

PESTICIDI I MIKOTOKSINI U JEZGRI BAJAMA U EKOLOŠKIM UVJETIMA RAVNIH KOTARA – ORGANSKI UZGOJ

PESTICIDES AND MYCOTOXINS IN THE ALMOND KERNEL IN THE ECOLOGICAL CONDITIONS OF RAVNI KOTARI – THE CASE OF ORGANIC FARMING

A. Vrsaljko

SAŽETAK

Bajam se kao i drugi orašasti plodovi smatra izuzetno zdravom hranom. Stoga su u ekološkim uvjetima Ravnih kotara provedena istraživanja prisustva ostataka pesticida i mikotoksina u jezgrama bajama sorti Ferragnes, Ferraduela i sjemenjaku bajama. Istraživanja su provedena u 2022. godini, pri čemu su se koristile najosjetljivije metode analize. Korištenjem GC/MS/MS i LC/MS/MS analize na rezidue 402 pesticida, nije utvrđena prisutnost ni jednog pesticida ni u jednom uzorku. Glede mikotoksina, istraženi su ukupni aflatoksini i najopasniji aflatoksin AfB1 i ni u jednom uzorku nisu detektirani. Uz sve nutritivne, intrinzične i ine prednosti ovo je velika dodana vrijednost, budući su mikotoksini utvrđeni u najproizvodnijim zemljama i brojnim trgovinama diljem svijeta.

Dobiveni rezultati nam potvrđuju da se bajami bez opterećenja pesticidima i mikotoksinima mogu kategorizirati kao funkcionalna hrana, odnosno koristiti ih više, jer pojačavaju imunitet i preveniraju brojne bolesti kod ljudi. Istraživanja pridonose boljoj valorizaciji bajama proizvedenih u ekološkim uvjetima Ravnih kotara, cjenovnoj stimulaciji za proizvođače i zdravstvenoj dobrobiti za konzumente.

Ključne riječi: bajam, mikotoksini, pesticidi

ABSTRACT

Similar to other nuts, almond is considered to be extremely healthy. In this context, the research was conducted in the ecological conditions of the Ravni Kotari region on the presence of pesticide residues and mycotoxins in the seeds of the Ferragnes and Ferraduela almond varieties, as well as in the almond seedling. The study was done in 2022 and it used the most sensitive analytical

methods. Following the GC/MS/MS and LC/MS/MS analysis for 402 pesticide residues, the results showed that no pesticide was detected in any of the samples. As far as mycotoxins are concerned, the analysis was carried out for total aflatoxins and the most dangerous aflatoxin AfB1, none of which were ultimately detected in any sample. In addition to all the nutritional, intrinsic and other advantages, this represents a great added value, since mycotoxins have been found in the most productive countries and in numerous stores around the world.

The obtained results confirm that almonds can be categorized as functional food in the absence of pesticides and mycotoxins, i.e., the increased intake should be encouraged, since they strengthen immunity and prevent numerous diseases in humans. The research helps create better valorisation of almonds produced in the ecological conditions of Ravni Kotari region, at the same time benefiting manufacturers through price stimulation and consumers through the suggested health benefits.

Key words: Almond, pesticide, mycotoxines

UVOD / INTRODUCTION

Upotreba pesticida u poljoprivredi postala je neizbježna, no sve veća uporaba pesticida prijeti zdravlju okoliša, odnosno zdravlju ljudi i životinja kada su izravno izloženi (Lechenet, et al., 2017.). Pesticidi ulaze u tijelo različitim putevima, a najčešće oralnim unosom hrane i vode, udisanjem, odnosno apsorpcijom putem kože. Stupanj štetnog utjecaja izloženosti pesticidima ovisi o otrovnosti pesticida, trajanju izloženosti i količini (Hernandez, et al., 2013.). Dugotrajna izloženost pesticidima povezana je s bolestima, poput multiple skleroze i raka, kao i raznih drugih kroničnih stanja (Hernández, et al., 2011.). Nadalje, korišteni pesticid usložnjava situaciju jer sama toksičnost pesticida može biti puno gora zbog interakcija s drugim unesenim tvarima (Damalas and Koutroubas, 2016.). Stoga metode za analizu pesticida treba kontinuirano istraživati i razvijati radi osiguranja sigurnosti poljoprivrednih proizvoda. Jezgra bajama sadrži veliku količinu korisnih spojeva, uključujući polifenole, koji potpomažu imunitet i preveniraju određene bolesti, stoga su poželjni za konzumaciju. Konzumacija bajama djeluje protiv nekih tumora, a imaju i antioksidativno djelovanje protiv nekih specifičnih kroničnih stanja (Kim, et al., 2011.). Razni čimbenici, kao pH i sadržaj lipida, mogu utjecati na analizu ostataka pesticida. Na analizu također utječe matrični učinak pigmenta, kao što je pigment klorofil (González-Curbelo, et al., 2015.), stoga se voće treba

prethodno prikladno obraditi prije analize. Brojne globalne studije usmjerene su na razvoj daljnjih metoda za analizu multi rezidua pesticida simultanom primjenom GC/MS/MS i LC/MS/MS (Chamkasem, et al., 2013.). Plinska kromatografija (GC-MS/MS) se uglavnom koristi za analize jer povoljno minimizira interferenciju signala iz složene matrice uzorka (Zhang, et al., 2012.) i mogu se odvojiti visoko lipofilne tvari, kao što su klorotalonil i endosulfan (Chamkasem, et al., 2013.). Neki pesticidi imaju polarne komponente, a osim toga su termolabilni i teško ih je ispariti. Posljedično, tekuća kromatografija (LC-MS/MS) se koristi za takve pesticide jer ih je teško točno analizirati pomoću visoko temperaturne kod plinske kromatografije (Lee, et al., 2011.).

Mikotoksini su sekundarni metaboliti niske molekularne težine koje proizvode različite vrste gljiva, a egzistiraju na različitim poljoprivrednim kulturama. Konzumacija kontaminirane hrane mikotoksinima dovodi do štetnih učinaka na ljudsko zdravlje, poput kancerogenih, estrogenih, neurotoksičnih, hepatotoksičnih, teratogenih, pa čak i imunosupresivnih učinaka, što dodatno uzrokuje akutne ili kronične bolesti (Diaz, 2005.; Dellafiora and Dall'asta, 2017.; Kabak, Dobson and Var, 2006.; Agriopoulou, Stamatelopoulou and Varzakas, 2020.; Carballoa, et al., 2020.). Velika pozornost posvećena je gljivama koje proizvode aflatoksine, koje pripadaju vrstama *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* zbog njihove sposobnosti da rastu na različitim prehranbenim matricama (Gallo, et al., 2007.) i sintetiziraju aflatoksine, koji su jedni od najopasnijih mikotoksina (Sacco, et al., 2020.). Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer) smatra aflatoksin B1 (Afb1) najkancerogenijim spojem koji proizvode gljive (IARC, 2012.). Osobito su prehranbeni proizvodi koji se dugo čuvaju kao suho voće, kikiriki i ostali orašasti plodovi osjetljivi na kontaminaciju aflatoksinima (Eskola, et al., 2010; Habibipour, Tamandegani and Farmany, 2016.; Amiri, et al., 2013.; Knutsen, et al., 2018.; WHO, 2002.; Fasoyiro, et al., 2016.). Macri et al. (2020.) su istraživali razine mikotoksina u orašastim plodovima u marketima u Rumunjskoj i utvrdili da su najmanje razine u jezgri bajama (2.13 µg/kg), dok su najveće razine zabilježene kod pistacije (8.25 µg/kg). Slična istraživanja je proveo i Gürses (2005.) u Turskoj, te je kod bajama utvrđena prosječna razina u kontaminiranim uzorcima (7,4 µg/kg), u rasponu od 1 do 13 µg/kg.

U drugoj studiji provedenoj u Turskoj, AF su kvantificirani u 68 od 88 uzoraka bajama (77,3 %) i u razinama od 0,33–4 µg/kg (Garipoglu, 2006.). Schade i sur. (1975.) izvijestili su o pojavi ukupnog AF-a u 10 od 74 uzorka nesortiranih sirovih kalifornijskih bajama u ljusci (do 107 µg/kg) i 13 od 27 uzoraka bajama narezanih na kockice (do 119 µg/kg). U Japanu su Sugita-Konishi

i sur. (2010.) pokazali da su se AF pojavili u 6 od 24 uzorka bajama prikupljenih u lokalnim maloprodajnim trgovinama, s razinom od 1,06 µg/k. Kultivar je jedan od ključnih čimbenika učestalosti i količini AF-a. Kultivari s tvrdom ljuskom su obično otporniji na plijesni i nakupljanje AF-a. Lutfullah i Hussain (2011.) su pronašli AF u 30 % bajama konzumiranih u Pakistanu (do 2,13 µg/kg. Tijekom od 2002. – 2017. RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) izvijestio je o ukupno 7441 obavijesti o AF-ovima u kategorijama „orašasti plodovi, proizvodi od orašastih plodova i sjemenki“. Većina tih obavijesti odnosila se na pistacije (41,8 %), zatim na kikiriki (37,7 %), lješnjake (9,8 %) i bajame (4,9 %). Od toga su većina (78,8 %) obavijesti o AF-ovima u bajamima iz Sjedinjenih Država, Australija (8,2 %), Španjolske (3,8 %) i Irana (1,4 %).

Učestalost dojava predstavlja ozbiljnu socioekonomsku prijetnju za potrošače i proizvođače. Potrošači prilagođavaju svoje tržišne preferencije na temelju lošeg publiciteta u medijima, dok proizvođači i izvoznici paze da iskoriste svu dostupnu tehnologiju kako bi izbjegli kontaminaciju AF-om i spriječili bilo kakvo stvaranje AF-a tijekom skladištenja i otpreme kako urod ne bi premašio zakonska ograničenja.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi eventualne rezidue pesticida, odnosno razinu kontaminacije plijesni i stvaranje aflatoksina u jezgri bajama uzgojenih u ekološkim uvjetima Ravnih kotara.

MATERIJAL I METODE / *MATERIALS AND METHODS*

Voćnjak / *The orchard*

Uzorci jezgre bajama su uzeti iz bajamika starosti 12 godina, u punom rodu u kojem se provode potrebne agrotehničke mjere u skladu s načelima organskog poljodjelstva. Odabrane su dvije gospodarsko-biološki najvrijednije sorte Ferragnes i Ferraduel, cijepljene na podlozi GF677. Istovremeno je treći uzorak uzet sa stabala sjemenjaka bajama (tradicijski način uzgoja). Svi uzorci su pohranjeni na -4 °C.

Vrijeme i način uzimanja uzoraka / *Time and maner of sampling*

Istraživanja su provedena u 2022. godini. Uzimalo se pet uzoraka u istom terminu (neposredno pred berbu), a svaki uzorak s 10 stabala, što je ukupno 20 stabala u nasadu i s 10 stabala sjemenjaka (10 genotipova) neposredno uz nasad. Stabla su odabrana slučajnim odabirom. Uzorci su prirodno prosušeni i čuvani na temperaturi od - 20 °C do analize.

Analiza uzoraka / *Sample analysis*

Čuvani uzorci su pripremljeni za analitiku pesticida i mikotoksina (ukupni alfatoksini i alfatoksini B1) i stavljeni u analitičku proceduru.

Analiza pesticida / *Analysis of pesticides*

Kemikalije i reagensi. Ukupno je 402 ostatka pesticida korišteno kao standard za analizu. Mravlja kiselina (98 %) i amonijev format (99,995 %) uzeti su od Sigma– Aldrich, acetonitril, koji se koristi za ekstrakciju i pročišćavanje uzorka, Lichrosolv kao otapalo. QuEChERS pribor za ekstrakciju (magnezijev sulfat: 98,5–101,5 %; natrijev klorid: $\geq 99,5$ %; natrij citrat: 99,9 %; dinatrijev citrat seskvihidrat: 99 %) i 2 mL QuEChERS disperzivnog SPE (primarni sekundarni amin (PSA), oktadecisilan, magnezijev sulfat; 98,5–101,5 %) koristili su se za ifikaciju.

Metoda predobrade (priprema uzorka). Uzorci su prvo homogenizirani mljevenjem, i kao takvi su korišteni kao slijepi uzorci. Nakon vaganja 10 g usitnjenog uzorka, svakom izvaganom uzorku dodano je 10 mL acetonitrila. i mućkalo se 1 min. Nakon toga, 4 g bezvodnog magnezijevog sulfata, 1 g natrijevog klorida, 1 g natrijev citrat i 0,5 g dinatrijevog citrata seskvihidrata dodano je otopini uzorka, nakon čega je slijedilo snažno mućkanje 1 minutu pomoću rotacijske miješalice (DE/VIVA, Collomix). Naknadno, centrifugiranje je izvedeno 5 minuta na 3700 okretaja u minuti korištenjem 5920 R centrifuge (Eppendorf). Za LC- MS/MS analizu, centrifugirani supernatant je filtriran kroz filtar štrcaljke od 0,2 μm (Whatman, PTFE). Za GC-MS/MS analizu korišteno je 1 mL supernatanta 25 mg PSA i 150 mg MgSO_4 . Supernatant je stavljen u disperzivnu epruvetu napunjenu sa SPE i mućkano 1 minutu, nakon čega je centrifugirano na 12 000 okretaja u minuti 1 minutu i filtrirano kroz 0,2- μm filtar štrcaljke (Whatman, PTFE).

Priprema standardne otopine. Pojedinačne standardne otopine 402 ostatka pesticida pripremljene su u ACN-u u koncentraciji od 1000–10000 $\mu\text{g/L}$. Radne otopine (10-100 $\mu\text{g/L}$) pripremljene su razrjeđivanjem osnovne otopine. Standardna otopina kalibracije koja odgovara matrici pripremljena je miješanjem matrice usklađivanjem radne standardne otopine s dodatnim ekstraktom slijepog uzorka kako bi se postigla multi koncentracija spoja od 0,005–1 mg/L. Sve standardne otopine pohranjene su u staklenim bocama na -20 °C.

Analitički instrumenti. Instrument Triple Quad 4500 (AB Sciex) korišten je za LC-MS/MS analizu, a instrument GCMS-TQ8050 (Shimazu) korišten je za GC-MS/MS analizu. Validacija metoda provedena je prema smjernicama koje

je postavila Europska komisija (EC, 20127). Metode su validirane za linearnost, osjetljivost, selektivnost, točnost, preciznost, i mjernu nesigurnost.

Analiza mikotoksina / *Analisis mycotoxins*

Za određivanje aflatoksina B1 koristio se kit RomerLabsa “Aflstoxin B1 Assay” u rasponu koncentracija 2-50 µg/kg koji sadrži sve potrebne reagense i stanardarde za analizu aflatoksina. Ukupni aflatoksini određeni su pomoću kit RomerLabsa “Total Aflatoxin Assay u rasponu koncentracija 1-20 µg/kg koji sadrži sve potrebne reagense i stanardarde za analizu aflatoksina.

REZULTATI / *RESULTS*

Uzorci jezgri bajama podvrgnuti su najprije senzorskom ocjenjivanju, a nakon toga analitici na pesticide i mikotoksine.

Senzorska svojstva / *Properties of sensors*

Prije same analitike na rezidue pesticida i mikotoksina provedena su senzorska svojstva. Pri tome su uzete u obzir 3 osnovne senzorske karakteristike hrane: izgled, tekstura (konzistencija, viskozitet i dr.) i ukusnost (aroma). Povjerenstvo se sastojalo od 5 neovisnih i certificiranih/akreditiranih kušača. Glede izgleda povjerenstvo je konstatiralo za sva 3 uzorka da su jezgre bajama svojstvenog izgleda i boje za sorte i sjemenjake. Nadalje, kušanjem je potvrđeno da tekstura u potpunosti odgovara bajamu, a osjetila se i svježina. Budući je ukusnost kombinacija okusa i mirisa, to je izuzetno subjektivno svojstvo. Procjena ukusnosti odvijala se u 3 faze: procjena mirisa (prije nego što se uzorak unesen u usta), procjena ukusnosti u ustima (uzorak je u ustima) i procjena naknadnog okusa (osjećaj koji se javlja nakon što je uzorak progutan ili odstranjen iz usta). Jezgre bajama su bile intenzivnog mirisa i okusa s izvrsnom harmonijom mirisnih tvari, zaokruženom aromom koja se naročito osjetila nakon što su uzorci progutani.

Analiza pesticida / *Analisis pesticides*

Za analizu pesticida su korištene metode analize LC-MS/MS i GC-MS/MS provjerene za osjetljivost, linearnost, selektivnost, preciznost i točnost kako bi se potvrdila njihova učinkovitost za analizu ostataka pesticida u jezgrama bajama.

Metoda GC-MS/MS se koristila za ostatke 118 pesticida /
Method GC-MS/MS

Metodom plinske kromatografije su analizirani ostaci/rezidui 118 pesticida i nisu pronađeni niti u jednom od 15 uzoraka. Sve razine su bile ispod detekcije, odnosno manje od 0,01 mg/kg u jezgri bajama (Tablica 1.).

Tablica 1. Ostaci pesticida - GC-MS/MS analiza

Table 1 Pesticide residues - GC-MS/MS analysis

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Metoda
Svih 181 pesticida	mg/kg	<0,01	10	HRN EN 15662:2008

MDK- maksimalno dopuštena koncentracija

Analizom su obuhvaćeni ostatci slijedećih pesticida: 2,4-dimetilfenilormamid, Acefat, Akrinatrin, Aldrin, Azifos-metil, Benfluralina, Bifenoks, Bifentrin, Bromfenvinfos, Bromfenvinfos-metil, Bromofos, Bromofos-etil, Brompropilat, Bromukonazol, Bromukonazol-cis, Bromukonazol-trans, Cijanofenos, Cjanofos, Ciflutrin-cis, Cihalohop-butil, Cihalotrin, Lambde, Cinidon-etil, Cipermetrin-trans, Deltametrin, Demeton-s, Demeton-s-metil sulfon, Dialat-cis, Dialat-trans, Dieldrin, Difenilamin, Diklofop-metil, Dikloran, Diklorvos, Dikofol, Dinikonazol, Dinitramin, Dioksabenzofos, Disulfoton, Endosulfan alfa, Endosulfan beta, Endosulfan sulfat, Endrin, EPTC, Ensfulvalerat, Etakonazol-cis, Etakonazol-trans, Etalfluralin, Fenitrotrion, Fenklorfos, Fenpropatrin, Fenuron, Fulvalerat, Flumioksazin, Flusitrat-cis, Flusitrat-trans, Forat, Formotion, Furalaksil, HCH-zbroj, HCH alfa, HCH beta, HCH delta, Heksabrombenzen, Heksaklorbenzen, Heksaklorbutadien, Heptaklor, Heptaklor epoksid, Heptaklor epoksid – egzo, Heptenofos, Iprodion, Izodrin, Izofenfos, Karbiofention, Klorbenzid, Klorbenzilt, Klorbufam, Klorden, Klorfenapir, Klorfenprop-metil, Klorfenson, Klorfenvinfos, Klorpirifos-metil, Klorprofam, Kvintozen, Leptofos, Lindan, Mefenpir-dietil, Metakrifos, Metoksiklor-p,p' mireks, Monolinuron, Nikotin, Nitrofen, Oksifluorfen, Paration, Paration-metil, Pentakloranilin, Pentaklorbenzen, Pentanoklor, Permetrin-cis, Permetrin-trans, Petoksiamid, Procimidon, Propanil, Resmetrin-cis, Resmetrin-trans, Teflutrin-cis, Teknazen, Terbufos, Tetradifon, Tetrametrin-cis, Tetrametrin-trans, Tiometon, Tolklofos-metil, Tralometrin, Trialat, Trifluralin i Vinklozolin.

Rezultati pokazuju da se jezgre bajama proizvedene u ekološkim uvjetima ravnih kotara i organskoj proizvodnji u samom bajamiku, bez obzira na susjedne parcele koje nisu u organskoj proizvodnji mogu koristiti glede ovih pesticida, ne samo u hranitbi odraslih ljudi, već i u pripremi hrane za dojenčad, odnosno za osjetljive skupine kojima bajam potpomaže u pojačavanju imuniteta i prevenciji prema bolestima „modernog“ čovjeka.

Metoda LC-MS/MS se koristila za ostatke 284 pesticida / *Metod*

Metodom tekuće kromatografije su analizirani ostaci/rezidui 284 pesticida i nisu pronađeni niti u jednom od 15 uzoraka. Sve razine su bile ispod detekcije, odnosno manje od 0,01 mg/kg u jezgri bajama (Tablica 2).

Tablica 2. Ostaci pesticida po LC-MS/MS analizi

Table 2 Pesticide residues - GC-MS/MS analysis

Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Metoda
Svih 284 pesticida	mg/kg	<0,01	10	HRN EN 15662:2008

Analizom su obuhvaćeni ostatci slijedećih pesticida: Abamektin', Avermektin B1a, Abemektin B1b, Acetamiprid, Acetoklor, Acibenzolar-S-mentil, Aklonifen, Alaklor, Aldikarb, Aldikarb sulfoksid, Aldikarb sulfon, Aletrin, Ametrin, Amiokarb, Amitraz, Anilofos, Aramit, Atraton, Atrazin, Azakonazol, Azinfos-etil, Aziprotrin, Azoksistrobin, Benalaksil, Bendiokarb, Bifenazat, Bitertanol, Boskalid, Bromacil, Bupirimat, Buprofezin, Butilat, Butokarboksim, Butokarboksim sulfoksid, Butoksikarboksim, Butralin, Buturon, Cijanazin, Cijazofamid, Cikloat, Cikloksidim, Ciprodinil, Ciprokonazol, Demeton, Demeton-S-metil, Dezmetrin, Diafentiurin, Dialat, Dialifos, Diazinon, Difenamid, Difenokonazol, Difenzokvat-metil sulfat, Diklofention, Dikrotofos, Dimefoks, Dimefuron, Dimetenamid, Dimetoat (zbroy), Dimetoat, Ometoat, Dimetomorf, Dimoksisstrobin, Dipropetrin, Disulfoton sulfon, Disulfoton sulfoksid, Ditalimfos, Diuron, Edifenfos, EPN, Epoksikonazol, Etiofenkarb, Etion, Etofumezat, Etoksazol, Etoksisulfuron, Etoprofos, Etrimfos, Famfur, Fenamidon, Fenamifos, Fenamifos sulfoksid, Fenamifos sulfon, Fenarimol, Fenazakvin, Fenvukonazol, Fenbutatin oksid, Fenheksamid, Fenklorvos okson, Fenobukarb, Fenoksaprop-etil, Fenoksaprop-etil, Fenoksikarb, Fenpropidin, Fenpropidin, Fenpropimorf, Fensulfotjon, Fention, Fention sulfoksid, Fentoat, Flamprop-izopropil, Flamprop-metil, Flamprop-m-izopropil, Flzasulfuron, Fluazifrop-p-butyl, Flufenacet, Flufenoksuron, Fluometuron, Fluridon, Flurokloridon, Flurtamon, Flusilazol,

Flutriafol, Fonofos, Forat(zbroj), Forat sulfoksid, Forat sulfon, Fosalon, Fosfamidon, Fosfolan, Fosmet, Fostiazat, Furatiokarb, Haloksifop, Haloksifop-2-etoksietil, Haloksifop-metil, Heksakonazol, Heksazinon, Heksitiazokos, Imazalil, Imidaklopid, Indoksakarb, Iprobenfos, Iprovalikarb, Isazofos, Izoprokarb, Izoprotron, Kaduzafos, Karbaril, Karbendazin+benomil, Karbetamid, Karbofuran-3-OH, Karboksin, Karfentrazon-etil, Kletodim, Klimbazol, Klofentezin, Klomazon, Klorbromuron, Klorfenvinfos, Klorflurazuron, Klorfoksin, Klolidazon, Kloroksuron, Klorotoluron, Klorpirifos, Klorpirifos okson, Klorpirifos-metil okson, Klortiofos, Klotianidin, Krezoksim-metil, Kumafos, Kvinalfos, Kvinoksifen, Kvizalofop-etil, Lenacil, Linuron, Lufenuron, Malation(zbroj), Malokson, Malation, Mandipropamid, Mefosfolan, Mekarbam, Mepanipirin, Mepronil, Metabromuron, Metalaksil, Metamidofos, Metamidofos-m-metil, Metamitron, Metazaklor, Metidation, Metiokarb, Metiokarb sulfoksid, Metiokarb sulfon, Metobromuron, Metoksifenoimid, Metoksuron, Metolaklor, Metomil, Metribuzin, Metsulfuron-metil, Mevinfos, Miklobutanil, Molinat, Monokrotofos, N-(2,4-dimetilfenil)formamid, Napropamid, Neburon, Norflurazuron, Oksadiazon, Oksamil, Oksasulfuron, Paklobutrazol, Paraokson-etil, Paraokson-metil, Pebulat, Pencicuron, Pendimetalin, Penkonazol, Pikoksistrobin, Pikolinafen, Pimetrozin, Piperofos, Piraflufen-etil, Piraklostrobin, Pirazofos, Piridaben, Piridafention, Piridat, Pirimetanil, Pirimifos-etil, Pirimifos-metil, Pirimikarb, Piriproksifen, Potasan, Profam, Profenofos, Prokloraz, Promekarb, Prometon, Prometrin, Propaklor, Propazin, Propetamfos, Propikonazol, Propizamid, Propoksur, Prosulfuron, Protiofos, Rimsulfuron, Simazin, Simetrin, Spinosad, Spinozin A, Spinozin D, Spirodiklofen, Spiroksamin, Spiromezifen, Sulfosulfuron, Sulfotep, Sulprofos, Tebufenpirad, Tebukonazol, Tebupirimfos, Tebutiurin, TEPP-OO, TEPP-OS, Terbufos sulfoksid, Terbumeton, Terbutilazin, Terbutrin, Tetraklorvinfos, Tetrakonazol, Tiabendazol, Tiaklopid, Tiametoksam, Tifensulfuron-metil, Tiodikarb, Tiofanat-metil, Tiofanoks, Tiofanoks sulfoksid, Tionazin, Tralkoksidim, Triadimefon, Triadimenol, Triasulfuron, Triazofos, Tribufos, Trifloksistrobin, Triflumizol, Tritikonazol i Vamidation.

Rezultati LC-MS/MS analize pokazuju da jezgre bajama proizvedene u ekološkim uvjetima ravnih kotara i organskoj proizvodnji u samom bajamiku ne sadrže ostatke preostala 284 pesticida. Dakle, jezgre bajam su poželjne u hranidbi odraslih ljudi, kao i u pripremi hrane za dojenčad, odnosno za osjetljive skupine kojima bajam potpomaže u pojačavanju imuniteta i prevenciji prema raznim bolestima.

Analiza mikotoksina / *Analizir Mycotoxins*

Koncentracije ukupnih aflatoksina i AFB1 detektirane u uzorcima sorti Ferragnes i Ferraduel, odnosno sjemenjaka su bile ispod granice detekcije <0,5 µg/kg (Tablica 3). Nijedan od uzoraka nije imao koncentraciju višu od razina propisanih EU zakonodavstvom.

Tablica 3. Mikotoksini LC-MS/MS - razine mikotoksina u jezgri sorti Ferragnes, Ferraduel i sjemenjaka

Table 3 Mycotoxins LC-MS-MS – the levels of mycotoxins in the Ferragnes and Ferraduel almond kernels and seedlings

Ferragnes					
Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara	Metoda
*Ukupni aflatoksini	µg/kg	<0,5	10	da	RU-MET84
*Aflatoksini B	µg/kg	<0,5	8	da	RU-MET84
Ferraduel					
Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara	Metoda
*Ukupni aflatoksini	µg/kg	<0,5	10	da	RU-MET84
*Aflatoksini B	µg/kg	<0,5	8	da	RU-MET84
Sjemenjak					
Parametar	Jedinica mjere	Rezultat	MDK	Odgovara	Metoda
*Ukupni aflatoksini	µg/kg	<0,5	10	da	RU-MET84
*Aflatoksini B	µg/kg	<0,5	8	da	RU-MET84

Razvidno je da su svih 15 uzoraka glede mikotoksina ispod razine detekcije, te se jezgre bajama mogu nesmetano koristiti u hranidbi ljudi. Dapače, poželjno ih je koristiti za poboljšanje imuniteta i prevenciju nekih bolesti, kao i koristiti za pripremu hrane za dojenčad i osjetljive skupine.

RASPRAVA / *DISCUSSION*

Pesticidi su postali ozbiljna prijetnja zdravlju okoliša, ljudi i životinja (Lechenet, et al., 2017), dugotrajna izloženost dovodi do brojnih bolesti i kroničnih stanja (Hernandez, et al., 2011 i 2013), a posebice u interakciji s drugim tvarima iz okoliša (Damalas and Koutroubas, 2016). Budući se bajami smatraju izuzetno zdravom hranom s brojnim benefitima, u ovom se istraživanju pokazalo da jezgre bajama u ekološkim uvjetima Ravnih kotara ne

sadrže rezidue niti jednog od 402 testirana pesticida koja su dopuštena u poljodjelstvu. U istraživanju se koristila nova Europska direktiva (EURL-SRM, 2019), koja je dodatno snizila dopuštene razine pesticida. U Kaliforniji i drugim proizvodnim područjima se uočavaju povećane koncentracije pesticida, što našim bajamima daje dodatnu vrijednost, koju valja na ispravan način valorizirati.

Koncentracije ukupnih aflatoksina i AfB1 nisu dektirane u uzorcima sorti Ferragnes i Ferraduel, odnosno sjemenjaka, jer su ispod granice detekcije <0,5 µg/kg (Tablica 3) i ni jedan uzorak nije imao koncentraciju višu od razina propisanih EU zakonodavstvom. Brojna istraživanja (Eskola, et al., 2010; Habibipour, Tamandegani and Farmany, 2016; Amiri, et al., 2013; Knutsen, et al., 2018; WHO, 2002; Fasoyiro, et al., 2016) su provedena na temu mikotoksina. U uzorcima bajama u rumunjskoj (Macri et al. 2020), Turskoj (Gürses 2005; Garipoglu, 2006), Kaliforniji (Schade et al., 1975), Japanu (Sugita-Konishi et al., 2010), Pakistanu (Lutfullah and Hussain, 2011) i drugim zemljama (RASFF, 2017) su pronađene značajne razine aflatoksina u uzorcima bajama. Najviše uzoraka s prisustvom aflatoksina dolazi iz Kalifornije. Pri tome je posebno opasan AfB1, kao najotrovniji mikotoksin (IARC, 2012).

Pojava prisutnosti rezidua pesticida i mikotoksina predstavlja ozbiljnu socioekonomsku prijetnju za potrošače i proizvođače. Budući potrošači svoje tržišne preferencije temelju na medijima, s obzirom na čistoću naših bajama mora se marketinški i medijski promovirati bajame uzgojene u ekološkim uvjetima ravnih kotara kao zdravu i funkcionalnu hranu

ZAKLJUČAK / CONCLUSION

Ukratko, kontaminacija reziduima pesticida (402) i aflatoksinima nije detektirana u uzorcima jezgri bajama u niti jednom uzorku. Pri tome su korištene zadnje direktive EU. Temeljem rezultata, jezgre bajama proizvedene u ekološkim uvjetima Ravnih kotara, zadovoljavaju najviše nutritivne i zdravstvene kriterije. Stoga se mogu preporučiti kao funkcionalna hrana kod ljudi svih kategorija, a osobito kod ljudi sa zanimanjima gdje moraju biti 18 sati dnevno i 6 dana tjedno fizički i mentalno spremni.

LITERATURA

Agriopoulou S., Stamatelopoulou E., Varzakas T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*. 2020; 9:137. doi: 10.3390/foods9020137.

- Alshannaq A, Jae-Hyuk Y : Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health* 14.6 (2017.): 632. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Amiri M.J., Karami M., Sadeghi E. Determination of AFB1 in peanut, almond, walnut, and hazelnut in Kermanshah markets, Iran. *Int. J. Adv. Chem. Sci.* 2013; 6:1199–1202.
- Carballoa D., Tolosab J., Ferrerb E., Berradab H. Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. *Food Chem. Toxicol.* 2019; 128:8–20. doi: 10.1016/j.fct.2019.03.033
- Chamkasem, N.; Ollis, L. W.; Harmon, T.; Lee, S.; Mercer, G. Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61(10), 2315–2329. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf304191c>.
- Damalas, C. A.; Koutroubas, S. D. Farmers' Exposure to Pesticides: Toxicity Types and Ways of Prevention. *Toxics.* 2016, 4(1), 1. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxics4010001>.
- Dellafiora L., Dall'asta C. Forthcoming Challenges in Mycotoxins Toxicology Research for Safer Food—A Need for Multi-Omics Approach. *Toxins.* 2017; 9:18. doi: 10.3390/toxins9010018
- Diaz D. *The Mycotoxin Blue Book*. Nottingham University Press; Nottingham, UK: 2005. pp. 187–201.
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S. and Krska, R., 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), pp.2773-2789.
- European Commission. (2017). *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and F [EURL-SRM] European Union Reference Laboratory for Pesticides Requiring Single Residue Methods (2019) Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS Involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPPE-Method)*. Version 10. Fellbach, Germany: EURL-SRM

- Fasoyiro S., Hovingh R., Gourama H., Cutter C. Change in water activity and fungal counts of maize-pigeon pea flour during storage utilizing various packaging materials. *Procedia Eng.* 2016; 159:72–76.
doi: 10.1016/j.proeng.2016.08.066.
- Gallo A., Giuberti G., Frisvad G.C., Bertuzzi T., Nielsen K.N. Review on Mycotoxin Issues in Ruminants: Occurrence in Forages, Effects of Mycotoxin Ingestion on Health Status and Animal Performance and Practical Strategies to Counteract Their Negative Effects. *Toxins.* 2007; 7:3057.
doi: 10.3390/toxins7083057.
- Garipoglu, H. (2006). Research on the determination of aflatoxin content of some spices and dried fruits. (MSc Thesis). Institute of Natural and Applied Science, University of Trakya. p. 48.
- González-Curbelo, M. Á.; Socas-Rodríguez, B.; Herrera-Herrera, A. V.; González-Sálamo, J.; Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. Á. Evolution and Applications of the QuEChERS Method. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2015, 71, 169–185. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>.
- Gürses, M., 2006. Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (LEBLEBI) sold in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 9(3), pp.395-399.
- Habibipour R., Tamandegani P.R., Farmany A. Monitoring of aflatoxin G1, B1, G2, and B2 occurrence in some samples of walnut. *Environ. Monit. Assess.* 2016; 188:669. doi: 10.1007/s10661-016-5678-4.
- Hernández, A. F.; Gil, F.; Pla, A.; Gómez, A.; Lozano, D.; Parrón, T.; Requena, M., and Alarcón, R. Emerging Human Health Concerns from Chronic Exposure to Pesticide Mixtures. In *Toxicology Letters*, 205S, 2011; pp S2–S18 <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.020>
- Hernandez, A. F.; Parron, T.; Tsatsakis, A. M.; Requena, M.; Alarcon, R.; Lopez-Guarnido, O. Toxic Effects of Pesticide Mixtures at a Molecular Level: Their Relevance to Human Health. *Toxicology.* 2013, 307, 136–145. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009>.
- IARC. A Review of Human Carcinogens. International Agency for Research on Cancer; Lyon, France: 2012. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Chemical Agents and Related Occupations; pp. 224–248.

- Kabak B., Dobson A.D.W., Var I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2006; 46:593–619. doi: 10.1080/10408390500436185.
- Kim, J. S.; Ahn, J.; Lee, S. J.; Moon, B.; Ha, T. Y.; Kim, S. Phytochemicals and Antioxidant Activity of Fruits and Leaves of Paprika (*Capsicum Annuum* L., Var. Special) Cultivated in Korea. *J. Food Sci.* 2011, 76(2), C193–C198. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01891.x>.
- Knutsen H.K., Alexander J., Barregard L., Bignami M., Bruschweiler B., Ceccatelli S., Cottrill B., Dinovi M., Edler L., Grasl-Kraupp B., et al. Effect on public health of a possible increase of the maximum level for ‘aflatoxin total’ from 4 to 10 lg/kg in peanuts and processed products thereof, intended for direct human consumption or use as an ingredient in foodstuffs. *EFSA J.* 2018; 16: e05175. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5175
- Lechenet, M.; Dessaint, F.; Py, G.; Makowski, D.; Munier-Jolain, N. Reducing Pesticide Use while Preserving Crop Productivity and Profitability on Arable Farms. *Nature Plants.* 2017, 3(3), 17008. DOI: <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.8>.
- Lee, J.E., Jang, S.H., Hur, S.H., Bang, H.Y., Bae, I.K. and Kim, H.J., 2021. LC-MS/MS and GC-MS/MS cross-checking analysis method for 247 pesticide residues in sweet pepper (*Capsicum annuum*). *International Journal of Food Properties*, 24(1), pp.1758-1776.
- Lee, S. W.; Choi, J. H.; Cho, S. K.; Yu, H. A.; Abd El-Aty, A. M.; Shim, J. H. Development of a New QuEChERS Method Based on Dry Ice for the Determination of 168 Pesticides in Paprika Using Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2011, 1218(28), 4366–4377. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.021>.
- Lutfullah, G., & Hussain, A. (2011). Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*, 22, 426–429. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.09.015>
- Macri, A.M., Pop, I., Simeanu, D., Toma, D., Sandu, I., Pavel, L.L. and Mintas, O.S., 2020. The occurrence of aflatoxins in nuts and dry nuts packed in four different plastic packaging from the Romanian market. *Microorganisms*, 9(1), p.61.

- Sacco C., Donato R., Zanella B., Pini G., Pettini L., Marino M.F., Rookmin A.D., Marvasi M. Mycotoxins and flours: Effect of type of crop, organic production, packaging type on the recovery of fungal genus and mycotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 2020; 334:108808.
doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108808.
- Schade, J.E., McGreevy, K., King Jr, A.D., Mackey, B. and Fuller, G., 1975. In Sugita-Konishi, Y., Sato, T., Saito, S., Nakajima, M., Tabata, S., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Kai, S., Sugiyama, K. and Kamata, Y., 2010. Exposure to aflatoxins in Japan: risk assessment for aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants*, 27(3), pp.365-372.
- World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. IARC Press; Lyon, France: 2002. pp. 275–288.
- Zhang, F.; Yu, C.; Wang, W.; Fan, R.; Zhang, Z.; Guo, Y. Rapid Simultaneous Screening and Identification of Multiple Pesticide Residues in Vegetables. *Anal. Chim. Acta.* 2012, 757, 39–47.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.048>

Adresa autora - Author's address:

Dr. sc. Anđelko Vrsaljko

e-mail: avrsalj@unizd.hr

Sveučilište u Zadru, Odjel za izobrazbu učitelja i odgojitelja,

Franje Tuđmana, 24i, 23000 Zadar

