möller T, Enghardt Barbieri H, Jansson A, Salomonsson AC, Olsen M. Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Addit Contam*. 2001;18(8):696-706.
66. Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, Hansen SH, Amézqueta S, Østergaard J. Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:2251-7.
67. Cunha SC, Faria MA, Pereira VL, Oliveira TM, Lima AC, Pinto E. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control*. 2014;44:185-190.
68. Murillo-Arbizu M, Amézqueta S, González-Peñas E, De Cerain AL. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chem*. 2009;113:420-3.

69. Víctor-Ortega MD, Lara FJ, García-Campaña AM, Del Olmo-Iruela M. Evaluation of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of patulin in apple juices using micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Control*. 2013;31:353-8.
70. Baert K, De Meulenaer B, Kasase C, Huyghebaert A, Ooghe W, Devlieghere F. Free and bound patulin in cloudy apple juice. *Food Chem*. 2007;100:1278-82.
71. Shephard GS, Van der Westhuizen L, Katerere DR, Herbst M, Pineiro M. Preliminary exposure assessment of deoxynivalenol and patulin in South Africa. *Mycotox Res*. 2010;26:181-5.
72. Yurdun T, Zehra Omurtag G, Ersoy Ö. Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey. *J Food Prot*. 2001;64(11):1851-3.
73. Aktaş AH, Yilmazer M, Demirci Ş. Determination of patulin in apple juice produced in Isparta, Turkey by HPLC with diode array detection. *J Food Drug Anal*. 2004;12(3):228-31.
74. Karimi G, Hassanzadeh M, Yazdanpanah H, Nazari F, Iranshahi M, Nili A. Contamination of patulin in clear apple juice in Mashhad, Iran. *J Food Saf*. 2008;28:413-21.
75. Jalali A, Khorasgani ZN, Goudarzi M, Khoshlesan N. HPLC determination of patulin in apple juice: a single center study of southwest area of Iran. *J Pharmacol Toxicol*. 2010;5(5):208-14.
76. Lashkarian EE, Lashgarian HE, Shahzamani K, Sepahvand A. Measurement of the Patulin toxicant using high performance liquid chromatography (HPLC) in apple juices supplied in Khorramabad City, Iran. *Int J Med Res Health Sci*. 2016;5(11):229-37.
77. Al-Hazmi NA. Determination of patulin and ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci*. 2010;17:353-9.
78. Saxena N, Dwivedi PD, Ansari KM, Das M. Patulin in apple juices: incidence and likely intake in an Indian population. *Food Addit Contam Part B*. 2008;1(2):140-6.
79. Li F, Zhao S, Chin L, Li Y, Wu D, Zhao X, et al. Determination of patulin in apple and hawthorn beverages by solid-phase filtration column and liquid chromatography. *J AOAC Int*. 2007;90(1):167-72.
80. Ji X, Li R, Yang H, Qi P, Xiao Y, Qian M. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China. *Food Control*. 2017;78:100-7.

81. Lai CL, Fuh YM, Shih DYC. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *J Food Drug Anal.* 2000;8(2):85-96.
82. Cho MS, Kim K, Seo E, Kassim N, Mtenga AB, Shim WB, et al. Occurrence of patulin in various fruit juices from South Korea: An Exposure Assessment. *Food Sci Biotechnol.* 2010;19(1):1-5.
83. Ito R, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Kawaguchi M, Nakazawa H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: investigation of its contamination levels in Japan. *J Agric Food Chem.* 2004;52:7464-8.
84. Watanabe M, Shimizu H. Detection of patulin in apple juices marketed in the Tohoku district, Japan. *J Food Prot.* 2005;68(3):610-2.
85. Sargenti SR, Almeida CAA. Determination of patulin in apple juice by HPLC using a simple and fast sample preparation method. *Eclet Quim.* 2010;35(2):15-21.
86. Legarda TM, Burdaspal PA. Patulin in apple-based products intended for young children marketed in Spain and other European countries, by using a method of analysis fit for its determination at levels lower than 10 µg/kg. *Alimentaria.* 2005;368:69-79.
87. Milićević D, Nedeljković-Trailović J, Mašić Z. Mikotoksini u lancu ishrane-analiza rizika i značaj za javno zdravlje. *Tehn mesa.* 2014;55(1):22-38.
88. Sant'Ana AS, Rosenthal A, Massaguer PR. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Res Int.* 2008;41:441–53.
89. Moake MM, Padilla-Zakour OI, Worobo RW. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety.* 2005;4(1):8-21.
90. Paster N. Means to prevent contamination with patulin in apple-derived produce and with ochratoxin A in wines. In: Barkai-Golan R, Paster N, editors. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables.* 1st ed. San Diego, CA, USA: Academic Press (Elsevier); 2008. p.351-86.
91. Aziz NH, Moussa LAA. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* 2002;13:281–8.
92. Funes GJ, Gómez PL, Resnik SL, Alzamora SM. Application of pulsed light to patulin reduction in McIlvaine buffer and apple products. *Food Control* 2013;30:405-10.

93. Maftai NA, Ramos-Villaruel AY, Nicolau AI, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R. Influence of processing parameters on the pulsed-light inactivation of *Penicillium expansum* in apple juice. *Food Control* 2014;41:27-31.
94. Reddy KRN, Spadaro D, Lore A, Gullino ML, Garibaldi A. Potential of patulin production by *Penicillium expansum* strains on various fruits. *Mycotox Res.* 2010;26:257–65.
95. Tabatabaie F, Mortazavi SA, Tabatabaee F, Ebadi AG. Reduction of patulin in apple juice after treatment with SO₂ and heat. *Indian J Sci Technol.* 2010;3:596-7.
96. Janotová L, Čížková H, Pivonka J, Voldrich M. Effect of processing of apple puree on patulin content. *Food Control* 2011;22:977-81.
97. Ismaiel AA, Tharwat NA. Antifungal activity of silver ion on ultrastructure and production of aflatoxin B1 and patulin by two mycotoxigenic strains, *Aspergillus flavus* OC1 and *Penicillium vulpinum* CM1. *J Mycol Med.* 2014;24:193-204.
98. Salas MP, Reynoso CM, Céliz G, Daz M, Resnik SL. Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination. *Food Res Int.* 2012;48:930–4.
99. Morales H, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V. Influence of post-harvest technologies applied during cold storage of apples in *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation: A review. *Food Control.* 2010;21:953–62.
100. Guo C, Yue T, Yuan Y, Wang Z, Guo Y, Wang L, et al. Biosorption of patulin from apple juice by caustic treated waste cider yeast biomass. *Food Control* 2013;32:99-104.
101. Cao J, Zhang H, Yang Q, Ren R. Efficacy of *Pichia caribbica* in controlling blue mold rot and patulin degradation in apples. *Int J Food Microbiol.* 2013;162:167–73.
102. Coelho AR, Celli MG, Ono EYS, Wosiacki G, Hoffmann FL, Pagnocca FC, et al. *Penicillium expansum* versus antagonist yeasts and patulin degradation *in vitro*. *Braz Arch Biol Techn.* 2007;50:725-33.
103. Hawar S, Vevers W, Karieb S, Ali BK, Billington R, Beal J. Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 2013;34:502-8.
104. Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1398–407.

105. Ricelli A, Baruzzi F, Solfrizzo M, Morea M, Fanizzi FP. Biotransformation of patulin by *Gluconobacter oxydans*. Appl Environ Microbiol. 2007;73:785-92.
106. Bevardi M, Frece J, Mesarek D, Bošnjir J, Mrvčić J, Delaš F, et al. Antifungal and antipatulin activity of *Gluconobacter oxydans* isolated from apple surface. Arh Hig Rada Toksikol. 2013;64:279-84.
107. Zhu R, Feussner K, Wu T, Yan F, Karlovsky P, Zheng X. Detoxification of mycotoxin patulin by the yeast *Rhodosporidium paludigenum*. Food Chem. 2015;179:1-5.
108. Lima G, Castoria R, Curtis F, Raiola A, Ritieni A, Cicco V. Integrated control of blue mould using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. Postharvest Biol Technol. 2011;60:164-72.
109. Silici S, Karaman K. Inhibitory Effect of Propolis on Patulin Production of *Penicillium expansum* in Apple Juice. J Food Process Pres. 2014;38(3):1129-34.
110. Russell R, Paterson M, Lima N. How will climate change affect mycotoxins in food? Food Res Int. 2010;43:1902–14.
111. Pires S, Lopes J, Nunes I, Gaspar E. Patulin analysis: sample preparation methodologies and chromatographic approaches. In: Barkai-Golan R, Paster N, editors. Mycotoxins in Fruits and Vegetables. 1st ed. San Diego, CA, USA: Academic Press (Elsevier); 2008. p.75-90.
112. Da Silva SJN, Schuch PZ, Bernardi CR, Vainstein MH, Jablonski A, Bender RJ. Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. Rev Bras Frutic. 2007;29(2):406-13.
113. Rahmani A, Jinap S, Soleimany F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Comprehensive Rev Food Sci Food Safety. 2009;8(3):202-51.
114. Malysheva SV, Diana Di Mavungu J, Boonen J, De Spiegeleer B, Goryacheva IY, Vanhaecke L, et al. Improved positive electrospray ionization of patulin by adduct formation: usefulness in liquid chromatography–tandem mass spectrometry multi-mycotoxin analysis. J Chromatogr A. 2012;1270:334-9.
115. Shephard GS, Leggott NL. Chromatographic determination of the mycotoxin patulin in fruit and fruit juices. J Chromatogr A. 2000;882:17-22.

116. Arranz I, Derbyshire M, Kroeger K, Mischke C, Stroka J, Anklam E. Liquid chromatographic method for quantification of patulin in 10 ng/ml in apple-based products intended for infants: Interlaboratory study. *J AOAC Int.* 2005;88:518-25.
117. [FAPAS] Food Analysis Performance Assessment Scheme. Proficiency testing report 1647, Patulin in apple juice. June-July 2012, The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK. 2012.
118. [FAPAS] Food Analysis Performance Assessment Scheme. Proficiency testing report 1656, Patulin in apple juice. June-August 2015, Fera Science Ltd (Fera), Sand Hutton, York YO41 1LZ, UK. 2015.
119. European Commission. Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off J Eur Union.* 2006;L70:12-34.
120. Nordtest. NT Technical Report: Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories. Nordtest. Norway: Nordic Innovation Centre, 2012.
121. Baert K, De Meulenaer B, Verdonck F, Huybrechts I, De Henauw S, Vanrolleghem PA et al. Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flanders. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:1745-51.
122. Arnér J. A risk assessment of patulin in home-made apple must. *Institutionen för mikrobiologi.* 2015;4, ISSN 1101-8151.
123. Juan C, Raiola A, Mañes J, Ritieni A. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control.* 2014;39:227-36.
124. Bonerba E, Conte R, Ceci E, Tantillo G. Assessment of dietary intake of patulin from baby foods. *J Food Sci.* 2010;75:T123-5.
125. Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, Amézqueta S. Comparison between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for the study of the occurrence of patulin in apple juice intended for infants. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:2429-34.
126. Hrvatska agencija za hranu. Znanstveno mišljenje o patulinu u sokovima od jabuka. 2017. Dostupno na: <https://www.hah.hr/wp-content/uploads/2015/10/Znanstveno-misljenje-o-patulinu-u-sokovima-od-jabuka.pdf>

127. Catană M, Catană L, Liliș G, Negoită M, Iorga E, Belc N, et al. Determination of patulin in apple juice. *Romanian J Food Sci.* 2011;1:65-9.
128. Oroian M, Amarici S, Gutt G. Patulin in apple juice from Romanian market. *Food Addit Contam Part B.* 2014;7:147-50.
129. Murillo M, González-Peñas E, Amézqueta S. Determination of patulin in commercial apple juice by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:57-64.
130. European Committee for Standardization. EN 15662: Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – QuEChERS-method. 2008.
131. SANCO. Document No. SANCO/12571/2013. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 2013.
132. Vuković G, Shtereva D, Bursić V, Mladenova R, Lazić S. Application of GC-MSD and LC-MS/MS for the determination of priority pesticides in baby foods in Serbian market. *Food Sci Technol - Leb.* 2012;49:312-9.
133. Radišić M, Grujić S, Vasiljević T, Laušević M. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2009;113:712-19.
134. Grujić S, Radišić M, Vasiljević T, Laušević M. Determination of carbendazim residues in fruit juices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam.* 2005;22(11):1132-7.
135. García-Reyes JF, Gilbert-López B, Molina-Díaz A. Determination of pesticide residues in fruit-based soft drinks. *Anal Chem.* 2008;80(23):8966-74.
136. Ferrer C, Martínez-Bueno MJ, Lozano A, Fernández-Alba AR. Pesticide residue analysis of fruit juices by LC–MS/MS direct injection. One year pilot survey. *Talanta.* 2011;83:1552-61.
137. Romero-González R, Garrido Frenich A, Martínez Vidal JL. Multiresidue method for fast determination of pesticides in fruit juices by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2008;76:211-25.

138. Albero B, Sánchez-Brunete C, Tadeo JL. Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J Agric Food Chem.* 2003;51:6915-21.
139. Paz M, Correia-Sá L, Becker H, Longhinotti E, Domingues VF, Delerue-Matos C. Validation of QuEChERS method for organochlorine pesticides analysis in tamarind (*Tamarindus indica*) products: Peel, fruit and commercial pulp. *Food Control.* 2015;54:374-82.
140. Topuz S, Özhan G, Alpertunga B. Simultaneous determination of various pesticides in fruit juices by HPLC-DAD. *Food Control.* 2005;16:87-92.
141. AliFarajzadeh MA, Feriduni B, Mogaddam MRA. Development of a new extraction method based on counter current salting-out homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction: Application for the extraction and preconcentration of widely used pesticides from fruit juices. *Talanta.* 2016;146:772-9.
142. Zhang Y, Zhang X, Jiao B. Determination of ten pyrethroids in various fruit juices: comparison of dispersive liquid-liquid microextraction sample preparation and QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chem.* 2014;159:367-73.
143. Tran K, Eide D, Nickols SM, Cromer MR, Sabaa-Srur A, Smith RE. Finding of pesticides in fashionable fruit juices by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food Chem.* 2012;134:2398-405.
144. Institut za standardizaciju Republike Srbije. SRPS EN 15763: Prehrambeni proizvodi – Određivanje elemenata u tragovima – Određivanje arsena, kadmijuma, žive i olova u prehrambenim proizvodima masenom spektrometrijom sa indukovano kuplovanom plazmom (ICP-MS) posle digestije pod pritiskom. 2012.
145. Cindrić Juranović I, Zeiner M, Kröppl M, Stinger G. Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices. *Microchem J.* 2011;99:364-9.
146. Coco FL, Monotti P, Cozzi F, Adami G. Determination of cadmium and lead in fruit juices by stripping chronopotentiometry and comparison of two sample pretreatment procedures. *Food Control.* 2006;17:966-70.

147. Magdas DA, Dehelean A, Puscas R. Isotopic and elemental determination in some Romanian apple fruit juices. *Sci World J.* 2012;1-7.
148. Tormen L, Torres DP, Dittert IM, Araújo RGO, Frescura VLA, Curtius AJ. Rapid assessment of metal contamination in commercial fruit juices by inductively coupled mass spectrometry after a simple dilution. *J Food Compost Anal.* 2011;24:95-102.
149. Tvermoes BE, Banducci AM, Devlin KD, Kerger BD, Abramson MM, Bebenek IG, et al. Screening level health risk assessment of selected metals in apple juice sold in the United States. *Food Chem Toxicol.* 2014;71:42-50.
150. Williams AB, Ayejuyo OO, Ogunyale AF. Trace metal levels in fruit juices and carbonated beverages in Nigeria. *Environ Monit Assess.* 2009;156:303-6.
151. Ackah M, Anim AK, Zakaria N, Osei J, Saah-Nyarko E, Gyamfi ET, et al. Determination of some heavy metal levels in soft drinks on the Ghanaian market using atomic absorption spectrometry method. *Environ Monit Assess.* 2014;186:8499-507.
152. Krejpcio Z, Sionkowski S, Bartela J. Safety of fresh fruits and juices available on the polish market as determined by heavy metal residues. *Pol J Environ Stud.* 2005;14(6):877-81.
153. Szymczycha-Madeja A, Welna M. Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. *Food Chem.* 2013;141:3466-72.
154. Hamurcu M, Özcan MM, Dursun N, Gezgin S. Mineral and heavy metal levels of some fruits grown at the roadsides. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:1767-70.
155. Froes RES, Neto WB, E Silva NOC, Naveira RLP, Nascentes CC, Da Silva JBB. Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim Acta B.* 2009;64:619-22.
156. Bragança VLC, Melnikov P, Zanoni LZ. Trace elements in fruit juices. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146:256-61.
157. Ajai AI, Ochigbo SS, Abdullahi Z, Anigboro PI. Determination of trace metals and essential minerals in selected fruit juices in Minna, Nigeria. *Int J Food Sci.* 2014;1-5.
158. Akpınar-Bayizit A. Analysis of mineral content in pomegranate juice by ICP-OES. *Asian J Chem.* 2010;22(8):6542-6.

159. Schiavo D, Neira JY, Nóbrega JA. Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2008;76:1113-8.
160. Cautela D, Santelli F, Boscaino F, Laratta B, Servillo L, Castaldo D. Elemental content and nutritional study of blood orange juice. *J Sci Food Agric*. 2009;89:2283-91.
161. Acar O. Determination of lead, copper, iron and zinc levels in fruit jams, nectars, juices and beverages by electrothermal and flame atomic absorption spectrometry. *Eurasian J Anal Chem*. 2011;6(2):114-28.
162. Tufuor JK, Bentum JK, Essumang DK, Koranteng -Addo JE. Analysis of heavy metals in citrus juice from the Abura-Asebu-Kwamankese District, Ghana. *J Chem Pharm Res*. 2011;3(2):397-402.
163. Anwar A, Mahmood T, Qamar- Ui- Haque, Khan MZ, Kiswar F, Perveen R, et al. Heavy metals in fruit juices in different packing material. *Fuuast J Biol*. 2014;4(2):191-4.
164. Harmankaya M, Gezgin S, Özcan MM. Comparative evaluation of some macro- and micro-element and heavy metal contents in commercial fruit juices. *Environ Monit Assess*. 2012;184:5415-20.
165. El-Hadri F, Morales-Rubio A, De la Guardia M. Determination of total arsenic in soft drinks by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Food Chem*. 2007;105:1195-200.
166. Pellerano RG, Mazza SS, Marigliano RA, Marchevsky EJ. Multielement analysis of Argentinean lemon juices by instrumental neutronic activation analysis and their classification according to geographical origin. *J Agric Food Chem*. 2008;56:5222-5.
167. European Commission. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union*. 2006;L364:5-24.
168. Sherif SO, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212:347-68.
169. Istraživanje zdravlja stanovnika Republike Srbije 2013. godina – Izveštaj. Beograd, Ipsos. 2014.

170. Republički zavod za statistiku, Republika Srbija. Anketa o potrošnji domaćinstva, 2013. Bilten 583. 2014.
171. Republički zavod za statistiku, Republika Srbija. Anketa o potrošnji domaćinstva, 2014. Bilten 611. 2015.
172. Republički zavod za statistiku, Republika Srbija. Anketa o potrošnji domaćinstva, 2015. Bilten 612. 2016.
173. Sijtsema SJ, Zimmermann K, Cvetković M, Stojanović Z, Spiroski I, Milošević J, et al. Consumption and perception of processed fruits in the Western Balkan region. *Food Sci Technol - Leb.* 2012;49:293-7.
174. European Food Safety Authority. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA J.* 2010;8(3):1557.
175. Torović Lj, Dimitrov N, Assunção R, Alvito P. Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Addit Contam Part A.* 2017;34:2023-32.
176. European Food Safety Authority. International frameworks dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA J.* 2013;11(7):3313.
177. Minekus M, Lminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.* 2014;5:1113–24.
178. Egger L, Ménard O, Delgado-Andrade C, Alvito P, Assunção R, Balance S, et al. The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action. *Food Res Int.* 2015;88:217–25.
179. Assunção R, Martins C, Dupont D, Alvito P. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: A contribution for Portuguese children risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 2016;96:205–14.
180. Torović Lj, Dimitrov N, Lopes A, Martins C, Alvito P, Assunção R. Patulin in fruit juices: occurrence, bioaccessibility, and risk assessment for Serbian population. *Food Addit Contam Part A.* 2018. Doi: 10.1080/19440049.2017.1419580

181. Versantvoort CHM, van de Kamp E, Rompelberg CJM. Development and applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. RIVM report 320102002/2004. 2004.
182. Assunção R, Ferreira M, Martins C, Diaz I, Padilla B, Dupont D, et al. Applicability of *in vitro* methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integrity. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77:983–92.
183. Hardy A, Benford D, Halldorsson T, Jeger MJ, Knutsen HK, More S, et al. Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. *EFSA J*. 2017;15(5):4849.
184. Brandon EFA, Baars AJ, Te Biesebeek JD, Blokland MH, Oomen AG, Bakker MI, et al. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children. *World Mycotoxin J*. 2012;5:391-403.