

CONTRIBUȚII LA STUDIUL ÎMBUNĂȚĂȚIRII INDICATORILOR DE CALITATE AI MIERII DE ALBINE UTILIZÂND TEHNICI DE MODELARE MATEMATICĂ

Teză destinată obținerii
titlului științific de doctor inginer
la
Universitatea "Politehnica" din Timișoara
în domeniul INGINERIE CHIMICĂ
de către

Ing. Monica Cristina Cara

Conducător științific:
Referenți științifici:

Prof.univ.dr.ing. Delia Maria Perju
Prof.univ.Em.dr.ing. Gheorghiza Jinescu
Prof.univ.dr.ing. Lucian-Mircea Rusnac
Prof.univ.dr.ing. Adrian Riviș

Ziua susținerii tezei: 27.11.2012

Seriile Teze de doctorat ale UPT sunt:

- | | |
|---|--|
| 1. Automatică | 8. Inginerie Industrială |
| 2. Chimie | 9. Inginerie Mecanică |
| 3. Energetică | 10. Știința Calculatoarelor |
| 4. Ingineria Chimică | 11. Știința și Ingineria Materialelor |
| 5. Inginerie Civilă | 12. Ingineria sistemelor |
| 6. Inginerie Electrică | 13. Inginerie energetică |
| 7. Inginerie Electronică și Telecomunicații | 14. Calculatoare și tehnologia informației |

Universitatea „Politehnica” din Timișoara a inițiat seriile de mai sus în scopul diseminării expertizei, cunoștințelor și rezultatelor cercetărilor întreprinse în cadrul școlii doctorale a universității. Seriile conțin, potrivit H.B.Ex.S Nr. 14 / 14.07.2006, tezele de doctorat susținute în universitate începând cu 1 octombrie 2006.

Copyright © Editura Politehnica – Timișoara, 2012

Această publicație este supusă prevederilor legii dreptului de autor. Multiplicarea acestei publicații, în mod integral sau în parte, traducerea, tipărirea, reutilizarea ilustrațiilor, expunerea, radiodifuzarea, reproducerea pe microfilme sau în orice altă formă este permisă numai cu respectarea prevederilor Legii române a dreptului de autor în vigoare și permisiunea pentru utilizare obținută în scris din partea Universității „Politehnica” din Timișoara. Toate încălcările acestor drepturi vor fi penalizate potrivit Legii române a drepturilor de autor.

România, 300159 Timișoara, Bd. Republicii 9,
tel. 0256 403823, fax. 0256 403221
e-mail: editura@edipol.upt.ro

Cuvânt înainte

Această lucrare a fost elaborată în decursul activităților mele desfășurate în cadrul pregătirii tezei de doctorat la Facultatea de Chimie Industrială și Ingineria Mediului a Universității „Politehnica” din Timișoara, sub conducerea științifică a Prof.univ.dr.ing. Delia Maria PERJU.

Îmbunătățirea calității produselor alimentare reprezintă o problemă deosebit de importantă în condițiile unei economii moderne. Comunitatea Europeană impune prin norme importante realizarea unor produse de calitate superioară și cu proprietăți senzoriale care să satisfacă exigențele consumatorilor. Pentru realizarea acestora este necesar ca specialiștii din industria alimentară să cunoască toate pârgurile prin care pot acționa în scopul îmbunătățirii calității produselor. Calitatea unui produs alimentar reprezintă o problemă complexă, de care depinde acceptarea sau respingerea lui de către consumator.

Deoarece la ora actuală problemele legate de poluarea mierii de albine cu antibiotice sunt din ce în ce mai frecvente, iar instituțiile de control în domeniul alimentației publice nu beneficiază și nu folosesc modele matematice în activitatea lor de monitorizare a concentrațiilor de antibiotice din miere, în acest context, în vederea verificării siguranței produsului și respectiv a conformității alimentului cu criteriile de siguranță prevăzute de legislația în vigoare, studiile întreprinse în cadrul tezei de doctorat sunt de un real interes practic pentru producătorii de miere de albine și pentru organele de control.

Mulțumiri deosebite și profundă recunoștință se cuvin adresate conducătorului științific prof.univ.dr.ing. Delia Maria PERJU pentru îndrumarea competentă și susținerea constantă, cu profesionalism, pe tot parcursul elaborării acestei teze de doctorat.

Îmi exprim întreaga considerație față de membrii comisiei de doctorat, domnul președinte al comisiei Prof.univ.dr.ing. Nicolae Vaszilcsin, Universitatea „Politehnica” din Timișoara, doamnei Prof.univ.Em.dr.ing. Gheorghiza Jinescu de la Universitatea „Politehnica” București, Prof.univ.dr.ing. Lucian-Mircea Rusnac de la Universitatea „Politehnica” din Timișoara și domnului Prof.univ.dr.ing. Adrian Riviș de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, care au răspuns solicitării de a face parte din comisia pentru susținerea publică a tezei de doctorat și pentru timpul acordat analizei lucrării.

De asemenea, doresc să aduc mulțumiri conducerii laboratorului D.S.V.S.A. Timiș pentru sprijinul moral și științific acordat pe parcursul întregii perioade de doctorat.

Nu în ultimul rând, mulțumesc întregii mele familii, logodnicului meu Cătălin, duhovnicului, doamnei șef.lucrări dr.ing. Gabriela-Alina Dumitrel, doamnei ing. Mirabela Panfiloiu și prietenilor mei, pentru încurajarea, sfaturile și dăruirea cu care m-au susținut.

Timișoara, noiembrie 2012

Monica Cristina Cara

Părinților mei

Cara, Monica Cristina

Contribuții la studiul îmbunătățirii indicatorilor de calitate ai mierii de albine utilizând tehnici de modelare matematică

Teze de doctorat ale UPT, Seria 4, Nr. 62, Editura Politehnica, 2012, 182 pagini, 91 figuri, 49 tabele.

ISSN: 1842-8223

ISBN: 978-606-554-559-5

Cuvinte cheie: miere, tetraciclină, streptomycină, modelare matematică, indicatori de calitate

Rezumat,

Prin subiectul abordat, teza de doctorat răspunde unor probleme de actualitate legate de calitatea mierii de albine din perspectiva cerințelor Uniunii Europene privind asigurarea sănătății consumatorului.

Cercetările și studiile efectuate se referă la metodele și mijloacele de testare a calității mierii de albine, care joacă un rol important atât în ceea ce privește valorificarea acesteia ca și produs propriu-zis, dar și ca materie primă în industria alimentară și farmaceutică. Îmbunătățirea calității mierii, presupune cunoașterea factorilor care o pot polua și metodele de testare pentru identificarea lor în vederea eliminării.

Lucrarea evidențiază o evaluare a principalelor aspecte care au stat la baza cercetărilor experimentale și a contribuțiilor aduse în domeniu, precum și apelează la o abordare sistemică a problemelor legate de calitatea mierii de albine, prin elaborarea și utilizarea modelelor matematice.

Tema este tratată în mod interdisciplinar, îmbinând aspecte din diferite domenii: inginerie chimică, teoria sistemelor, chimie, modelare matematică și simulare numerică, matematică (metode de calcul, ecuații de regresie), statistică, informatică (Matlab, Excel), legislație privind domeniul apicol, etc.

CUPRINS

INTRODUCERE	7
OBIECTIVELE GENERALE ALE LUCRĂRII	11
1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU	12
1.1. Istoricul mierii	12
1.2. Istoria apiculturii în România	12
1.3. Albinele	13
1.3.1. Albinele și flora	13
1.3.2. Viața în stup	14
1.3.3. Principale rase de albine	14
1.3.4. Bolile albinelor	15
1.4. Mierea – produs final	16
1.4.1. Mierea și produsele ei	16
1.4.1.1. Polenul	16
1.4.1.2. Ceara	16
1.4.1.3. Apilarnil	18
1.4.1.4. Pastura	19
1.4.1.5. Propolis	19
1.4.1.6. Lăptișor de matcă	20
1.4.1.7. Veninul	21
1.4.2. Clasificarea mierii	25
1.4.3. Tipuri de miere	25
1.4.4. Mierea și beneficiile ei terapeutice	32
1.4.5. Proprietățile mierii	33
1.4.5.1. Proprietăți fizice ale mierii	33
1.4.5.2. Proprietăți chimice	33
1.4.6. Tehnologia recoltării și extracției mierii	35
1.4.6.1. Modul de execuție	35
1.4.6.2. Echipamente folosite în apicultură la extracția mierii	37
1.4.6.3. Transformări ale mierii	38
1.5. Sinteza principalelor legi, hotărâri și reglementări naționale și internaționale privind domeniul apiculturii	39
1.6. Indicatori de calitate a mierii	42
1.6.1. Calitatea organoleptică	42
1.6.2. Calitatea fizico – chimică	43
1.6.3. Calitatea igienică	43
1.6.4. Defectele și falsificarea mierii	48
1.6.5. Metode de examinare și analiză a mierii	49
1.6.6. Metode uzuale de depistare a mierii falsificate	52
1.7. Generalități asupra tehnicilor de modelare și simulare numerică	55
1.7.1. Considerații generale	55
1.7.2. Modele statistice	58
1.7.2.1. Elementele matematice ale modelării statistice	58
1.7.3. Noțiuni generale de simulare numerică	63

2.	STUDII EXPERIMENTALE	65
2.1.	Obiectivele părții experimentale	69
2.2.	Direcțiile de cercetare abordate	70
2.2.1.	Tehnica de abordare a cercetărilor experimentale	70
2.2.2.	Metode experimentale, materiale de lucru, echipamente și aparatură	71
2.3.	Studii efectuate în cadrul direcțiilor de cercetare propuse	78
2.3.A	Determinarea gradului de poluare cu reziduuri de tetraciclină și streptomycină în raport cu zona geografică	78
2.3.B	Monitorizarea conținutului de reziduuri de antibiotice prin determinarea concentrației de tetraciclină și streptomycină din trei sorturi de miere în județul Timiș	98
2.3.C	Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de tetraciclină în mierea de albine în funcție de timp și în funcție de sortul de miere	114
2.3.D	Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de streptomycină în mierea de albine în funcție de timp și de temperatură	131
2.3.E	Studiul comparativ al metodelor de detectare screening, respectiv de confirmare a concentrației reziduurilor de streptomycină din mierea de albine	137
2.3.F	Stabilitatea concentrației reziduurilor de tetraciclină și streptomycină în trei sorturi de miere în condiții diferite de temperatură	153
3.	CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE	167
4.	BIBLIOGRAFIE	173

INTRODUCERE

În decursul secolelor, hrana omului a devenit tot mai variată, iar modul de pregătire și de păstrare a alimentelor tot mai complexi.

Dezvoltarea științelor a condus la o înțelegere aprofundată a nutriției, căutându-se legi, principii sau reguli care să stea la baza unei alimentații optime pentru organismul uman. O hrană echilibrată, bogată în factori nutritivi, precum proteine, lipide, glucide, vitamine, minerale sau săruri, reprezintă un mijloc important pentru păstrarea sănătății.

Deoarece, procesele vitale ale organismului se efectuează cu consum de energie, rația alimentară trebuie armonizată permanent, calitativ și cantitativ, cu toate nevoile energetice. În funcție de vârstă, sex sau activitatea zilnică desfășurată energia consumată de organism diferă.

Mierea se numără printre cele mai vechi alimente ale umanității, utilizarea mierii de către om datând din timpurile cele mai îndepărtate. Acest veritabil aliment-medicament se bucură și astăzi de apreciere unanimă în toate colțurile lumii, fiind un simbol al vieții și sănătății.

Faptul că mierea este strâns legată de viața omului de mai bine de 10 000 de ani se regăsește în atestările numeroaselor vestigii arheologice ce datează din mezolitic, sau în multe dintre documentele istorice ale marilor civilizații antice, de la cea egipteană și cea sumeriană la civilizația chineză, greacă sau romană.

Deși, mierea a fost folosită timp de mii de ani ca și aliment, ea și-a dovedit din plin calitățile terapeutice. Nu există cultură în care să nu fi apărut date legate de binefacerile pe care ea o oferă consumatorilor. Mierea are o putere de îndulcire mai mare decât zahărul, fiind însă mai săracă în calorii.

Zaharurile sunt o componentă fundamentală pentru energia necesară organismului, fiind foarte ușor asimilate de celule. Toți carbohidrații, fie sub formă de zaharuri simple, fie sub formă de carbohidrați complecși, sunt dizolvați și transformați în glucoză care este apoi folosită de către organism. Glucoza și fructoza sunt principalele zaharuri existente în miere care stau la baza importanței sale acțiuni dinamogenice, de sporire a forței și a energiei. Este de asemenea un bun stimulent pentru inimă, ceea ce explică de ce este atât de căutată de către sportivi și, în general, de persoanele care trebuie să facă față la efort. În cantități mai mici mai apare și maltoza, zaharoza și alte polizaharide. O miere bogată în glucoză, se cristalizează, iar în cazul în care conținutul de fructoză este mai mare aceasta rămâne fluidă.

Pentru a beneficia de această sursă de energie naturală, ea trebuie integrată în dieta zilnică, pe post de îndulcitor.

Numeroase studii arată că acest amestec unic de zaharuri oferă o combinație de beneficii nutriționale care ajută la prevenirea oboselii, îmbunătățește performanțele sportivilor, previne apariția cariilor dentare, este indicată în alimentația dietetică a copiilor, în tratamentul bronșitelor cronice, alergice, în tratamentul artrozelor reactive, pentru afecțiuni cardiace, reumatismale și digestive, pentru afecțiuni ale ficatului sau ale căilor respiratorii, pentru tratarea insomniilor și a senilității. De asemenea, mierea conține multe minerale, vitamine, antioxidanți, aminoacizi și numeroase enzime. Conținutul în vitamina B6, tiamină, riboflavină și

acid pantotenic, împreună cu minerale esențiale ca fierul, calciul, cuprul, magneziul, manganul, fosforul, potasiul, sodiul și zincul fac din miere un aliment-minune. Pinocembrina este un antioxidant care se găsește doar în miere.

Mierea era folosită încă pe vremea vechilor egipteni pentru a trata o varietate de probleme medicale, de la răni, arsuri până la zgârieturi și cangrene, fiind folosită în prezent din ce în ce mai des datorită proprietăților ei cicatrizante cu efect antimicrobian. Proprietățile sale antiseptice și antibiotice, conferă o mare forță antibacteriană.

Mierea ajută la asimilarea calciului și la retenția magneziului, două minerale esențiale pentru buna funcționare a organismului, ceea ce explică de ce copii care primesc constant miere în alimentație se dezvoltă mult mai bine decât cei care primesc zahăr [1].

Datorită virtuților sale diuretice are acțiune benefică și asupra sistemului digestiv. Combate constipația, fiind de asemenea eficientă în tratarea unor afecțiuni stomacale și intestinale.

În plus, mierea este doar o parte a unui complex de produse ale stupului, pentru menținerea sănătății, fosindu-se pe larg și polenul, propolisul, ceara, lăptișorul de matcă, veninul.

Polenul, pe care albinele lucrătoare îl folosesc ca să hrănească stupul, este recomandat pentru combaterea oboselii fizice și intelectuale, în tratarea rinitei alergice, în tratarea colitelor și a constipațiilor.

Lăptișorul de matcă este o substanță gelatinoasă, foarte dulce reprezentând hrana reginei și a larvelor din colonie în primele trei zile de viață. Compus din glucide, apă și lipide, extrem de bogat în vitamina B5 și în oligoelemente, lăptișorul de matcă este considerat un adevărat elixir al tinereții, care acționează asemenea unui super-catalizator, cunoscut pentru proprietățile sale revitalizante, stimulante și reechilibrante. Stimulează producția de collagen din piele, estompează și elimină ridurile, contribuind la regenerarea țesutului epitelial. Regina, care se hrănește exclusiv cu lăptișor de matcă, are o durată de viață de până la patruzeci de ori mai mare decât celelalte albine.

Propolisul este un antibiotic, un antiseptic și un fungicid imbatabil.

Medicina valorifică proprietățile antimicrobiene, cicatrizante și antiinflamatorii ale propolisului, folosindu-l pentru prevenirea dezvoltării bacteriilor, fiind recomandat pentru imunodeficiența organismului rezultată în urma diferitelor afecțiuni. Prezintă de asemenea un puternic efect protector pe perioadele cu risc mărit de răceală, calmând iritațiile gâtului și ale cavității bucale.

Dintre toate produsele stupului, propolisul, mierea și lăptișorul de matcă, sunt cele mai folosite ingrediente naturale în cosmetica bio. Purificator, hrănitor, calmant și hidratant, propolisul se regăsește în măști și creme pentru față, loțiuni, săpunuri și diverse produse destinate îngrijirii corporale.

Controlul calității mierii de albine se face pe loturi formate din miere de același sortiment și de aceeași clasă de calitate. Mai întâi se face un examen organoleptic (gust, culoare, miros) specific pentru fiecare sortiment de miere în parte, după care se determină prin analize fizico-chimice:

- » conținutul în apă
- » conținutul în zaharoză și fructoză;
- » conținutul reziduurilor (antibiotice, pesticide);
- » sortimentul, prin analiza polenului cu ajutorul microscopului electronic.
- » dozarea hidroximetilfurfurolului (HMF-ul) pentru fiecare lot de miere cu ajutorul spectofotometrului. În România limita maximă admisă pentru conținutul de HMF în miere este de maxim 1,5 mg/100g produs (STAS 784-2-89).

Astfel valoarea HMF este:

- maximum 4 mg/100g produs pentru mierea naturală de calitate acceptabilă;
- maximum 10 mg/100g produs pentru mierea naturală, dar degradată ca urmare a tratamentului termic defectuos;
- peste 10 mg/100g produs pentru mierea falsificată cu zahăr invertit artificial.

Calitatea igienică a produselor apicole se urmărește prin analizele microbiologice. Ca origine, microorganismele din miere provin din nectar și polen, din sălile de lucru, de pe aparatele utilizate sau de la ambalaje.

Drojdii prezente în miere produc defecte de natură microbiologică, fiind reprezentate mai ales de *Saccharomyces melis* și *Saccharomyces rosei*.

Fungii filamentosi provin din contaminare cu praf, din apa de spălare a instalațiilor sau a recipientelor și de la albine. Ajungând în miere, în stare vegetativă sunt capabili să metabolizeze glucidele, aminoacizii și chiar polenul ducând la diverse modificări organoleptice, precum gust și miros de mucegai.

Evoluția noilor metode de analiză și a echipamentelor de laborator de înaltă performanță, a determinat Uniunea Europeană și comisiile internaționale de specialitate ale F.A.O., O.M.S., Codex Alimentarius și Comisia pentru Alimentație, să impună noi condiții de garanție a produselor alimentare, ceea ce presupune respectarea unor cerințe foarte stricte de calitate.

Contextul esențial al lucrării este legat direct de problemele actuale privind analiza calității mierii de albine de pe piața românească.

Îmbunătățirea calității produselor reprezintă o problemă deosebit de importantă în condițiile economiei moderne.

Calitatea produselor alimentare este impusă de Comunitatea Europeană prin norme importante privind realizarea unor produse alimentare de calitate superioară și cu proprietăți senzoriale care să satisfacă exigențele consumatorilor. Pentru realizarea acestora este necesar ca specialiștii din industria alimentară să cunoască toate pârghiile prin care pot acționa în scopul îmbunătățirii calității produselor.

Calitatea unui produs alimentar reprezintă o problemă complexă, de care depinde acceptarea sau respingerea lui de către consumator.

Cercetările efectuate în cadrul acestei lucrări, rezultatele experimentale obținute și prelucrarea acestora au urmărit următoarele aspecte:

1. Aducerea unor contribuții personale la studiul posibilităților de îmbunătățire a indicatorilor de calitate a diferitelor sorturi de miere de albine din România.
2. Abordarea prin prisma teoriei sistemelor și a principiilor fundamentale utilizate în inginerie a problemelor legate de măsurarea indicatorilor de calitate ai sorturilor de miere de albine.
3. Utilizarea avantajelor incontestabile ale tehnicilor de modelare matematică în vederea studierii dependențelor existente între indicatorii de calitate ai sorturilor de miere de albine și o serie de parametri fizico-chimici și microbiologici.
4. Utilizarea metodelor de modelare matematică în vederea alegerii celor mai buni indicatori de calitate precum și formularea unor tehnici strategice de îmbunătățire a acestora.
5. Elaborarea unor modele matematice statistice de predicție cu ajutorul cărora să se poată prognoza modalitățile concrete de intervenție tehnice, tehnologice sau chimice, pentru îmbunătățirea valorilor indicatorilor de calitate ai sorturilor mierii de albine.
6. Pe baza studiilor efectuate în lucrare, elaborarea și trasarea unei hărți a României cu specific apicol.

Determinările experimentale, precum și interpretarea rezultatelor au fost realizate la Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Timiș în cadrul Biroului Zonal Control Reziduuri și în cadrul Laboratorului de Automatizări al Facultății de Chimie Industrială și Ingineria Mediului, "Universitatea Politehnică" Timișoara.

Lucrarea evidențiază o evaluare a principalelor aspecte de tip chimic și biochimic care au stat la baza cercetărilor experimentale și a contribuțiilor aduse în domeniu. De asemenea, s-a propus și o abordare sistemică a problemelor legate de calitatea mierii de albine prin elaborarea și utilizarea modelelor matematice.

Teza încearcă să satisfacă cerințele actuale îmbinând armonios aspecte interdisciplinare complexe. Astfel, lucrarea răspunde exigențelor științifice și aplicative, atât din punct de vedere chimic, cât și din punctul de vedere al aspectelor legate de ingineria chimică.

OBIECTIVELE GENERALE ALE LUCRĂRII

1. Realizarea unei documentări bibliografice cu privire la tehnologia de obținere a mierii.
2. Sinteza principalelor legi și reglementări naționale și internaționale privind domeniul apiculturii.
3. Documentare bibliografică asupra tehnicilor de modelare matematică și optimizare.
4. Realizarea unei baze de date experimentale în urma monitorizării efectuate timp de șase ani asupra diferitelor tipuri de miere, din diferite regiuni ale țării.
5. Prelucrarea datelor experimentale cu programe de calcul specifice.
6. Determinarea modelelor matematice ce caracterizează influența concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină asupra calității diferitelor sorturi de miere în condiții diferite de temperatură.
7. Verificarea și testarea modelelor matematice obținute, prin calculul indicatorilor de adecvanță.
8. Elaborarea unor tehnici strategice de îmbunătățire a indicatorilor de calitate a mierii pe baza concluziilor elaborate în urma studiilor efectuate.
9. Generarea și trasarea unei hărți a României cu specific apicol pe baza studiilor efectuate în lucrare.

1. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIU

1.1. Istoricul mierii

Mierea este un aliment dulce, produsă de albine pe baza nectarului extras din flori. Recoltarea mierii se practică intens încă din timpurile antice. Încă de acum 10.000 de ani mierea făcea parte din dieta omului. Mult timp a fost prețuită și considerată ca o substanță magico-religioasă de către multe popoare.

Mierea era utilizată în Egiptul antic atât pentru producerea diverselor deserturi, dar și pentru îmbălsămarea cadavrelor. Pentru romani, avea mare valoare, încât de multe ori era utilizată pentru plata taxelor. Populația Maya din America de Sud utiliza mierea în scopuri culinare. Grecii utilizau mierea pentru a trata diferite inflamații și tăieturi, considerând de asemenea, mierea ca fiind mâncarea zeilor. Chiar și în Evul Mediu, când majoritatea bolilor erau considerate un semn al pedepsei divine și drept urmare prea puțin tratate, mierea era utilizată pe post de medicament. Ca urmare a apariției antibioticelor, după cel de-al doilea Război Mondial, aceasta nu a mai fost utilizată ca medicament [2].

Existau numeroase referințe cu privire la miere în Biblie, atât în Vechiul cât și în Noul testament. Adepții Coranului susțin că profetul Mahomed a recomandat consumul de miere în scopuri terapeutice. Hindușii considerau mierea drept unul din cele cinci elixire ale imortalității. Pentru budiști mierea este foarte importantă mai ales în cadrul festivalului Madhu Purnima, ce se celebrează în India și Bangladesh.

Mierea de albine a fost prima substanță dulce folosită de către om fiind precursorul zahărului din trestie sau din sfeclă. De asemenea, era folosită la prepararea unor băuturi alcoolice la care se adaugă și efectul polenului și levurilor din faguri.

Mierea este un aliment miraculos care nu expiră niciodată. În mormintele egiptene s-au găsit borcane cu miere veche de 2000 de ani, încă dulce și aromată.

1.2. Istoria apiculturii în România

Există diferite izvoare care arată că pe teritoriul vechii Dacii apicultura, a cunoscut o mare dezvoltare. Xenofon (430-355 î.Hr.) în lucrarea sa "Anabasis" arăta că "hrana geților consta în primul rând din miere, legume, lapte și foarte puțină carne". Naturalistul roman Aelianus (sec.III î.Hr.) în lucrarea "De natura animalium" arăta că daco-geții creșteau albine pentru miere și ceară, iar fagurii cu miere constituiau un produs de seamă al economiei casnice și comerțului. În lucrarea "Istoria pragmatică", Polibiu din Megalopolis (207-127 î.Hr.), arăta că din teritoriile de la Dunăre se exporta miere și ceară în regiunile pontice.

Alexandru Xenopol în "Istoria românilor" pomenește că dacii se îndelemniceau cu creșterea albinelor. În lucrările lor, Nicolae Iorga, Vasile Pîrvan și alte personalități arătau că în schimburile comerciale daco-geții ofereau pe lângă grâu și piei de animale, miere și ceară de albine. Numeroase izvoare ne arată că

dezvoltarea albinăritului a fost influențată de o serie de privilegii acordate celor ce făceau negoț cu ceară și cu miere de albine [3].

În secolul al XVIII-lea, în Muntenia și Moldova existau peste un milion de stupi. O statistică din 1763 menționează că în Moldova existau aproximativ 670 000 stupi, având o tradiție în creșterea albinelor încă din cele mai vechi timpuri. Pădurile acestei regiuni, oferă mari surse de nectar și mană pentru realizarea unor producții apreciable de miere de calitate foarte bună [1].

În ultimii ani producția de miere a avut un trend ascendent. În 2008 s-au obținut producții de aproximativ 13.000-15.000 de tone, în condițiile în care, într-un an normal, producția de miere se situează între 17.000 și 20.000 de tone.

Un an optim pentru producția de miere înseamnă, în mare, temperaturi de 15-20 °C în luna mai, zile însorite, fără vânt. În anul 2008, în țara noastră existau circa 35 de mii de apicultori și 1.109.000 familii de albine. Potrivit Ministerului Agriculturii și Dezvoltării Rurale (MADR), numărul de familii de albine este în continuă creștere, în 2009 ajungând la 1.110.000. Producția de miere a crescut în 2009 cu 17,5%, la 23.500 de tone, peste 50% din această cantitate fiind livrată la export.

1.3. Albinele

Structura albinelor este prezentată în figura 1:

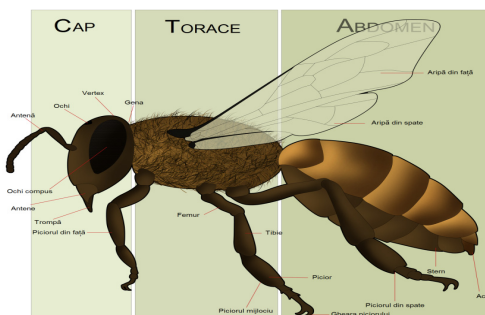


Figura 1 – Structura albinei

1.3.1. Albinele și flora

Mierea și polenul sunt esențiale pentru albine deoarece asigură supraviețuirea acestora. În interiorul așa numitului stomac al albinei se formează mierea ca urmare a acțiunii unei enzime specifice. Pentru a produce un kilogram de miere, o albină trebuie să execute 60000 zboruri.

Viața albinelor este în permanentă interdependență cu plantele deoarece, hrana lor se bazează exclusiv pe produse de origine vegetală. Pentru a asigura necesarul de substanțe hidrocarbonate (zaharoase), albinele culeg nectar și mană, iar pentru satisfacerea nevoilor de substanțe proteice, minerale, grăsimi, vitamine, albinele culeg polenul florilor, vizitând în acest scop flora entomofilă din jurul stupinei [4].

Cantitatea de miere ce se poate produce din nectarul florii depinde de cantitatea totală de nectar secretat și de concentrația zahărului din nectar. Concentrația zahărului din nectar este cuprinsă în general între 10-50% și chiar mai mult variind mult de la o specie vegetală la alta. În zborurile lor, albinele acestea

aleg nectarurile cele mai bogate în zahăr, iar când conținutul de zahăr în nectar este sub 15%, acestea întrerup în general culesul. Nectarul se compune din diferite zaharuri, compuși ai azotului, minerale, acizi organici, vitamine, pigmenți și substanțe aromatice.

Glandele nectarifere florale produc nectarul pe care albinele îl culeg și transformă în miere florală. Prin prelucrarea nectarului, conținutul de zaharoză se transformă prin invertire în glucoză și fructoză, iar conținutul de apă va scădea ajungând în jurul a 18-20%. Pe lângă acestea se întâlnesc și glande nectarifere extraflorale, care secretă o substanță dulce, limpede și vâscoasă care se numește mană sau roua de miere, substanță pe care albinele o culeg și o transformă în miere de mană [5].

1.3.2. Viața în stup

Albinele din stup sunt conduse de albina numită regină. Aceasta are o durată de viață în medie de 3 ani de zile, depunând ouă în toată această perioadă. Regina efectuează împerecherea cu albine de sex masculin numite trântori.

Albine lucrătoare reprezintă aproximativ 95% din puii reginei. Aceste albine lucrătoare trăiesc aproximativ 30 de zile, trecând prin diferite stadii de dezvoltare în ceea ce privește rolul lor din stup. Există următoarele tipuri de albine-lucrătoare: doici și albine casnice, care sunt responsabile cu întreținerea stupului, și culegătoare al caror rol este de a colecta nectar, polen, precum și apa [6].

Cauzele principale de deces pentru o albină lucrătoare este epuizarea, după un anumit timp de zbor, în general 800 km, ele se vor afla în incapacitatea de a zbura și a avea grijă de ele insele.

Diviziunea muncii în cadrul unui stup se face în funcție de vârsta albinelor lucrătoare. Își încep viața curățând celula din care s-au născut, apoi vor îngriji puietul și își încheie viața prin culegerea polenului, a apei și a nectarului. Albinele tinere lucrătoare trăiesc o mare parte din viața lor în interiorul stupului, dar în momentul în care acestea devin culegătoare, devin vulnerabile, la condițiile de mediu și la uzarea aripilor. Albinele nu vor ieși la zbor, dacă viteza vântului este mai mare de 34 km/oră, sau dacă plouă [7].

Trântorii sunt produși numai de către regina. Sunt puțini la număr și au un singur rol, acela de reproducere, nefiind implicați în hrănirea coloniei sau întreținerea stupului. Trântorii trăiesc cea mai mare parte a timpului în afara stupului și fiind expuși epuizării sau decesului au o durată de viață de aproximativ 25 de zile [8].

1.3.3. Principale rase de albine

Există pe pământ aproximativ 15.000 de specii de albine, de la cele sociale, la cele extrem de periculoase. Cele mai cunoscute sunt albinele melifere care polenizează nenumărate recolte și care produc mierea.

❖ *Apis mellifera*-are o mare valoare economică, având instinctul de a aduna multă miere. Această albină este răspândită pe toate continentele și este exploatată în stupi.

❖ Albina indiana-este mai mică decât albinele melifere și trăiește în China, India și Japonia. Construiește până la 12 faguri și înmagazinează până la 4 kg miere. Sunt albine blânde, însă valoarea economică este cunoscută doar local.

❖ Albina indiana uriasă - este o rasă sălbatică fără valoare economică, neputându-se adapta la stup. Aceste albine construiesc un singur fagure, în care pot depozita aproximativ 35 kg de miere. Dintre albinele europene are cea mai mare dimensiune corporală și poate zbura până la 2.000 m înălțime.

❖ Albina pitică galbenă - are cele mai mici dimensiuni și este lipsită de valoare economică. Trăiește în același areal ca și albina indiană uriașă (Filipine, Ceylon) construind un singur fagure de 15 cm în care înmagazinează 500g de miere.

❖ Albina românească (*Apis mellifera carpatica*) - aceste albine sunt răspândite în zona carpato-danubiană caracterizându-se printr-un comportament liniștit pe faguri, permițând intervenția omului chiar și fără folosirea fumului.

Principalele caracteristici somatometrice ale acestei rase sunt: trompa are lungimea cuprinsă între 6,02-6,64 mm, lungimea aripii anterioare este de 9,0-9,4 mm, indicele cubital (clase) 2,12-3,70 și indicele tarsian (procente) 54,97-58,56. Este o albină productivă caracterizată prin înlocuirea periodică a mătcii (anecbalie), care în condiții optime de cules, poate produce până la 50-60 kg de miere/familie. Tendința de propolizare este slabă [9].

1.3.4. Bolile albinelor

Albinele, se pot îmbolnăvi de diferite boli, care prin mortalitatea pe care o produc în rândul indivizilor coloniei, reduc numărul albinelor și prin aceasta familiile de albine se depopulează, devenind neproductive. În multe cazuri, se pierd familii sau chiar stupini întregi, aducând pagube însemnate pentru apicultori. Rentabilitatea creșterii albinelor se asigură doar cu albine sănătoase.

Prevenirea și depistarea lor reprezintă un factor extrem de important în asigurarea sănătății familiilor de albine.

Principalele boli ale albinelor [9,10]

Bolile albinelor se pot împărți în boli contagioase, necontagioase și intoxicații.

Bolile contagioase se grupează în:

- virotice (puietul în sac, boala neagră);
- bacteriene (loca americană, europeană, septicemia, paratifoza);
- micotice (ascosferoza, aspergiloza, melanoza);
- parazitare (nosemoza, amibioza, acarioza, brauloza, varrooza, senotainioza, triunghiulinoza).

Bolile necontagioase ale albinelor sunt reprezentate prin:

- puietul răcit;
- boala de mai;
- diareea albinelor;
- anomaliile mătcilor.

Intoxicațiile albinelor se pot produce cu polen, nectar, miere de mană, cu medicamente utilizate în tratamentele aplicate albinelor, sau cu pesticide folosite pentru combaterea dăunătorilor.

Familiile de albine pot suferi și de pe urma unor dăunători cum ar fi găselnița, viespile, lupul albinelor, furnicile, ciocănitorele, șoarecii sau fluturele "Cap de mort" [10].

1.4. Mierea – produs final

Mierea de albine reprezintă un aliment excelent cu mare valoare nutritivă, biologică și energetică, ușor asimilabil, cu reale proprietăți biostimulatoare datorită conținutului în substanțe antibiotice naturale, fermenți, vitamine și elemente minerale.

1.4.1. Mierea și produsele ei

1.4.1.1. Polenul

Pulberea, cel mai adesea de culoare galbenă, constituită din grăuncioare microscopice, ce provine din anterele staminelor se numește polen (din latină pollen). Polenul mai este definit și ca fiind o pulbere galbenă produsă de staminele fanerogamelor, celule reproducătoare masculine. Este considerat ca fiind unul dintre cele mai vechi suplimente alimentare folosite de om. Despre beneficiile polenului se vorbește din cele mai vechi timpuri de diverse civilizații și religii.

Egiptenii și Chinezii antici foloseau polenul pe post de medicament și factor de întinerire a organismului. Hipocrate, părintele medicinei considera că polenul ajută la prevenirea îmbătrânirii organismului, asigurând o sănătate bună celor care îl consumau. Legende galice sunt pline de referințe la miere și polen. Este de asemenea, pomenit în Biblie, Talmud și în Coran.

La ora actuală acesta este o componentă importantă a apiterapiei.

Compoziția chimică a polenului este următoarea: vitamine (provitamina A, vitamina A, vitamina B1, B2, B3, B5, B6, B12, vitamina C, D, E, F, H, K, PP și acid folic), minerale (calciu, fosfor, potasiu, fier, cupru, iod, zinc, sulf, sodiu, clor, magneziu, molibden, seleniu, brom, siliciu și titanu), aminoacizi, carbohidrați, acizi grași, enzime, coenzime și diverse grăsimi [9].

Astfel, polenul conține 22 de aminoacizi, 18 vitamine, 25 de minerale, 59 de elemente de bază, 11 enzime și coenzime, 14 acizi grași, 11 carbohidrați și aproximativ 25% din compoziția sa este reprezentată de proteine. Polenul conține cu 50% mai multe proteine decât carnea de vită, mai mulți aminoacizi decât ouăle, carnea de orice fel și produse lactate. Precursorul metabolic al vitaminei A, betacarotenul, se găsește în cantitate foarte mare în polen. Conținutul în grăsimi este foarte scăzut [11].

Consumul de polen asigură aportul de minerale necesar organismului, chiar și acele minerale care nu se găsesc de regulă în suplimentele alimentare comercializate în farmacii.

1.4.1.2. Ceara

În istorie ceara de albine a avut un rol important, ea fiind utilizată de unele civilizații ca monedă.

În Franța se plătea în jurul anului 1300 o taxă anuală de 2 kg de ceară de albine pentru fiecare familie. În era modernă ceara de albine are multe utilizări.

Este un produs organic complex rezultat din metabolismul albinelor lucrătoare care se utilizează în primul rând la construirea fagurilor din stup. Aceasta se încarcă progresiv cu substanțe care îi schimbă profund compoziția, trecând prin toate nuanțele de galben, ajungând la brun, iar după câțiva ani devine aproape

neagră. Compoziția chimică a cerii este foarte stabilă dacă se ia în considerare produsul pur, așa cum este secretată de glande.

Ceara este, chimic, foarte inertă. Rezistă bine la oxidări fiind ușor atacată doar de enzimele digestive ale insectelor. În stup, ceara se încarcă cu impurități, dar nu se transformă. Prin simpla reîncălzire și purificare, ceara poate fi recuperată după mai mulți ani de folosință.

Culoarea galbenă a cerii din stup este în raport cu pigmentii polenului. Substanțele foarte pigmentate, care înconjoară grăuncioarele de polen ale plantelor se dizolvă ușor în ceară și o colorează. În fagurele de ceară învechit apar diferite elemente precum propolisul sau mătasea coconilor părăsiți în celule de albinele care se nasc, dovedindu-se un material alcătuit din elemente disparate, fiind mult mai solid decât pelicula subțire de ceară de la început [9].

Temperatura și alimentația albinelor influențează secreția de ceară. Intervalul optim de temperatură la care aceasta are loc este cuprins între 33-36°C, sub aceste limite secreția încetează, iar ceara nu se mai poate menține în stare lichidă. Alimentația zilnică a albinelor trebuie să conțină miere sau zahăr și polen pentru a putea produce ceara. S-a constatat că pentru producerea cerii este necesar un consum de circa 6 kg miere sau 5 kg zahăr. Polenul este indispensabil în acest proces prin aportul de azot pe care îl aduce.

Ceara de albine face parte din categoria substanțelor complexe, a căror structură nu este complet stabilă. În compoziția ei intră trei elemente principale: carbon (80%), hidrogen (13%) și oxigen (7%). Din punct de vedere chimic, ceara este compusă din: esteri ai acizilor cerici 71%, acizi cerici liberi 13,5-14%, hidrocarburi 10,5-13.5%, alcooli liberi 1-1,25%, esteri ai colesterolului 1%, umiditate și impurități (polen, rășini etc) 1-2% [11].

Ceara de albine este insolubilă în apă, dar solubilă în diverși solvenți organici. Cel mai bun solvent este benzenul (100 g ceară se dizolvă în 100 g benzen, la 45 °C), urmat de esența de terebentină. În alcool, ceara nu se dizolvă decât foarte greu și doar în prezența căldurii. În schimb se obține o foarte bună separare a acesteia de propolis care este foarte solubil în alcool. Punctul de topire al cerii pure este de 64 °C +/- 0,9 °C, iar punctul de solidificare este de 63 °C. Pentru ceara nepurificată, punctul de topire variază între minimum 62°C și maximum de 65 °C. Masa volumică este de 927 kg/m³ minimum și 970 kg/m³ maximum (media : 953kg/m³) la o temperatură de 15 °C [11].

Folosind tehnologii diferite de obținere, ceara provine din căpăcele, sau prin topirea fagurilor vechi.

Fagurii vechi topiți conțin mari cantități de propolis, de polen și de coconi. Pentru a putea extrage ceara din acest amestec cel mai folosit utilaj este topitorul de ceară care folosește fie extracția cu vapori de apă, fie extracția cu apă caldă.

La decăpăcire pe lângă căpăcele există și o cantitate destul de mare de miere. Separarea în cele mai bune condiții a cerii se face cu ajutorul unei prese în care se pun căpăcelele crescându-se treptat presiunea.

Un proces rapid de separare și cu un randament foarte bun îl reprezintă centrifugarea căpăcelelor. Acestea sunt uscate și mierea care se scurge este curată.

1.4.1.3. Apilarnil

Apilarnilul este un produs apicol natural obținut din larvele de trântor. Datorită proprietăților biotrofice, energizante, vitalizante, tonifiante și psihotonice, ajută la refacerea sistemului imunitar.

Se păstrează la rece la minimum -5°C , iar pentru o perioadă mai mare de timp apilarnilul se conservă la temperaturi mai scăzute de -20°C .

Înflorirea pomilor fructiferi reprezintă perioada optimă de producere a apilarnilului. În cea de a 10-a zi de la depunerea oului în celule, se recoltează conținutul integral al celulelor de trântori. Produsul obținut după recoltare este neomogen, larvele fiind înglobate într-un lichid lăptos. Acest amestec prin mixare devine un produs omogen cu o consistență lăptoasă, de culoare ușor gălbuie, care în timp devine cenușie. Apilarnilul se folosește în stare pură, sau în amestec cu alte produse apicole sau substanțe medicamentoase pentru obținerea de preparate apiterapice. Gustul este ușor astringent [12].

Proprietățile fizico-chimice, microbiologice și organoleptice ale apilarnilului sunt prezentate în tabelele 1, 2 și 3:

Tabelul 1 - Proprietățile fizico-chimice ale apilarnilului

Caracteristici	Condiții de admisibilitate	
Aciditate (pH)	5,0- 6,8	
Conținut apă	%	65,0-75,0
Conținut substanțe uscate	%	25,0-35,0
Proteine total	g%	9,0-12,0
Glucide total	g %	6,0-10,0
Lipide total	g%	5,0- 8,0
Cenușă	g % maxim	2,0
Substanțe nedeterminate	g%	1,1- 1,2

Tabelul 2 - Caracteristici microbiologice ale apilarnilului

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Numărul total de germeni aerobi mezofili	50.000/g
Bacterii coliforme, maxim	100/g
Escherichia coli, maxim	10/g
Salmonella	0-20/g
Stafilococi coagulazo-pozitivi, maxim	10/g
Drojii și mucegaiuri (levuri), maxim	1.000/g

Tabelul 3 - Proprietățile organoleptice ale apilarnilului

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect	aspect de larve și lăptișor comun (hrana larvară), respectiv învelișurile de năpârlire a larvelor, sub forma de masă neomogenă în care larvele apar în mod vizibil
Culoare	albă
Consistența	neomogen, untos
Miros	caracteristic hranei larvare ușor aromat
Gust	ușor astringent
Impurități	se admit urme de ceară, epiteliile de năpârlire sau alte substanțe determinate de natura produsului respectiv dar care să nu depășească 10%

1.4.1.4. Pastura

Pastura, numită și „pâinea albinelor” este hrana de bază a albinelor tinere. Aceasta reprezintă polenul recoltat de albine și depozitat în faguri, unde sub influența umidității, temperaturii și a microflorei din stup este transformat, prin reacții enzimatiche.

Polenul este adus și depozitat în stup de albinele culegătoare.

Cu ajutorul unui cuțit cu lama subțire, pastura poate fi recoltată prin tăierea celulelor cât se poate mai aproape de baza acestora.

Compoziția în grăsimi și proteine este mai mică decât cea a polenului și mai bogată în zaharuri și acid lactic, conservându-se astfel mai bine, fără a apărea modificări majore, cantitative sau calitative [9].

Pastura este folosită în industria farmaceutică, în special la obținerea vitaminelor naturale. De asemenea, se mai întrebuințează și în medicină pentru tratarea unei serii de maladii ale sistemului nervos, endocrin și în avitaminoze. Efectul său terapeutic este mai puternic ca și a polenului.

1.4.1.5. Propolis

Albinele colectează rășina, care prin amestecare cu salivă și cu alte substanțe formează propolisul.

Se presupune că, propolisul întărește stabilitatea structurală a stupului, reduce riscul de apariție a diferitelor boli și a paraziților, precum și de dezvoltare a diverselor bacterii în stup. Această substanță împiedică de asemenea putrefacția în interiorul stupului. Dacă în interiorul stupului moare un dăunător al albinelor îi învelesc corpul în propolis mumificându-l și făcându-l astfel inofensiv și inodor [13].

Propolisul are efecte benefice asupra sănătății fiind considerat un medicament tradițional. În medicina naturistă se utilizează pentru vindecarea diverselor afecțiuni printre care amintim inflamațiile, bolile virale și arsuri superficiale. De asemenea, are efecte benefice asupra sănătății inimii, întărește sistemul imunitar și reduce șansele de instalare a cataractei. Previne infecțiile gingiilor și carierea dinților luptând împotriva bacteriilor și a respirației urât mirositoare.

Tincturile de propolis pot cauza reacții alergice severe în cazul persoanelor suferinde de alergii la albine sau produse apicole [9].

Culoarea diferă în funcție de sursa de rășină utilizată de la maroniu închis până la negru, dar există și variații de verde, roșu, chiar și alb.

Compoziția propolisului este diferită în funcție de zonă, de anotimp, de vegetație, dar și de la un stup la altul. Propolisul obținut din rășina plopilor sau coniferelor, vegetația specifică zonei temperat nordice are aproximativ 50 de elemente constitutive, mai ales rășini și balsamuri vegetale (50%), ceară (30%), uleiuri esențiale (10 %), polen (5%). Propolisul conține următoarele elemente chimice: Zinc, Fier, Magneziu, Cupru și vitamine (A, B1, B2, B3, E, flavonoide (P)).

În starea sa naturală fiind o substanță lipicioasă este dificil de manevrat. De aceea distribuitorii îl împachetează și îl îngheață în cantități mici. Se distribuie și în stare lichidă, macerat în apă sau alcool [11].

1.4.1.6. Lăptișor de matcă

Lăptișorul de matcă se prezintă ca o materie gelatinoasă secretată de glandele albinelor doici, folosit în hrana viitoarelor măci precum și a larvelor albinelor în primele trei etape larvare. Proaspăt, lăptișorul are o culoare alb-gălbui, bătând ușor în brun-gălbui. Lumina și aerul influențează densitatea și culoarea lăptișorului. Acesta devine mult mai dens cu aspect sticios, iar culoarea trece în brun închis.

Gustul lăptișorului este ușor astringent, acrișor, cu un pH cuprins între 3,5-4,5.

Datorită densității de 1/1 în amestec cu mierea, lăptișorul se ridică la suprafață sub formă de spumă.

În contact cu aluminiul, dar și cu alte metale, le atacă, dând produși toxici și schimbându-și și el o parte din componentele sale. Se descompune destul de repede, iar în mediu cu umiditate mare se rânzește. De aceea, trebuie păstrat la rece (2-4 °C), menținându-și astfel calitățile timp de 7-8 luni. După aproximativ 12 luni valoarea terapeutică a lăptișorului dispăre. Cea mai bună păstrare se face însă prin liofilizare imediat după recoltare.

Larvele trebuie ferite de lumina solară puternică, de curenți de aer, sau de o temperatură sub 20 °C pentru a obține un lăptișor de calitate.

Proprietățile organoleptice ale lăptișorului de matcă sunt redată în tabelul 4:

Tabelul 4 - Proprietățile organoleptice ale lăptișorului de matcă

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect	masă vâscoasă, omogena cu granulații fine
Culoare	gălbui sau alb-gălbui
Consistența	ușor vâscos
Miros	caracteristic, ușor aromat
Gust	slab acid (acrișor), foarte ușor astringent
Impurități	nu se admite prezența de larve, ceara, spori de mușci sau alte impurități vizibile cu ochiul liber sau la microscop. Se admit urme de polen

Lăptișorul este compus dintr-un număr însemnat de vitamine, aminoacizi și compuși încă neidentificați (în proporție de 2,8%). Glandele

hipofaringiene ale albinelor produc acizii 9 și 10 hidroxidecenoici care se regăsesc în compoziția lăptișorului. [14]

În lăptișorul de matcă s-au identificat 18 diferiți aminoacizi, combinați și liberi dintre care cei mai importanți sunt: acidul aspartic, glutamic, alanina, arginina, glutamina, glicina, lizina, metionina, prolina, valina, tiamina și tirozina.

În compoziția sa s-au mai identificat și substanțe de tip hormonal, hidroxibenzoat cu efect de conservant natural, precum și o substanță antibiotică, bactericidă.

Cantitatea de apă din lăptișor este de aproximativ 79%, 2,5% o reprezintă cenușa, proteinele sunt în procent de 50% din substanța uscată. 18% din greutatea uscată sunt lipide, aceasta fracțiune fiind mult studiată. Ea cuprinde acidul hidroxi-10 decenoic-2, care este un acid gras specific cu proprietăți antibacteriene, antifungice și antigerminative.

Fracțiunea glucidică a lăptișorului de matcă este 20-25% din greutatea uscată. Vitaminele prezente în lăptișorul proaspăt sunt: tiamina, riboflavină, biotină, acid folic, cantități mici de vitamina C și mari de acid pantotenic (0,5 mg/g de greutate uscată). Conținutul în vitamine din grupa B este foarte ridicat. Fracțiunea proteică cuprinde majoritatea aminoacizilor, fie liberi, fie combinați.

Producerea lăptișorului de matcă se poate realiza în familii orfanizate sau în familii cu matcă.

Prepararea acestuia cere o foarte mare curățenie din partea producătorului, camera în care este recoltat trebuie să fie în perfectă stare de igienizare. Borcanele de sticlă în care se ambalează lăptișorul trebuie să fie de culoare închisă, cu dop rodat. Borcanele cu lăptișor de matcă trebuie să fie umplute astfel încât să nu rămână în interior un spațiu gol și se păstrează la întuneric la o temperatură de 0-4°C. Fiind un produs biologic cu un conținut mare de apă, enzime și microorganisme care se alterează la temperatura obișnuită, lăptișorul de matcă pur se conservă în condiții optime prin liofilizare și frig.

Identificarea lăptișorului de matcă din miere se face prin cromatografie, iar dozarea acidului hidroxi-10 decenoic-2, substanță specifică lăptișorului de matcă, permite identificarea cantității de lăptișor încorporat.

Datorită conținutului mare de vitamine și aminoacizi, lăptișorul de matcă este folosit în apiaterapie, în cosmetica medicală și la obținerea unor produse energizante ce pot fi folosite în cazuri de astenie, anorexie, slăbire a organismului și deficiența constituțională. Are de asemenea, o acțiune asupra glicemiei [11].

Lăptișorul de matcă este consumat în general în amestec cu mierea folosit fie în stare pură fie în stare liofilizată, adică deshidratat în vid la temperatură foarte scăzută.

1.4.1.7. Veninul

Veninul de albine este produsul de secreție al albinelor lucrătoare, stocat în pungă de venin și eliminat în momentul înțepării ca act reflex de apărare. O albină poate elibera momentul înțepării în jur de 0,3 mg venin lichid, adică 0,1 mg substanță uscată.

În momentul ecloziunii albinele sunt lipsite de venin, la 6 zile au în jur de 0,15 mg, la 11 zile 0,21 mg, iar la 15 zile 0,3 mg venin lichid, iar cantitatea de substanță uscată este 0,05 mg, 0,07 mg, respectiv 0,1 mg.

Vârsta albinelor, cantitatea și calitatea hranei și anotimpul influențează secreția de venin. După 15-20 de zile de viață când cantitatea de venin este maximă, secreția glandelor începe să scadă.

Primăvara cantitatea de venin obținută este mai mare decât la generațiile de albine de vară și toamnă, resursele polinifere fiind și ele mai bogate în acest anotimp.

Recoltarea veninului se poate face prin mai multe metode: prin narcotizarea albinelor, prin înțeparea unor membrane sau cu ajutorul unor dispozitive electrice speciale. Este necesar un număr extrem de mare de albine pentru producerea unui gram de venin, de aceea nu toate metodele au eficiență maximă [11].

Narcotizarea albinelor se realizează prin introducerea lor într-un vas de sticlă deasupra căruia se așează o hârtie de filtru umectată cu eter. Veninul este depus pe pereții vasului, de unde se recuperează prin spălare, filtrare și evaporare, obținându-se venin sub formă de precipitat. Metoda prezintă un randament scăzut, aproximativ 50-57 mg venin de la 1000 de albine.

Recoltarea veninului se poate face și într-un vas cu apă distilată, pe a cărui gură se leagă o membrană subțire de piele, pe care albinele o înțepă. Veninul se scurge în apa distilată, fiind recuperat prin fierbere și evaporare sub formă de precipitat. Avantajul acestei metode este că se obține venin pur.

Veninul mai poate fi recoltat prin montarea la urdiniș a unor dispozitive speciale compuse din: generator de impulsuri, sursa electrică, grila de excitație cu caseta colectoare de venin și conductorii de legătură. Cu ajutorul generatorului, alimentat la o sursă de energie de 9-12 V se produc impulsuri electromagnetice optime pentru declanșarea actului de înțepare și eliberarea veninului. Declanșarea instinctului de înțepare se realizează prin impulsuri electrice ciclice, sub formă de serii cu pauză între ele de 3 sau 6 secunde. Aceste impulsuri de undă complexă au amplitudinea pozitivă de 45 V pe o perioadă de 1,5 microsecunde, succedate instantaneu de o amplitudine negativă de 37 V, timp de 7 microsecunde. Frecvența impulsului este de 58 Hz. Contactul unei albine cu firele grilei provoacă instantaneu reacția de înțepare.

Alarma pe care o dau primele albine produce un efect de avalanșă care adună toate albinele pe grila înțepând membrana timp de 1-2 minute până la întreruperea semnalului stimului.

Grila de excitație este construită dintr-o rețea de fire paralele neizolate având o grosime de 0,5-0,6 mm și 4,5-5 mm distanța între ele. Cadrul grilei poate fi din două piese din material plastic, fixate prin intermediul a două tije metalice, rețeaua desfășurându-se pe o singură față sau sub forma unei rame din lemn, iar desfășurarea firelor rețelei făcându-se pe ambele fețe. Veninul se colectează într-o casetă plasată sub rețeaua de fire și este construită dintr-o placă de sticlă pe care se așează o membrană din latex, ușor penetrabilă care nu reține acul albinei.

Veninul se recoltează doar în sezonul activ (aprilie - septembrie) și numai de la familii puternice. O familie de albine poate fi supusă unui ciclu de 4 excitări a 30 de minute, cu pauze între ele de 60 minute. Recoltarea se reia după 48 de ore la aceeași familie [9].

Casetele de colectare se păstrează în grilă până la saturarea cu venin (aproximativ 10 recoltări) după care acestea sunt păstrate într-o încăpere minimum 72 ore pentru cristalizarea completă a veninului în vederea răzuirii acestuia. Recoltarea veninului nu afectează în niciun fel albinele. Însă, pentru apicultori trebuie luate măsuri severe de protecție, din cauza toxicității mari a veninului și de asemenea, din cauza faptului că pe timpul recoltării veninului albinele devin irascibile, fenomen ce durează până la 6 zile de la extracție.

Ambalarea veninului se face în recipiente cu dop rodat, de culoare închisă, fiind păstrate la temperatura camerei, în condiții normale de umiditate.

Veninul de albine este un lichid dens, incolor, cu miros înțepător, gust amăruie-acid, astringent, arzător cristalizând într-un interval scurt de timp.

Proprietățile organoleptice și fizico-chimice ale veninului de albine cristalizat sunt prezentate în tabelul 5:

Tabelul 5 - Proprietățile organoleptice și fizico-chimice ale veninului de albine cristalizat [14]

Caracteristici	Condiții de admisibilitate
Aspect	masă pulverulentă omogenă
Culoare	alb-mat, ușor cenușiu
Consistența	pulbere afânată
Miros	iritant, caracteristic
Gust	amar, înțepător
Puritate	fără impurități
Solubilitate	solubil în apă, insolubil în sulfat de amoniu și alcool
Aciditate (pH)	4,5-5,5
Conținut în apă	6-7%
Conținut în substanță uscată	93-94%
Proteine total	65-75%
Cenușa	3,5-4,0%
Greutate specifică	1,131

Veninul de albine are o structură complexă, fiind constituit din substanțe de natură organică și anorganică, substanțe care îi conferă proprietăți specifice. Veninul de albine este compus din proteine, enzime, hormoni, săruri minerale, uleiuri eterice și alte substanțe volatile. Conținutul în elemente este de: 46,36% carbon, hidrogen 7,56% și 13,30% azot.

Substanțele proteice reprezintă principalul component al veninului de albine. Cea mai importantă fracție proteică existentă în structura lui este melitina, fiind considerată și componenta cea mai activă a veninului. În melitină s-au identificat glicocol, alanină, valină, leucină, izoleucină, serină, tirozină, lizină, arginină, asparagină, glutamină, triptofan, prolină. Această fracție a veninului are influență asupra degajării de histamină și serotonină, dizolvă eritrocitele, duce la scăderea presiunii sanguine și a ritmul respirator, blochează sincopelile nervoase periferice și centrale etc.

Cea de-a doua fracție bine reprezentată este cea alcătuită din fermeții hialuronidazei și fosfolipazei A. În această fracție s-au identificat 18 aminoacizi: glicocol, alanină, valină, leucină, izoleucină, serină, tirozină, lizină, arginină, asparagină, glutamină, triptofan, prolină, tirozină, cistină, metionină, fenilalanină și histamină. Fosfolipaza A lezează celulele, provoacă senzația de durere și prezintă efecte toxice, sinergice cu melitina. Hialuronidaza hidrolizează țesuturile vecine, contribuie la răspândirea veninului în țesut și mărește reacția locală. Nu este toxică.

A treia fracție proteică reprezintă 3% din veninul brut și nu este activă. Histamina provoacă în organism senzația de mâncărime și de durere, ducând la umflarea locului înțepat. De asemenea, acționează cu intensitate asupra musculaturii netede, asupra aparatului cardiovascular și a glandelor exocrine, poate stimula secreția salivară, lacrimară, bronșică, pancreatică și gastrică. Sub acțiunea histaminei se poate ajunge chiar la spasme intestinale și la crize astmatiforme. Fosfolipaza este implicată în reacțiile alergice.

Au mai fost identificați o serie de aminoacizi liberi, acizi nucleici, grăsimi, acizi volatili (acidul formic, acidul clorhidric și acidul ortofosforic). Acești acizi se pierd în cea mai mare parte prin uscare. Dintre minerale, s-au identificat: calciu 0,26%, magneziu 0,49%, fosfor 0,42%, acesta din urmă sub formă de componenți organici ai acidului fosforic. Sulfurul se găsește numai sub formă de derivați organici [9].

Reacțiile datorate veninului de albine sunt de trei feluri: locale, sistemice și anafilactice. Umflătura locală se extinde, iar locul înțepat poate fi roșu, cald și sensibil 2-3 zile. Reacția sistemică se declanșează în câteva minute după înțepătură și poate da reacții ca: tulburări respiratorii, greață, vomismente, dureri abdominale și sincope.

În reacția anafilactică, simptomele se manifestă prin dificultăți respiratorii, confuzii mentale, un șoc de tensiune sanguină care poate conduce la pierderea cunoștinței și la moartea prin colaps respirator și circulator, doar la câteva secunde după înțepare.

Se poate crea o oarecare rezistență la veninul eliberat prin înțepăturile albinelor, dar reacțiile pot deveni pe neașteptate, din diferite cauze, foarte intense. Se poate muri dintr-o singură înțepătură de albină, dar un om a fost înțepat de 2243 de ori și a supraviețuit.

La temperatura camerei și în contact cu aerul se eliberează componenții volatili și cristalizează formând cristale de culoare alb-cenușie având un miros caracteristic și un gust astringent. Este solubil în apă și insolubil în sulfat de amoniu și mai greu solubil în alcool de 60°C. Este solubil în soluții acide și precipită prin încălzire la 90-100°C, proteinele revenind la starea inițială în mediu acid. Este rezistent la acizi și baze. Fiind termorezistent, la temperaturi joase, sub 0°C își păstrează valabilitatea pe termen lung, iar la temperatura camerei în stare cristalizată poate fi păstrat mai mulți ani fără a-și pierde proprietățile terapeutice. Sub influența unor bacterii și fermenți alimentari, veninul de albine își pierde eficiența.

Prin componentele sale veninul inhibă sistemul nervos, iar pe de altă parte stimulează inima și glandele cortico-suprarenale. Administrat singur sau în asociere cu corticoizi, veninul de albine este utilizat ca un factor activ în tratamentul afecțiunilor reumatismale (poliarticular, muscular și cardiac), mai ales în artrite, iar prin combinarea mai multor tehnici curative se poate utiliza în combaterea mai multor afecțiuni, cum ar fi: boli ale sistemului nervos periferic (sciatică, nevralgii, pareze); boli vasculare (tromboflebită, arterioscleroza vaselor); gută, tireotoxicoză și astmul bronșic; boli de piele (fistule, plăgi, ulcere trofice); boli oculare (irită și iridocilită) [11].

Folosit frecvent, în doze mici, veninul de albine, mărește capacitatea de apărare împotriva infecțiilor, permeabilizând o serie de țesuturi sclerozate. Utilizarea lui se va face doar cu avizul medicilor specializați în apiterapie. Veninul de albine nu se va folosi în cazul bolnavilor de diabet, de ficat și pancreas, cu afecțiuni cardiovasculare de tipul infarctului miocardic, miocardite, cei cu nefrită și nefroză, cei cu tuberculoză, sifilis și bruceloză, cei cu epilepsie, encefalite și gravidele.

1.4.2. Clasificarea mierii

Mierea se clasifică după următoarele criterii:

- După proveniență mierea este:
 - florală (de flori), este extrasă din nectarul și polenul cules de către albine din florile plantelor melifere,
 - extraflorală (de mană), este provenită de pe alte părți ale plantei, altele în afară de flori;
- După speciile de plante de la care se adună nectarul există:
 - miere monofloră, provenită integral din nectarul florilor unei singure specii: (salcâm, tei, floarea-soarelui, mentă)
 - miere polifloră, provenită din prelucrarea unui amestec de nectar de la florile mai multor specii de plante.
- După modul de obținere există miere:
 - în faguri (se livrează în faguri),
 - scursă liber din faguri,
 - extrasă cu ajutorul centrifugii,
 - obținută prin presarea fagurilor,
 - topită (fagurii sunt încălzii).
- După consistență mierea poate fi:
 - lichidă (fluidă),
 - cristalizată (zaharisită).
- După culoare există miere incoloră, galben-deschisă, aurie, verzuie, brună sau roșcată.
- După aromă, diversele tipuri de miere, se apreciază prin miros și gust, indicându-se denumirea speciei de plante din care provin.

Clasificarea se mai poate face și în funcție de: compoziția chimică, puritatea și puterea calorică [15].

1.4.3. Tipuri de miere

Numărul mierilor monoflore care se pot recolta în România este relativ redus. Unele dintre ele se recoltează în cantități mari de ordinul tonelor (mierea de salcâm), altele au o producție limitată, ele provenind de la plante a căror arie de răspândire geografică este relativ mică.

Mierea polifloră se obține din nectarul florilor mai multor plante, dar nici una dintre acestea nu predomină. Din acest motiv, gustul și culoarea pot fi diferite. Este considerată o miere "completă".

❖ Mierea de salcâm

Mierea de salcâm este produsă de albine din nectarul florilor de salcâm, *Robinia pseudocacia*. Salcâmi *Robinia* sunt originari din America, dar producția lor este caracteristică mai mult pentru Europa și în special pentru Europa de Est.

Pe teritoriul românesc salcâmul *Robinia pseudocacia* poate forma adevărate păduri sau poate crește izolat. Pădurile foarte mari care se găsesc în nordul țării sau în sud, produc nectar suficient pentru o recoltă pură sau aproape pură de miere de salcâm. Însă, producția depinde foarte mult de condițiile meteorologice cum sunt înghețurile târzii, ploile reci de primăvară și vânturile puternice.

Salcâmi înfloresc în a doua jumătate a lunii mai, iar mierea se recoltează în iunie. Această miere are multă finețe și este cea mai limpede miere care se recoltează în România (maximum 30 mm pe scara Pfund). Conținutul în apă este

mai mic de 18%, pH-ul este aproape de 4 și aciditatea destul de slabă (de ordinul a 14 meq/kg). Conductibilitatea electrică foarte scăzută, este în conformitate cu conținutul în materii minerale mai mic de 0,1%. Spectrul zaharurilor se remarcă prin bogăția în levuloză (aproximativ 50% din substanța uscată) și săracă în glucoză (34%). Zaharurile secundare sunt în procent de aproximativ 10% dizaharide (zaharoză și maltoză) și 3% erloză, un zahăr specific mierii.

Datorită compoziției, viteza de cristalizare foarte scăzută, uneori nulă, chiar și după câțiva ani, mierea de salcâm poate să rămână lichidă.

Spectrul polinic redus ne indică faptul că mierea este foarte pură. Deoarece florile de salcâm sunt sărace în polen, mierea este și ea săracă în polen conținând adesea mai puțin de 10.000 grăuncioare de polen în 10 g. Spectrul polinic diferă foarte mult de la țară la țară, spre exemplu, polenul de *Loranthus europaeus*, plantă ce se aseamănă cu vâscul, constituie un indicator al originii danubiene.

În România, prima recoltă de miere monofloră este cea de salcâm, situându-se pe primul loc în preferințele consumatorilor de miere atât din țară cât și din țările importatoare de miere românească. Mierea de salcâm este singurul sortiment de miere florală la care calitatea se eșalonează pe 3 clase, cuprinzând în plus „calitate superioară”[16].

Calitatea superioară a mierii se referă la însușirile superioare, reale, caracteristice pe care mierea de salcâm le are.

Mierea de salcâm de calitate superioară trebuie să îndeplinească în plus următoarele condiții față de mierea de calitate I-a și a II-a:

- culoare cât mai deschisă, cât mai aproape de incolor;
- fluiditate desăvârșită, fără urme de cristale.

Intervalul colorimetric admis este 0-12 mm, determinarea culorii făcându-se cu ajutorul etaloanelor de culoare.

Proba de miere este introdusă în borcane identice cu etaloanele (dimensiuni, grosime și culoare a sticlei). Privind prin transparența eșantionul de miere folosit la stabilirea indicelui colorimetric se apreciază fluiditatea mierii. Aceasta trebuie să fie perfect limpede, lipsită total de opalescență. Limitele de culoare și fluiditatea perfectă a mierii de salcâm de calitate superioară se impune a fi respectată întocmai, orice modificare indicând o scădere a calității.

Totodată, garantarea necesară să se facă pentru o perioadă de cca. 2 ani, având în vedere că stocul de miere se condiționează în decurs de peste un an, perioadă în care indicele colorimetric crește. În timpul stocării, mierea opalescentă va cristaliza. Termenul de garanție pentru produsul finit este de 1 an din momentul livrării.

Pentru a se face diferența dintre mierea de calitate I-a și cea superioară, este necesar ca mierea de calitate superioară să corespundă unor exigențe de ordin organoleptic (culoare deschisă, fluiditate perfectă).

Datorită nectarului și a polenului de salcâm (*Robinia pseudacacia*) foarte deschis la culoare, mierea de salcâm va avea un indice colorimetric scăzut (sub 12 mm). Acest indice variază în funcție de gradul de impurificare a culesului monoflor.

Examinând microscopic sedimentul mierii se stabilește cu precizie modul în care a fost produsă mierea, puritatea culesului, speciile florale care duc la scăderea caracterului de „miere monofloră”, depozitarea în faguri pe lângă nectarul prelucrat de albine și a soluțiilor folosite în hrăniri.

Fluiditatea mierii de salcâm și durata menținerii acesteia este strict condiționată de compoziția sa chimică, depinzând de sursa florală. Cu cât este mai mare concentrația nectarului de salcâm în raport cu nectarul altor flori, cu atât

posibilitatea de a apărea cristalizarea este mai mică, deoarece și raportul glucoză/fructoză și glucoză/apă vor fi mai mici.

Principala floră vizitată de albine în timpul culesului de salcâm este rapița. Aceasta este unul dintre cele mai reprezentative exemple de floră meliferă, mierea obținută caracterizându-se printr-un proces rapid de cristalizare. Prin prezența rapiței în sedimentul polinic, se anticipează cu certitudine că lotul de miere analizat va cristaliza în scurt timp. Depistarea cristalelor în miere se face la microscop, în lumină polarizată.

Efectuarea culesului în masive compacte de salcâm, plantate pe terenuri nisipoase, unde flora spontană erbacee meliferă este extrem de redusă cantitativ și ca diversitate, asigură obținerea unei mieri de salcâm de calitate superioară. În marile plantații de salcâm sunt și zone în care crește glădița (*Gleditschia triacanthos*), plantă care duce la închiderea culorii mierii. Acest neajuns se evită prin extracția imediată a mierii de salcâm, înflorirea glădiței are loc aproape consecutiv cu salcâmul. Descrierea diferitelor analize la care este supusă proba de miere în laborator are ca scop evidențierea faptului că :

- 1 - aceste determinări ne permit să cunoaștem cauzele care produc schimbări nedorite în aspectul mierii de albine de salcâm ;
- 2 - efectele acestor cauze multiple se rezumă în principal la cele 2 aspecte de calitate, adică culoarea și fluiditatea.

Examinarea mierii de albine de salcâm - făcută chiar și numai cu ajutorul „indicelui colorimetric-etalon”, refractometrului și a unei deosebite competente dă informații certe asupra calității pe care un anumit lot de miere le are pentru a fi încadrat la „calitate superioară”.

❖ Mierea de tei

Acest tip de miere face parte din categoria celor mai bune și mai apreciate sorturi de miere, bogată în vitamine (mai ales vitamina B1 (tiamina)) și aminoacizi. În sedimentul ei granulele de polen ajung până la 70-80 % , uneori conținând și o cantitate însemnată de mană.

Deoarece aroma mierii de tei este foarte puternică, aceasta se poate amesteca cu alte sorturi de miere sau cu miere polifloră, pentru a-i diminua din gust. Culoarea mierii de tei este ușor gălbuie având uneori reflexe verzui. Spre toamnă, mierea cristalizează cu cristale de culoare albă, primind o consistență untoasă și un gust atrăgător.

România poate fi considerată ca și o țară mare producătoare de miere de tei. Se întâmplă ca în apropierea anumitor masive forestiere sau a unor parcuri foarte mari să se recolteze miere de tei foarte caracteristice.

❖ Mierea de floarea-soarelui

Cristalizarea mierii de floarea-soarelui se declanșează repede datorită conținutului mare de glucoză. Uneori cristalizează chiar în faguri de aceea extracția ei trebuie să se facă cât mai repede. În sedimentul ei granulele de polen ajung uneori până la 100 %. Această miere are un gust unic, iar culoarea ei variază de la auriu la galben muștar.

❖ Mierea de rapiță

Mierea de rapiță se obține din flori de Brassica napus var, planta ce se găsește aproape peste tot, cu excepția regiunilor de munte. Recoltarea ei se face în lunile mai-iunie dacă provine din însămânțările de toamnă și în iulie-august la rapița de primăvară care înflorește mai târziu.

Mierea de rapiță are o colorație foarte slabă, ce nu depășește 35 mm pe scara Pfund (care este gradată de la 0 la 140 mm), mirosul este cel al florilor de rapiță, gustul este dulce, fără a avea o caracteristică anume.

Datorită faptului că, există tendința de a se recolta mierea înainte de maturarea completă pentru a nu cristaliza în faguri, conținutul de apă a mierii de rapiță este în jur de 18%. Valoarea pH este 4 și aciditatea de ordinul a 15 meq./kg.

O conductibilitate electrică foarte scăzută indică o cantitate mică de substanțe minerale. Spectrul zaharurilor este dominat de glucoză (48%), urmat de fructoză (44%) și de zaharurile minore (4,5%). Cristalizează spontan și foarte rapid, în stare foarte pură, mierea de rapiță poate să cristalizeze încă de la extracție, mai ales dacă timpul este răcoros. De aceea, trebuie ca mierea să fie trecută printr-un maturator cu termostat [1].

În spectrul polinic al mierii de rapiță se observă conținutul mare de polen de rapiță care este 95% sau chiar mai mult. În aceste condiții, polenurile secundare sunt rare aparținând unei floare destul de banală cum ar fi pomi fructiferi, păpădie și salcie. Recoltarea mierii de rapiță se face în multe țări din Europa și America, în Canada aceasta depășind extragerea mierii de trifoi care constituia înainte prima resursă meliferă a acestei țări.

❖ **Mierea de salcie**

Mierea cu o culoare galben deschis spre auriu, cu o aromă deosebită, uneori cu gust ușor amar, este foarte bogată în vitamine (în special B6 și C). Zaharisirea ei se face cu cristale foarte fine.

❖ **Mierea de coriandru**

Are o culoare deschisă, asemănătoare cu cea de salcie. Deoarece în primele 2 săptămâni de la extracție are un gust neplăcut, ea trebuie lăsată în maturator descoperită. Astfel, va pierde acest gust ajungând o miere suavă excelentă.

❖ **Mierea de mentă**

Această miere se recoltează în cantități mari în Delta Dunării și zonele de inundație ale acesteia. Are culoare verde spre brun - roșcat, un gust dulce, savoarea minții, o consistență uniformă, vâscoasă, care cristalizează în granule fine, incomplete. Este foarte căutată datorită calităților nutritive și terapeutice conținând o cantitate mare de vitamina C.

❖ **Mierea de trifoi**

Este una dintre cele mai populare din întreaga lume, fiind produsă pe scară largă în Canada și Noua Zeelandă. Aceasta este considerată cea mai bună ca savoare și prezentare (cristalizează lent). Culoarea mierii de trifoi variază de la alb până la cea a chihlimbarului, acest lucru datorându-se zonei în care este cultivat trifoiul, dar și speciei de trifoi de la care provine (albă la trifoiul alb pitic, galben-roșiatică la celelalte varietăți). Este bogată în vitamine, în special B1, B2 și C.

❖ **Mierea extraflorală**

Este mierea extrasă din nectarul secretat de alte părți ale unor plante, altele decât florile, unde se găsesc glande nectarifere. Dintre aceste plante amintim porumbul, secara, mazărichea sau unii arbori cum ar fi mărul, prunul, nucul, plopul, stejarul, arțarul, frasinul sau mesteacănul. Această secreție extraflorală apare pe frunze în nopțile răcoroase ce urmează unor zile toride. Albinele o adună dimineața, grăbindu-se să o prelucreze în miere deoarece, odată cu încălzirea atmosferei,

partea apoasă se evaporă și nu o mai pot recolta. Mierea extraflorală are o greutate specifică mai mare decât a mierii obișnuite și o culoare puțin mai închisă. Față de mierea florală, aceasta are un conținut mai mare în zaharuri predominante (fructoză și glucoză), în unele zaharuri inferioare ca dextrina, melezitoza, precum și în săruri minerale.

❖ Mierea de mană

Este mult mai bogată în săruri minerale decât mierea florală, prezentând un mare interes terapeutic datorită cantităților mari de calciu și magneziu. Are o valoare deosebită pentru consumul uman și datorită conținutului mare de inhibină, care este un bactericid foarte puternic. Procentul redus de glucoză și bogăția în dextrine și substanțe minerale o păstrează ani de zile în stare lichidă. Uneori, mierea de mană este atât de vâscoasă, încât se extrage din celule prin topirea fagurilor.

Mierea de mană nu este recomandată ca hrană pentru albine pe timp de iarnă deoarece provoacă intoxicații grave, degenerescență și necroză. Aceste fenomene pot apărea și vara, pe timp de secetă. Însă, poate fi folosită mierea de mană de conifere al cărui conținut în zaharuri digestibile este mai mare, albinele de munte fiind obișnuite să consume o astfel de hrană.

Mierea de mană este de mai multe feluri în funcție de arborii de la care provine: de stejar, de brad, de molid etc. Mierea de mană a pinului este deschisă la culoare păstrându-și transparența și fluiditatea mult timp.

Mierea de brad are un gust dulce, deosebit, asemănător malțului, iar culoarea intensă poate ajunge până la negru (colorația este mai mare de 65 mm pe scara Pfund). Mierea de brad are o vâscozitate normală, un pH în jur de 5 și conductibilitate electrică ridicată, datorită conținutului mare în substanțe minerale. În compoziția ei domină fructoza în proporție de 37 %, urmată de glucoză - 32%, aproximativ 11% dizaharide și peste 10% melezitoză. Conținutul în apă este mic ajungând chiar mult sub 18%.

❖ Miere de afine

Această miere se obține din florile tufișurilor de afine și este o miere de culoarea ambrei cu gust plăcut de afine.

❖ Miere de mure

Nectarul este colectat de albine din florile tufișurilor de mure. Este de culoare aurie, fiind mult mai aromată și mai dulce decât alte sorturi de miere obținute din fructe de pădure.

❖ Miere de păpădie

Are o culoare galbenă intensă, asemănătoare florii din care provine, iar gustul este puternic erbaceu. Acest tip de miere cristalizează rapid.

❖ Miere de dovleac

Acest tip de miere sezonier provine din florile de dovleac, a cărui perioadă de înflorire este de scurtă durată, iar cantitatea de nectar per floare este relativ redusă. Mierea de culoarea ambrei întunecate și cu o aromă ușor florală se recoltează mai ales la începutul toamnei.

❖ Miere de portocale

Având ca și sursă diverse tipuri de citrice are un gust specific cu aromă fructată și o culoare deschisă. Acest sort de miere se extrage mai ales în Spania și Mexic, dar și în SUA.

❖ Miere de eucalipt

Țara de origine a acestei mieri este Australia, dar este produsă pe scară largă și în California. Deoarece provine de la o plantă ce cuprinde peste 500 de specii distincte și numeroși hibridi, culoarea și gustul variază foarte mult, tinzând în general spre un gust floral ușor mentolat.

❖ Miere de avocado

Se produce pe scară largă în sudul Mexicului, în America Centrală, Australia și alte regiuni tropicale. Este de culoare închisă și are o aromă foarte bogată.

❖ Miere de hrișcă

Mierea extrem de densă și închisă la culoare este produsă în Canada și SUA (Minnesota, New York, Ohio, Pennsylvania, Wisconsin). Mierea de hrișcă are în compoziția sa mult mai mulți antioxidanți decât alte tipuri de miere, fiind totodată foarte bogată în fier.

❖ Miere de manuka

Nectarul cules de albine pentru extragerea mierii este secretat de un arbore de ceai ce crește în regiunea de coastă a Noii Zeelande. Această miere unică în lume are puternice proprietăți antibacteriene, antivirale și antioxidante.

❖ Miere de castan

Mierile de nectar foarte pure sunt relativ deschise la culoare, deosebindu-se de amestecurile de miere de nectar și miere de mană care sunt mai închise. Gustul lor este foarte pronunțat și amar. În România extracția mierii se face în luna iunie, producția mierii de castan având o importanță deosebită.

În compoziția sa fructoza se găsește în cantitate mai mare decât glucoza ceea ce face să cristalizeze încet. Sunt bogate în diastază și în inhibină, iar conductibilitatea lor electrică este ridicată.

❖ Miere de rododendron

Aceste mieri sunt foarte deschise la culoare, cu gust dulce care cristalizează foarte încet fiind foarte bogate în fructoză și zaharoză. Mierea de rododendron toxică, din cauza prezenței în nectar a andromedotoxinei, provine de la specia *R. ponticum*, prezentă în Asia Mică.

❖ Miere de lavandă

Caracteristicile mierilor oținute din nectarul diferitelor specii și subspecii din genul *Lavandula* sunt diferite de cele ale mierilor extrase din nectarul hibridilor cultivați sub numele de lavandină. Având polenul foarte pigmentat, lavanda dă mieri mai colorate decât cele de lavandină, care este foarte deschisă la culoare. Cele mai închise mieri de lavandă ating 55 mm pe scara Pfund.

Indiferent de proveniență, mierile sunt foarte parfumate, cu aromă deosebită, conținutul în apă fiind în jur de 17%, cu un pH în jur de 3,5 și o aciditate totală relativ mare egală cu 34 meq./kg. Deoarece înflorirea lavandei și lavandinei are loc în plină vară, extragerea se face spre sfârșitul lunii august. În spectrul

zaharurilor levuloza se găsește în jur de 42%, glucoza 39%, iar dizaharidele, în special zaharoza, sunt în cantitate mare, de aproximativ 13%. Mierea de lavandină cristalizează mult mai repede și cu granulație fină față de mierea de lavandă fină.

Datorită conținutului scăzut în substanțe minerale conductibilitatea electrică este joasă. În ceea ce privește spectrul polinic, mierea de lavandă este bogată în polen de lavandă, dezvoltat normal, în timp ce polenul de lavandină este foarte puțin abundent. Alături de polenurile de lavandă sau de lavandină apar polenuri caracteristice florei țării din care se recoltează.

❖ Mierea de rozmarin

Este mierea extrasă de albine din nectarul plantei numită rozmarin, frecvent întâlnită în unele regiuni ale țării noastre și în diferite țări din bazinul mediteranean și a cărei înflorire durează din noiembrie până în mai, perioada maximă fiind în luna aprilie. Recoltarea acestei mieri se va face în mai. Conținutul în apă este mai mic de 17,5%.

Când sunt foarte pure, aceste mieri au gust foarte fin. Gustul se accentuează când mierea de rozmarin este combinată cu miere de cimbrisor, plantă care înflorește în aceeași perioadă și în aceeași zone ca și rozmarinul. Intensitatea culorii este de maximum 35 mm pe scara Pfund, pH-ul este în jurul valorii de 3,8, iar conținutul în substanțe minerale este scăzut. Conținutul în zaharuri este: 39% glucoză, 43% fructoză, 13% dizaharide (în special maltoză) și aproximativ 2% erloză.

Cristalizarea are loc rapid, granulele fiind de dimensiuni mici. Prin examinarea spectrului polinic al mierilor de rozmarin, se poate face deosebirea netă între mierile de rozmarin produse în diferite țări. Polenul de rozmarin poate fi reprezentat foarte diferit în funcție de regiunea de producție, fiind supus unor variații importante. O miere de rozmarin autentică poate să nu conțină mai mult de 10% polen de rozmarin, fiind un lucru obișnuit să se găsească mai mult de 30 de tipuri de polen în aceeași miere.

❖ Mierea de iarbă-neagră

Planta denumită iarbă-neagră (*Calluna vulgaris*) este o plantă comună care se găsește pe vaste terenuri silicioase formând un covor continuu sub pinii maritimi.

Mierea de iarbă-neagră devine inconfundabilă prin savoarea puternică, ușor amăruie și mirosul puternic de floare.

Conținutul de apă (în jur de 22-23%) al mierii de *Calluna* pură este anormal de mare pentru o miere obișnuită. Este tixotropă datorită unei proteine care se găsește în nectar și care poate ajunge până la 2% din greutatea mierii. Această structură de gel nu îi permite extracția din faguri prin metodele obișnuite. Pentru a putea fi adusă în starea de soluție se folosesc aparate speciale numite "perforatoare". Mierea de iarbă-neagră se poate obține în stare pură datorită acestei proprietăți uimitoare, prin extracția dublă. Încălzind încet mierea de iarbă neagră, se obține o gelificare mai intensă. Prin pasteurizare la 65°C timp de câteva minute sunt distruse drojdiile și are loc gelificarea, obținându-se o miere care se păstrează bine în ciuda unui procent de umiditate foarte ridicat.

Tixotropia mierii de iarbă-neagră are o influență deosebită asupra cristalizării. Cristalele cresc pe loc, formându-se cristalele care pot atinge 1 sau 2 mm în diametru fiind aglomerări aproape sferice și foarte dure. Colorația acestei mieri merge spre roșu atingând 85 mm pe scara Pfund. Conductibilitatea electrică și conținutul în substanțe minerale este ridicat pentru o miere de flori, pH-ul este

cuprins între 4 și 4,6. În spectrul zaharurilor predomină net fructoza. Această compoziție favorizează o viteză mică de cristalizare.

De asemenea, ca o caracteristică originală este conținutul foarte bogat în amilază. Spectrul polinic al mierii de iarbă-neagră poate fi mult modificat prin modul de extracție. Chiar și o miere foarte pură de iarbă-neagră poate să conțină ca polen dominant o specie total diferită, ca de exemplu polen de castan. O floră secundară destul de variată face deosebirea dintre mierile de iarbă-neagră provenite din regiuni sau țări diferite [1].

❖ Mierea de crușin (*Rhamnus frangula*)

Sunt mieri cu aromă foarte delicată, de culoare medie, având aceleași proprietăți medicinale ca și planta din care provin.

❖ Mierea de sparceta (*Onobrychis sativa*)

Mierile de sparcetă sunt de calitate bună, au o culoare puțin mai închisă decât cele de trifoi, dar sunt mult mai parfumate. Conținutul în apă este scăzut, iar cristalizarea se realizează relativ fin.

❖ Mierea de arbori fructiferi (*Prunus sp.*, *Pirus sp.* etc.)

Cel mai adesea, în România, aceste mieri provin de la merii din regiunile de deal cu inflorescență abundentă. Sunt mieri de calitate bună, deschise la culoare, rar se găsesc în stare pură, care cristalizează foarte repede cu granule fine.

❖ Mierea de măcăcine (*Rubus sp.*)

Este o miere de calitate bună, care cristalizează încet și care are o culoare deschisă.

❖ Mierea de pufuliță (*Epilobium spicatum*)

Se recoltează în stare pură pe scară largă în Marea Britanie și în câteva țări din nordul Europei. Aceste mieri deschise la culoare, de calitate excelentă și cu un gust agreabil cristalizează fin.

❖ Mierea de arbatus (*Arbatus unedo*)

Sunt mieri relativ pure care nu se recoltează decât în Corsica. Gustul foarte amar este bine cunoscut.

1.4.4. Mierea și beneficiile ei terapeutice

Mierea are numeroase beneficii terapeutice, fiind utilizată în pediatrie, la creșterea rezistenței la oboseală psihică și intelectuală, este recomandată în astenie, convalescență, anorexie, slăbire, întârzierea creșterii, dentiția deficitară, afecțiuni digestive, infecții intestinale, constipații, ulcerul gastric și duodenal, hepatita cronică, ciroza, afecțiuni cardiovasculare (reglează ritmul cardiac diminuând tensiunea arterială), metabolice, de nutriție, dermatologice (favorizează cicatrizarea), neuropsihice, stări depresive, insomnii, astm bronșic, diabet și intoxicații. Valorile nutritive ale mierii sunt extrem de importante.

Mierea este o sursă de energie datorită conținutului mare în zaharuri direct asimilabile de organism (glucoză, fructoză). Puterea superioară de îndulcire a mierii este dată de zaharoză. Fructoza, absorbită mai încet decât glucoza prin prezența ei în intestinul subțire influențează schimburile de apă, având efecte benefice la nivelul pH-ului și al florei intestinale. Prin natura lor, zaharurile din miere oferă o anumită

hepatoprotecție. Glucoza trece în sânge, iar fructoza este stocată în ficat, ea fiind baza unei rezerve de energie care se poate mobiliza rapid. Metabolizarea ei este în stransă relație cu o acțiune de dezintoxicare la nivelul ficatului, având puterea de a diminua efectele alcoolului asupra ficatului.

Mierea deține importante proprietăți antiseptice și antibacteriale. Efectul antiseptic este dat de activitatea redusă a apei care duce la formarea osmozei.

Polifenoli prezenți în miere sunt antioxidanți care ajută la prevenirea și tratarea anumitor boli precum și la întărirea sistemului imunitar. Conținutul de vitamina C existent în miere în cantități diferite în funcție de sursa de nectar, crește rezistența organismului la infecții, împiedică astenia și favorizează absorbția fierului.

Conținutul în numeroase minerale precum K, Na, Ca, Mg, participă în mod activ la construcția celulelor și țesuturilor, în timp ce altele cum sunt Fe, Cu, P, au rol în activarea celulelor vii influențând benefic reacțiile care stau la baza dereglării și utilizării energiei [1,2].

1.4.5. Proprietățile mierii

1.4.5.1. Proprietăți fizice ale mierii

- CULOAREA – este foarte diferită în funcție de tipul de miere, ea variază de la incolor până la neagră. Mierea de nectar este în general de culoare galbenă, rar se întâlnește nuanța maro până la verde.
- AROMA – depinde de speciile de plante de la care provine nectarul. Aroma este dată de conținutul de uleiuri eterice prezente în compoziția mierii.
- GUSTUL – este dulce, iar savoare este în funcție de proveniență și de compoziție. Acidul gluconic, prolina și taninurile influențează foarte mult gustul mierii. Atunci când în spectrul zaharurilor predomină fructoza mierea este foarte dulce. Prin fermentare primește un gust acrișor.
- VÂSCOZITATEA – este influențată de conținutul în apă și temperatură. Proaspătă, mierea se prezintă sub formă semilichidă, semitransparentă, densă care începe treptat să se cristalizeze și să se întărească.
- HIGROSCOPICITATEA – proprietatea mierii de a absorbi în anumite condiții umiditatea din aerul atmosferic.
- GREUTATEA SPECIFICĂ – se modifică în funcție de evoluția procentului de apă.
- DEVIEREA LUMINII POLARIZATE – indică natura zaharurilor din miere și prin aceasta posibilitatea stabilirii provenienței mierii.
- TURBIDITATEA – mierea naturală conține întotdeauna, în suspensie, particule solide sau materii coloidale fiind ușor turbure chiar dacă este bine filtrată.

1.4.5.2. Proprietăți chimice

Compoziția chimică a mierii este influențată de numeroși factori precum compoziția materiei prime (nectar sau mană), calitatea și abundența acesteia, clima, modul de exploatare a albinelor, modul de recoltare, condiționarea și conservarea mierii.

Compoziția chimică este complexă, cuprinzând grupe de substanțe anorganice și organice solubilizate sau dispersate în apa existentă în miere.

Constituenții majori ai mierii sunt apa și substanțele zaharoase. Acestea reprezintă 99% din compoziția ei.

Prin cantitatea de apă prezentă se poate aprecia gradul de maturitate a mierii și tot de conținutul în apă depinde conservarea și cristalizarea ei. În condiții optime umiditatea mierii conservate este cuprinsă între 17-18%.

Conținutul de apă al nectarului este de peste 50%, dar scade treptat pe măsură ce fagurii sunt umpluți, umiditatea ajunge la maximum 20% în momentul căpăcirii. Procentul de apă din miere este invers proporțional cu gradul de umplere al fagurilor. Datorită proprietăților higroscopice, o umiditate atmosferică ridicată determină creșterea umidității atât în stup, cât și în miere. În locurile de depozitare umiditatea atmosferică nu trebuie să fie mai mare de 60%. Mierea cu conținut ridicat de glucoză, este mai higroscopică ceea ce face ca perioada de conservare a acesteia să scadă. Pentru a elimina acest neajuns ea trebuie păstrată în vase etanșe și în încăperi uscate. Mierea cu un raport subunitar glucoză/fructoză poate fi destinată unei consum îndelungat. Deoarece substanțele zaharoase sunt principalii constituenți ai mierii, aceasta poate fi considerată o soluție concentrată de zaharuri.

Cele mai reprezentative glucide din miere sunt monozaharidele fructoză și glucoză și dizaharidul zaharoză format din legarea chimică a glucozei de fructoză. Specia florală influențează foarte mult raportul între aceste trei zaharuri, astfel că raportul fructoză/glucoză din miere depinde direct de compoziția nectarului. În mierea florală raportul este de 1,15, exceptând mierea de salcâm în care cantitatea de fructoză este mai mare și în care acest raport are valoarea de 1,35.

Odată cu scăderea conținutului de apă din miere crește conținutul de substanțe glucidice formându-se substanța uscată.

Cristalizarea este un fenomen natural pentru toate sorturile de miere florală românească cu excepția mierii monoflore de salcâm și a mierii de mană. Un conținut de apă peste limite normale întârzie declanșarea cristalizării, cristale nedistribuite uniform în toată masa.

O altă componentă chimică a mierii este Hidroximetilfurfurotul (HMF) care se formează prin transformarea monozaharidelor în prezența acizilor sub influența temperaturii. În momentul extracției conținutul în HMF este infim, acesta crescând în timpul depozitării și în special sub influența unor surse de căldură. După un an de zile conținutul în HMF nu depășește 1 mg/ 100 g produs în mierea păstrată în depozite răcoase.

Substanțele nezaharoase, reprezentate prin acizi organici, proteine, enzime, săruri minerale și vitamine determină valoarea biologică și specificul mierii, deși ele se găsesc în cantități reduse, de aproximativ 2%.

Fermenții (enzimele) sunt catalizatori biologici care din punct de vedere structural sunt compuși organici cu caracter proteic formați dintr-o componentă proteică (apoenzimă) și o coenzimă, care determină activitatea catalitică a enzimei. Acțiunea enzimelor este reversibilă, această proprietate se exercită atât asupra reacțiilor de descompunere, cât și asupra celor de sinteză.

Activitatea enzimelor este influențată de numeroși factori precum temperatura optimă de activitate, reacția mediului, influența razelor ultraviolete și prezența electroliților care pot stimula sau inhiba activitatea enzimelor. La 80°C enzimele sunt total distruse, iar la temperatură scăzută se conservă. Enzimele din miere au pH între 4-7, pH-ul mic favorizând activitatea invertazei, iar pH-ul mare, pe cea a amilazei.

Principalii fermenți din mierea de albine sunt carbohidrazele: invertaza, zaharaza și amilaza.

Invertaza și zaharaza acționează asupra zaharozei, scindând-o în glucoză și fructoză. Amilaza prin alfa amilaza (amilaza dextrinogenă) acționează asupra amidonului pe care îl transformă inițial în dextrine, iar în final în maltoză și beta amilaza (amilaza zaharogenă), care acționează asupra amidonului pe care îl transformă direct în maltoză.

Acizii din miere sunt acizi organici, care influențează pozitiv gustul și aroma, contribuind și la accentuarea efectului bacteriostatic.

Un important factor de tamponare a acidității mierii îl reprezintă elementele minerale care contribuie la realizarea echilibrului acid-bază. Predomină potasiul, dar în diferite cantități se mai găsesc și fier, fosfor, cupru, siliciu, sodiu, magneziu, aluminiu, mangan, clor, sulf precum și cantități infime de crom, litiu, nichel, plumb, cositor, zinc, argint, bariu, aur, germaniu, stronțiu, bismut, vanadiu, beriliu.

Valoarea mierii de albine este dată și de vitaminele prezente în compoziția ei care provin în exclusivitate din polenul și nectarul plantelor.

Principalele vitamine hidrosolubile sunt: Vitamina B1 (tiamină), Vitamina B2 (riboflavină), Vitamina B6 (piridoxină), Vitamina PP (niacină), Vitamina H (biotină), Vitamina B12 (cianocobalamină), Vitamina C (acid ascorbic), acid pantotenic, acid folic. Pe lângă acestea există și vitamine liposolubile precum Provitaminele A, Vitamina K.

În cantități mici, în miere se identifică și proteine, reprezentate de aminoacizii liberi proveniți fie direct din sursa de nectar, de mană, sau din secrețiile glandulare ale albinei. Cei mai importanți sunt: lizina, treonina, valina, metionina, izoleucina, leucina, fenilalamina, triptofan.

Lipidele sunt în cantități foarte mici, sub formă de acizi grași: oleic, lauric, stearic, linoleic.

Componentele microscopice ale mierii sunt constituite din granule de polen, cantități foarte reduse de ciuperci, alge, levuri, indicatorii de mană, granule de amidon precum și alte particule solide provenind de la recoltare. Mușcăiurile și gumele pot să depășească 5%. Prin prezența lor cresc vâscozitatea și dau mierii un aspect cleios, neplăcut.

1.4.6. Tehnologia recoltării și extracției mierii

1.4.6.1. Modul de execuție

Producerea mierii de către albine este un proces complex de transformare a materiei prime în miere, începând cu recoltarea și terminându-se cu căpăcirea celulelor din faguri. Cu ajutorul aparatului bucal (trompa) albinele lucrătoare adună nectarul sau mana, le amestecă cu salivă în gușă, după care transferă conținutul zaharat albinelor din stup ce îl prelucrează în continuare, până la obținerea produsului finit.

Culesul principal reprezintă sursa meliferă de la care albinele strâng cea mai mare cantitate de nectar dealungul anului. Culesul de producție se realizează atunci când timpul este prielnic și înfloritul nu este compromis, în aceste condiții recoltându-se cantități însemnate de miere.

De pe urma culesului de întreținere se obțin cantități ce pot fi consumate pe parcursul anului în familiile de albine.

Momentul încetării fiecărui cules de producție reprezintă o etapă importantă a anului apicol, când eforturile și priceperea apicultorului se vor converti în cantități mai mari sau mai mici de miere sau produse apicole. Încetarea culesului se poate aprecia în mod practic urmărind scăderea intensității de zbor a albinelor sau

indicațiile cântarului de control montat în stupină care determină intensitatea culesului prin diferențele în greutate înregistrate de cântar/unitatea de timp. De asemenea, în lipsa culesului albinele devin mult mai agresive, atacând persoanele aflate în raza lor de zbor. Momentul în care încetează culesul este deosebit de important în procesul de recoltare și extracție a mierii din faguri, deoarece extracția acesteia trebuie terminată cu câteva zile înainte de încetarea culesului de producție [17].

Acțiunea de recoltare a fagurilor din stup începe atunci când mierea este suficient de maturată. Acest fenomen se urmărește verificând fagurii la un interval de 2-3 zile, spre sfârșitul culesului principal, prin prezența coroanei cu miere căpăcită, existând astfel siguranța că prelucrarea enzimatică a mierii s-a finalizat, iar conținutul în apă a ajuns la maximum 18-20%. În timpul culesurilor recoltarea de la stupi se face spre seară, când zborul albinelor a încetat. Însă, în perioadele lipsite de cules recoltarea fagurilor cu miere se execută dimineața și foarte repede. Folosind afumătorul și dalta apicultorul controlează fiecare stup în parte în vederea recoltării fagurilor de miere. Pentru a nu afecta calitatea produsului se impune mânăuirea cu atenție a afumătorului, protejând astfel fagurii de funingine și praf. Pentru îndepărtarea albinelor se poate folosi și peria apicolă, însă cu mare atenție pentru a nu deprecia prin lovire fagurii.

Izgonirea albinelor de pe faguri la stupii de tip vertical în vederea sporirii productivității muncii se poate face prin folosirea podișoarelor prevăzute cu izgonitor. Metoda presupune folosirea de podișoare speciale prevăzute cu pânză de sac, care asigură reținerea și evaporarea rapidă a unor substanțe chimice insectifuge. Acestea fiind așezate deasupra corpului sau a magazinului determină albinele aflate în interior să retragă în corpurile sau magazinele inferioare într-un timp foarte scurt. Se mai poate folosi și izgonitorul cu jet de aer care este un aparat electric portabil, ce produce un jet de aer reglabil. Metoda prezintă avantaje față de folosirea substanțelor chimice întrucât familiile se reorganizează ușor, iar procesul de evaporare a apei din mierea necăpăcită este intensificat [18].

Apicultorul controlează fiecare stup în parte, depistând în vederea recoltării, mai întâi fagurii cu miere din magazinele sau corpurile superioare. Evitând strivirea albinelor se aleg din stupi ramele cu faguri destinați extracției, urmând ca recoltarea propriu-zisă a acestora să se efectueze după 1-3 zile. Nu se vor recolta fagurii ce conțin puiet necăpăcit întrucât prezența acestuia are în această perioadă o importanță deosebită pentru dezvoltarea familiei de albine. De asemenea, pentru a asigura cantitatea de miere planificată pentru iernarea familiilor de albine de la culesurile principale, apicultorul va alege în timpul lucrărilor de recoltare numărul necesar de rame, cu faguri uniform clădiți, de culoare mai închisă și miere complet căpăcită. Acești faguri vor fi lăsați în stup sau se vor depozita în condiții optime de dezinfectie și temperatură în încăperi bine aerisire până la folosire.

Recoltarea mierii în secțiuni are loc pe măsură ce fagurii unor secțiuni sunt complet căpăciți. Recoltarea acestora nu trebuie să se întârzie, întrucât menținerea lor depreciază aspectul secțiunilor, datorită albinelor din stup.

Fagurii care nu au fost complet căpăciți, se dau spre finisare celei mai puternice familii care eventual se hrănește cu miere extrasă de la același cules.

Fagurii recoltați din stup sunt introduși într-o lădiță de transportat rame, un magazin sau stup gol, bine închis și transportați din stupină în spațiul special amenajat pentru extracție.

Extracția cuprinde două operațiuni: descăpăcirea fagurilor și extragerea mierii.

Descăpăcirea fagurilor se face cu cuțitul, după care ramele se introduc în separatorul centrifugal. Fagurii se centrifughează până la extragerea totală a mierii. În mierea proaspăt extrasă se găsesc particule de ceară desprinse din fagure în momentul descăpăcirii, fragmente de propolis, mici cantități de polen, larve și alte impurități, de aceea aceasta nu poate fi direct îmbuteliată.

Prin condiționarea mierii se înțelege totalitatea procedurilor menite să asigure purificarea acesteia pentru păstrarea proprietăților fizico-chimice și biologice în perioada conservării. Cele mai importante etape din fluxul tehnologic de condiționare a mierii sunt prefiltrarea și limpezirea.

Operația de prefiltrare se realizează concomitent cu centrifugarea fagurilor, astfel fiind eliminate impuritățile grosiere din mierea extrasă.

O altă etapă importantă o reprezintă limpezirea mierii, care se realizează în vase mari smălțuite sau din inox, numite maturatoare, acoperite la gură cu tifon pentru protecție și în vederea evaporării surplusului de apă.

Impuritățile se separă, cele mai grele coboară la baza vasului, iar cele mai ușoare se ridică la suprafață de unde sunt înlăturate. Temperatura și înălțimea maturatorului influențează durata de limpezire astfel: un strat de miere cu înălțimea de un metru, la temperatura de 20°C se limpește în aproximativ 5 zile. Procesul tehnologic de condiționare se continuă cu filtrarea, deshidratarea, lichefierea, cupajarea și cristalizarea dirijată a mierii.

Prin filtrare se pierd 20-40% din substanțele valoroase, în special particulele fine de polen aflate în suspensie.

Depozitarea mierii se face în încăperi curate, uscate, fără mirosuri străine, bine aerisite și răcoroase (temperatura să nu depășească 14°C) [18,19].

1.4.6.2. Echipamente utilizate în apicultură la extracția mierii

În figurile 2- 5 sunt prezentate echipamentele utilizate în apicultură la extracția mierii:



Figura 2 - Fumător - fabricat din oțel inoxidabil



Figura 3 - Storcătoare de miere

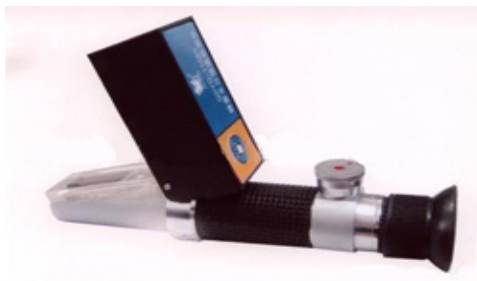


Figura 4 - Refractometru



Figura 5 – Diverse echipamente folosite la extracția mierii

1.4.6.3. Transformări ale mierii

Îmbătrânirea mierii

Mierea este considerată ca fiind neperisabilă, conservându-se practic la infinit. Este comercializată fără precauții, de la un an la altul.

Cristalizarea

Cristalizarea mierii este un fenomen natural care nu alterează calitatea produsului, având consecințe importante pentru conservarea ulterioară a mierii.

În faguri mierea este un produs lichid, toate zaharurile pe care le conține se găsesc sub formă de soluție în apă. Fiind o soluție suprasaturată, nestabilă, sub influența diferiților factori se declanșează cristalizarea zaharurilor. Unul dintre factori este temperatura, care prin scăderea ei agravează starea de suprasaturare a soluției favorizând cristalizarea. Un alt factor este existența unor germeni de cristalizare (cristale de glucoză microscopice, grăuncioarele de polen) care constituie amorsa fenomenului. Mierea cristalizează cu atât mai repede, cu cât conținutul de zaharuri puțin solubile în apă precum glucoza este mai mare, decât zaharurile foarte solubile (levuloză).

Starea lichidă a mierii se redă printr-o încălzire moderată care are ca efect trecerea zaharurilor în soluție.

Fermentarea

Este un proces nedorit care contribuie la degradarea mierii. În această situație mierea va avea întotdeauna o aciditate mai mare decât normală.

În toate mierile naturale există levuri și ciuperci microscopice care produc fermentările alcoolice. Conținutul scăzut în apă al mierii precum și concentrația mare

de zaharuri inhibă înmulțirea levurilor. Toate mierile care conțin mai mult de 18% apă sunt expuse la o fermentare mai mult sau mai puțin rapidă și mai mult sau mai puțin totală. Pe lângă levuri, pot apărea și alte microorganisme, ce pot să producă alte tipuri de fermentări (lactică, butirică, acetică), toate ducând la alterarea mierii.

Când mierea fermentează se constată formarea unei spume abundente provenită din degajarea de gaz carbonic.

Alte transformări

În funcție de compoziția și de temperatura de păstrare, în timpul îmbătrânirii, mierea suferă o serie de transformări. Pentru a bloca complet toate reacțiile enzimatice, mierea trebuie păstrată la temperatura de -25°C. În decursul unui an sau doi, la temperatură obișnuită, sau chiar scăzută (+4°C), pot să apară transformări sensibile. Culoarea se intensifică, crește aciditatea liberă, conținutul în invertază și amilază scade, ca și conținutul în glucoză, de asemenea, crește relativ rapid conținutul în hidroximetilfurfurol (HMF), substanța care se formează din levuloză în mediu acid. Conținutul în această substanță este practic nul în momentul recoltării, el crescând rapid sub acțiunea tratamentelor termice, spre exemplu, în cazul retopirii brutale. HMF servește ca indicator al stării de conservare a mierii, dacă acesta depășește 40 mg/kg, se consideră că mierea este improprie pentru consum.

Deoarece în timpul îmbătrânirii conținutul în inhibină scade, mierea își pierde în mod progresiv valoarea antibacteriană.

1.5. Sinteza principalelor legi, hotărâri și reglementări naționale și internaționale privind domeniul apiculturii

Uniunea Europeană este cea mai mare piață de miere din lume. Pentru a permite exportul de miere în UE țările exportatoare au nevoie să pună în practică legislația și metodele de control echivalente cu standardele UE.

Un rol important în procesul legislativ din Europa îl au Asociațiile de apicultură. De la nivel național la cel European, acestea pot influența reglementările și implementarea lor.

Alinierea la noua legislație europeană privind practicarea apiculturii, aduce după sine o serie de noutăți atât pentru apicultorul amator cât și pentru cel profesionist, dar și pentru procesator care este verigă principală în procesul de asigurare a securității alimentare.

Libertatea comerțului cu produse alimentare naturale de calitate, protecția alimentației și sănătății publice precum și asigurarea competitivității produselor alimentare se înscriu pe lista obiectivelor comisiilor internaționale în domeniul alimentației și sănătății publice.

Datorită evoluției noilor metode de analiză și a echipamentelor de laborator de înaltă performanță, comisiile internaționale de specialitate ale F.A.O./O.M.S. – Codex Alimentarius și Comisia U.E. pentru Alimentație, impun respectarea unor cerințe foarte stricte de calitate, prin noile condiții de garanție pentru produsele alimentare de origine animală [20,21].

„Industria” mierii se confruntă cu noi exigențe și aceasta deoarece este supusă la o serie de factori de agresiune precum poluarea mediului ambiant, nerespectarea tehnologiilor corecte de creștere și tratare a familiilor de albine, condițiile de producție sau adaosurile de falsificare.

Controlul calității mierii este reglementat la nivel internațional de către comisia F.A.O. / O.M.S. – Codex Alimentarius Standard, regional (european) de către Comisia Uniunii Europene pentru Alimentație prin Directivele C.E. și național de către Ministerul Agriculturii, Ministerul Sănătății și A.C.A. România prin: I.C.D. Apicultură, respectiv Complex Apicol – Standarde naționale, Standarde de Firmă, Legi, Ordine ale ministerelor de resort.

Normativele de calitate ale mierii se referă la natură, origine și compoziție, la parametri de calitate, la reguli privind igiena (Reguli de Bună Practică) și controlul oficial al calității mierii, la ambalare, depozitare și la contaminanții mierii [22,23].

De asemenea, aceste norme cuprind limitele maxime admise pentru metale grele (Pb, Cd, Zn, Fe, Hg), pesticide, substanțele medicamentoase de uz veterinar (în particular antibioticele) în miere, precum și metode generale pentru analiza contaminanților.

Este foarte important să se cunoască parametri de calitate ai mierii reglementați la nivel național și european, cauzele care conduc la modificarea valorilor normale ale respectivilor parametri și efectele negative asupra calității mierii.

De asemenea trebuie să se respecte metodele de creștere și tratare a familiilor de albine, modul de amplasare a stupilor în zona meliferă și respectiv condițiile de producție [24].

Uniunea Europeană stabilește prin regulamente definirea, clasificarea și modul de prezentare. Regulamentul (CEE) nr. 1234/2007 stabilește definițiile privind produsele din sectorul apicol, clasificarea categoriilor de miere după origine, producere, precum și modul de prezentare a produsului finit.

Prin directive verticale sunt stabilite definiții, denumiri și compoziția sorturilor de miere. Directiva 2001/110/CE a Consiliului din 20 decembrie 2001 privind mierea, publicată în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene L 10/47, 12.1.2002, stabilește principalele tipuri de miere, denumirea produselor și caracteristicile acestora precum și criteriile de compoziție pentru miere (umiditate, zahăr, conductivitate electrică, acid liber, conținut de hidroximetilfurfural (HMF)). Existând o strânsă legătură între originea mierii și calitatea sa, este necesară furnizarea unor informații complete cu privire la calitatea produsului.

Legislația națională stabilește norme privind denumirea, descrierea, definirea, caracteristicile și compoziția mierii prin Ordinul 522/798/317/2003 al ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor, al sănătății familiei și al președintelui Autorității Naționale pentru Protecția Consumatorilor pentru aprobarea Normelor cu privire la natura, conținutul, originea, prezentarea, compoziția, calitatea și etichetarea mierii. Acest Ordin transpune în legislația națională Directiva 2001/110/CE.

Majoritatea legilor și reglementărilor din legislația românească reprezintă transpuneri ale legislației europene.

În continuare sunt redate principalele legi în domeniul apiculturii:

- Ordinul 30 din 8 februarie 2005

În temeiul art. 10 lit. b) din Ordonanța Guvernului nr. 42/2004 privind organizarea activității sanitar-veterinare și pentru siguranța alimentelor, aprobată cu modificări prin Legea nr. 215/2004, cu modificările și completările ulterioare, văzând Referatul de aprobare nr. 30.600 din 7 februarie 2005, întocmit de Direcția generală siguranța alimentelor din structura Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru

Siguranța Alimentelor, președintele Autorității Naționale Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor a emis Ordinul nr. 30 din 8 februarie 2005 privind aprobarea Normei sanitare veterinare referitoare la măsuri care îmbunătățesc condițiile generale pentru producerea și comercializarea produselor de apicultură. Actul a fost publicat în Monitorul Oficial 131 din 11 februarie 2005.

- Lege apicultură 89 din 1998
LEGEA nr. 89 din 28 aprilie 1998 a apiculturii, cu modificările și completările ulterioare, a fost publicată în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 170 din 30 aprilie 1998.
- Ordinul 522/798/317 din 2003
Este ordin comun al ministrului agriculturii, pădurilor, apelor și mediului, ministrului sănătății și al președintelui autorității naționale pentru protecția consumatorilor nr. 522/798/317 din 2003 pentru aprobarea Normelor privind denumirea, descrierea, definirea, caracteristicile și compoziția mierii, a fost publicat în Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 650 din 12 septembrie 2003.
- Ordin nr.122/298 din 2001
Ordinul nr.122/298 din 2001 al ministrului agriculturii, alimentației și pădurilor și al ministrului sănătății și familiei pentru aprobarea Normelor cu privire la natura, conținutul, originea, prezentarea, compoziția, calitatea și etichetarea mierii a fost publicat în M.Of. nr. 610/27 sep. 2001.
- Hotararea nr. 402 din 1 aprilie 2009
Această hotărâre s-a aprobat pentru modificarea și completarea anexelor nr. 1 și 2 la Hotararea Guvernului nr. 556/2008 privind aprobarea Programului național apicol pentru perioada 2008-2010, precum și a normelor de aplicare a acestuia. Actul a fost publicat în Monitorul Oficial Nr 251 din 15 aprilie 2009.
- Hotararea nr. 556 din 28 mai 2008
Hotararea nr. 556 din 28 mai 2008 privind aprobarea Programului național apicol pentru perioada 2008-2010, precum și a normelor de aplicare a acestuia a fost publicat în Monitorul Oficial Nr. 416 din 3 iunie 2008.
- Legea nr. 492/2006
În temeiul art. 108 din Constituția României, republicată, în conformitate cu prevederile art. 105-110 din secțiunea VI „Dispoziții speciale privind sectorul apicol” a Regulamentului Consiliului Uniunii Europene nr. 1.234/2007 de instituire a unei organizări comune a piețelor agricole și privind dispoziții specifice referitoare la anumite produse agricole, publicat în Jurnalul Oficial al Uniunii Europene nr. L 299 din 16 noiembrie 2007, precum și cu ale Deciziei Comisiei Europene din 17 august 2007 privind aprobarea Programului de îmbunătățire a producției și a comercializării produselor apicole, elaborat de România în temeiul Regulamentului Consiliului nr. 797/2004, având în vedere prevederile Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 67/2006 privind gestionarea fondurilor nerambursabile destinate finanțării politicii agricole comune alocate de la Comunitatea Europeană, precum și a fondurilor de cofinanțare și prefinanțare alocate de la bugetul de stat, aprobată cu modificări prin Legea nr. 492/2006, cu modificările și completările ulterioare.

- Hotărârea 213 din martie 2010
- Regulamentul (CE) Nr. 470/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 6 mai 2009 de stabilire a procedurilor comunitare în vederea stabilirii limitelor de reziduuri ale substanțelor farmacologic active din alimentele de origine animală
- Ghidul CRL 37/decembrie 2007 referitor la limitele reziduurilor de medicamente, elaborat de Laboratorul European de referință.

1.6. Indicatori de calitate ai mierii

Standardele de calitate a mierii cerute de Uniunea Europeană sunt foarte stricte, calitatea mierii implică în primul rând absența antibioticelor și a altor reziduuri, dar și atingerea altor parametri de calitate care se pot obține prin aplicarea unei corecte tehnici apicole.

Un rol important în obținerea unei mierii de calitate îl are maturarea naturală în faguri datorită aromei specifice pe care mierea o primește după căpăcire. Un alt factor important este acela de a asigura familiilor de albine necesarul de faguri în care nu a crescut puiet evitându-se astfel deprecierea culorii.

Nu este permisă hrănirea albinelor cu cantități mari de sirop de zahăr în ajunul culesurilor, acest fapt nu face decât să deprecieze mierea, de aceea zahărul trebuie folosit doar în perioada de toamnă pentru completarea rezervelor de hrană [25]. Este indicat a se face extracția după fiecare cules pentru a se obține mierea pe sorturi de floră.

Aprecierea calității mierii se face printr-o serie de caracteristici precum culoare, aspect, miros, gust și consistență [26].

Mierea trebuie să fie lipsită de spumă, să nu cuprindă corpuri străine vizibile, mușegai, insecte, puiți, albine moarte sau alte impurități. Culoarea este de la slab incolor până la galben-deschis, galben-auriu, galben-portocaliu, galben-închis, rubiniu, galben-brun, brun-închis. Gustul și mirosul este specific mierii, cu o aromă care depinde de tipul de floră de unde albinele culeg nectarul. Mierea trebuie să fie omogenă, fluidă, vâscoasă, sau cristalizată.

Este foarte important să se cunoască parametrii de calitate ai mierii reglementați la nivel național și european și totodată să se cunoască cauzele care duc la modificarea valorilor normale ale parametrilor precum și efectele negative asupra calității mierii [26].

1.6.1. Calitatea organoleptică

O importanță deosebită în stabilirea autenticității produselor o are analiza senzorială de apreciere a proprietăților organoleptice, în clasificare și standardizare, precum și în decelarea prospețimii, defectelor și a altor neajunsuri mai greu sesizabile prin celelalte mijloace.

Principiile de analiză senzorială a mierii de albine sunt redată în STAS 784/3 – 1989 [27].

Într-o primă etapă se examinează proba ca atare urmărindu-se dacă prezintă spumă și/sau alte impurități, felul cristalizării și forma cristalelor.

Mierea omogenizată se filtrează și se lasă în repaus pentru eliminarea aerului înglobat, până la limpezirea completă, după care se examinează complet: aspect, consistență, culoare, miros și gust.

Aspectul se apreciază după gradul de transparentă urmărindu-se în mod detaliat diferitele nuanțe, strălucirea, opalescența sau turbureala mierii. Culoarea se stabilește examinând în mod direct proba.

Consistența se apreciază după modul de curgere a mierii precizându-se starea respectivă: apoasă, fluidă-subțire, fluidă-vâscoasă, cleioasă.

Mirosul și gustul se apreciază prin mirosirea și gustarea probei. Pentru mierea polifloră se identifică aroma dominantă. Intensitatea acesteia poate fi pronunțată, bine evidențiată, moderată sau discretă. De asemenea, gustul dulce se apreciază ca fiind pronunțat, bine evidențiat, moderat și cu posibile nuanțe secundare precum acrișor, amărui, astringent, fad etc.

1.6.2. Calitatea fizico – chimică

Conform STAS 784/3-1989 [27], excepție făcând mierea de salcâm și cea de mană care se împarte în trei categorii (calitate superioară, calitatea I și calitatea a II- a), celelalte tipuri de miere se livrează în două calități: I și a II-a.

Principalele caracteristici fizico-chimice urmărite sunt: apa (%), aciditatea, zahăr reducător, exprimat în zahăr invertit (%), zahăr ușor hidrolizabil, exprimat în zaharoză (%), indice amilazic, cenușa (%). Mierea mai conține o serie de compuși importanți cum ar fi: substanțe proteice în medie 0,5% la mierea florală și în cantități mai mari la cea de mană, un spectru larg de microelemente (beriliu, galiu, vanadiu, zirconiu, nichel, argint s.a.), vitamine (B1, B2, B6, C, K, PP, H), mici cantități de acizi organici (malic, citric, lactic, oxalic, succinic), gume vegetale numite impropriu dextrine, substanțe colorante și odorante.

Calitatea superioară la mierea de salcâm se exprimă prin: apă max. 20%; aciditate max 4, ml NaOH sol.1N/100g, minimum 70% zahăr reducător, zahăr ușor hidrolizabil exprimat în zaharoză max 5 %, min 6,5 indice amilazic, cenușă în procent de max. 0,5 [28].

1.6.3. Calitatea igienică

Microorganismele din miere provin din nectar și polen, din sălile de lucru, de pe aparatele insuficient spălate sau de la ambalaje. În cantități mici în miere sunt prezente drojdiile în special *Saccharomyces melis*, care se dezvoltă în medii în care conținutul în apă este mai mare de 20-25% și *Saccharomyces rosei*, capabilă să fermenteze medii cu 60% glucide. Drojdiile pot da defecte de natură microbiologică la temperaturi mai mari de 15^o C.

Prin contaminare cu praf în miere pot să apară fungii filamentosi care în stare vegetativă sunt capabili să metabolizeze glucidele, aminoacizii și chiar polenul, fiind responsabili de diverse modificări organoleptice precum gust și miros de mucegai [29].

În tabelul 6 sunt redați parametrii fizico–chimici de calitate pentru miere:

Tabelul 6 - Parametrii fizico–chimici de calitate pentru miere

Parametrul	Standard European (European Honey Directive of the European Honey Commission)	Standard international (Codex Alimentarius Standard of F.A.O. / O.M.S Commission)
Conținutul de apă, % (g/g), maxim	21 g /100 g	21 g /100 g
Zahăr direct reducător, exprimat în zahăr invertit, (%, g/g), minim Miere de flori Miere de mană	65 g / 100 g 60 g / 100 g	65 g / 100 g 45 g / 100 g
Zahăr ușor hidrolizabil, exprimat în zaharoză, (% g/g), maxim General Miere de mană Miere de salcâm, lavandă, lucernă, portocal, rozmarin și dulcișor	5g/100g 10g/100g 10g/100g	5g/100g 15g/100 g 15g/100 g
Substanțe insolubile în apă, % (g/g), maxim	0,1g/100 g	0,1g/100 g
Conținutul de elemente minerale – cenușa, (% g/g), maxim General Miere de mană	0,6 g/100g 1g/100 g	0,6 g/100g 1,2 g/100g
Conținut de HMF, mg/kg, maxim	10 mg/Kg / (40)	10 mg/Kg / (40)
Indicele de culoare, mm pe scara Pfund Miere de salcâm, maxim Miere de mană, minim	12 65	12 65

Contaminanții mierii sunt redați în tabelul 7:

Tabelul 7 - Parametrii de calitate pentru miere – contaminanții mierii

Parametrul analizat		Standard European (European Honey Directive of the European Honey Commission)	Standard International (Codex Alimentarius Standard of F.A.O. / O.M.S Commission)
Reziduuri de pesticide organoclorurate, mg/kg, maxim	α - HCH	0,01	0,01
	β - HCH	0,01	0,01
	Lindan	0,01	0,01
	DDT - total	0,05	0,05
	PCB	Absent / (0,20)	Absent / (0,20)
	alte pesticide (Aldrin, Dieldrin, Endrin, Hexaclorbenzol)	0,20	0,20
Reziduuri de pesticide organofosforice*, mg/kg, maxim		0,02	0,02
Contaminare radioactivă, Bq / kg, maxim		10	10
Reziduuri de metale grele			
Plumb, mg/kg, maxim		0,20	0,20
Arsen, mg/kg, maxim		0,10	0,10
Cupru, mg/kg, maxim		0,50	0,50
Cadmium, mg/kg, maxim		0,02 / (0,20)	0,02 / (0,20)
Zinc, mg/kg, maxim		1,00 / (3,00)	1,00 / (3,00)
Mercur, mg/kg, maxim		0,01	0,01
Fier, mg/kg, maxim		1,00	1,00
Fenol, µg/kg, maxim		50	50
Etilendibromid, µg/kg, maxim		5	5
Coumaphos, µg/kg, maxim		50 / (100)	50 / (100)
Fluvalinat, µg/kg, maxim		10 / (50)	50 / (50)
Flumetrin, µg/kg, maxim		50	50
Clordimeform (CDF), µg/kg, maxim		Absent / (10)	Absent / (10)
Carbandazin, µg/kg, maxim		Absent	Absent
Naftalină, µg/kg, maxim		Absent	Absent
Amitraz, µg/kg, maxim		50 / (200)	50 / (200)
Cymiazol, µg/kg, maxim		50 / (100)	50 / (100)
Reziduuri de substanțe medicamentoase, µg/kg, maxim			
Cloramfenicol, µg/kg, maxim		Absent	Absent
Nitrofuran* (metaboliți), µg/kg, maxim		Absent	Absent
Streptomycină, µg/kg, maxim		Absent / (40)	Absent / (40)
Tetracilină, µg/kg, maxim		Absent / (20)	Absent / (20)
Sulfonamide, µg/kg, maxim		Absent / (10)	Absent / (10)

Eritromină, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Penicilină V, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Penicilină G, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Oxacilină, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Nafcilină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Dicloxacină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Cloxacilină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Ampicilină, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Amoxicilină, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Clindamicină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Kitasamicină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Spiramicină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Ciprofloxacină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Piperacilină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Dapsonă*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent
Tylosină*, $\mu\text{g}/\text{kg}$, maxim	Absent	Absent

* Phosdrin, Phorate, Ronnel, Paration, MetilParation, Malation, Etion, Diclorvos, Oxiclordan, Aldicarb, Tetramethrin

Cauzele și efectele negative posibile pe care contaminanții le pot produce asupra calității mierii sunt redată în tabelul 8:

Tabelul 8 - Cauzele și efectele negative posibile asupra calității mierii

Cauza	Efecte negative posibile asupra calității mierii
Extracția mierii din faguri necăpăciți sau incomplet căpăciți	Conținut mare de apă în miere (peste 20%) Alterarea fermentativă a mierii Modificarea caracteristicilor organoleptice (culoare, gust, miros) și caracteristicilor fizico-chimice (aparitia unor compuși nespecifici compoziției naturale a mierii)
Extracția mierii din faguri în condiții de umiditate atmosferică excesivă (timp ploios sau după ploaie)	
Depozitarea mierii în recipiente defectuos închise, sau în spații de depozitare umede și neaerate	
Depozitarea mierii în recipiente defectuos închise, sau în spații de depozitare umede și neaerate, nerespectarea condițiilor igienice din timpul extracției, condiționării și ambalării mierii	
Falsificarea mierii prin adăugare de apă, ceaiuri, arome sau/și siropuri concentrate de fructe	Modificare caracteristici organoleptice (culoare, gust, miros) și caracteristici fizico-chimice (aparitia unor compuși nespecifici compoziției naturale a mierii)
Depozitarea mierii în ambalaje improprie, murdare sau în care s-au păstrat alte substanțe	
Depozitarea recipientilor cu miere în bătaia soarelui, în apropierea surselor de căldură – pe timp îndelungat	
Nerespectarea parametrilor optimi de	Modificare caracteristici organoleptice (culoare, gust, miros) și fizico-chimice (conținut mare de HMF, conținut mic de enzime,

lichefiere a mierii	concentrațiile de fructoză și glucoză)
Extracția mierii din faguri necăpăciți	Modificare concentrație de fructoză, glucoză și zaharoză
Falsificarea mierii cu sirop de zahăr invertit artificial, glucoză industrială, sirop de porumb industrial, arome de fructe, ceaiuri, siropuri concentrate de fructe	
Nerespectarea parametrilor optimi de lichefiere a mierii	
Folosirea de faguri vechi în timpul culesului	Închiderea culorii mierii
Depozitarea mierii ce conține impurități (cadavre albine) în cantitate mare	Modificarea caracteristicilor organoleptice (miros, culoare) și fizico-chimice (compuși noi)
Folosirea de materiale improprii pentru afumarea familiilor de albine (în timpul lucrului în stup)	

Și în situația substanțelor cu potențial nociv pentru miere este importantă cunoașterea cauzelor care conduc la contaminarea mierii cu reziduurile unor astfel de substanțe [30]. Aceste cauze-efecte sunt prezentate în tabelul 9:

Tabelul 9 - Cauzele și efectele negative posibile pe care le pot produce asupra calității mierii

Cauza	Efecte negative posibile asupra calității mierii
Amplasarea stupilor în apropierea zonelor urbane, cu trafic auto intens, sau zone industrializate	Contaminarea mierii cu metale grele, prezente în concentrații posibil dăunătoare sănătății <ul style="list-style-type: none"> • din aer – circuit: plantă (nectar/mană/polen) → albine → produs finit: miere; • din recipienti (reacții chimice componente material – acizii din miere).
Folosirea pe întreg circuitul mierii de obiecte sau recipiente confecționate din materiale improprii (inacceptabile)	
Amplasarea stupilor în apropierea culturilor agricole, plantațiilor de pomi fructiferi și/sau viță de vie, pădurilor tratate cu pesticide	Contaminarea mierii cu pesticide <ul style="list-style-type: none"> • din aer – circuit: plantă (nectar/mană/polen) → albine → produs finit:miere; • din sol; • din apa din apropierea stupinei.
Folosirea repelenților în timpul operației de scoatere a fagurilor cu miere din stup	
Folosirea substanțelor organice de sinteză de tipul: naftalinei, etilen bibromidului, para-diclorbenzolului pentru protecția fagurilor pe durata depozitării acestora (împotriva moliei cerii)	Contaminarea mierii cu substanțe chimice de sinteză (din faguri în miere)
Folosirea antibioticelor în hrănirile de stimulare a dezvoltării albinelor	Contaminarea mierii cu reziduuri de substanțe medicamentoase de uz veterinar
Folosirea preventivă a substanțelor	

medicamentoase de uz veterinar pentru prevenirea unor boli ale albinelor	
Folosirea de alte produse medicamentoase de uz veterinar decât cele autorizate a se folosi pentru combaterea bolilor albinelor	
Nerespectarea instrucțiunilor de folosire din pliantul produsului (perioada de administrare, doza, timpul de așteptare)	
Amplasarea stupilor în apropierea unor culturi agricole, plantații pomicole tratate cu produse pe bază de antibiotice, pentru combaterea unor boli ale acestora – cazul produselor pe bază de streptomycină folosite pentru combaterea „focului mălurii”, o devastatoare boală a pomilor fructiferi (mai ales în perioada de înflorire) provocată de <i>Erwinia amylovora</i>)	

Mierea care se comercializează în România trebuie să îndeplinească următorii parametri de calitate:

- apă - max. 20 %;
- densitate relativă la 20°C- 1,417;
- cenușă - max. 0,5 %;
- zahăr invertit - 75 %;
- zaharoză - max. 7 %;
- indice diastazic - min.10,9;
- HMF - max.1 %;
- indice colorimetric - max. 12;
- zahăr artificial - lipsă;
- glucoză - lipsă;
- alte adaosuri - lipsă;

Pentru a îndeplini condițiile de calitate nu se fac tratamente preventive cu antibiotice, acestea folosindu-se în stupină doar pentru tratarea albinelor în cazul lozii americane, când se știe că mierea este compromisă calitativ. Pentru a ajunge la un conținut de apă în miere sub limita de 19 % este nevoie ca recoltarea fagurilor să se facă atunci când sunt căpăciți trei sferturi. Condiționarea și depozitarea mierii se face conform regulilor tehnologice și de igienă impuse [30].

Se asigură culesuri de nectar de la surse necontaminate industrial sau cu pesticide.

1.6.4. Defectele și falsificarea mierii

Defectele mierii pot fi de mai multe feluri: vizuale, olfactive, gustative și tactile.

Defectele vizuale apar atunci când cristalizarea este incompletă sau eterogenă, cu granulație medie sau grosieră, dacă există impurități în suspensie sau la suprafața mierii, când fluiditatea este excesivă, sau dacă apar pete albe pe pereții borcanelor. Apariția acestor defecte pot fi influențate și de apariția la suprafață a spumei, de separația în straturi sau de o colorație anormală [31].

Defecte olfactive se datorează diferitelor mirosuri parazite cum ar fi cele de fum, saci vechi, fenol, miere coaptă sau oricărui alt miros străin [31].

Defecte gustative pot fi: gust înțepător de fum, gust metalic, aromă de caramel (supraîncălzire), aciditate excesivă, amăreală sau orice alt gust străin.

Defecte tactile apar când cristalizarea este foarte fermă, cu structuri aglomerate și cristale sferice, unghiulare sau cu granule fine, medii, grosiere.

Falsificarea se face direct sau indirect. Metodele directe se aplică în vederea corectării gustului, consistenței, culorii sau pentru neutralizarea acidității.

Pentru corectarea gustului se folosesc substanțe îndulcitoare zaharate precum zahărul alimentar, zahărul invertit artificial, glucoza industrială sau melasa. Se mai utilizează și substanțele îndulcitoare sintetice: zaharina, dulcina, glicerina.

Corectarea consistenței se face cu amidon, gelatină, clei, substanțe pectice sau gume.

Culoarea poate fi corectată prin adăugarea de caramel sau culori de anilină.

Fermentarea se împiedică prin adăugarea în miere a acidului salicilic sau a acidului benzoic.

Pentru neutralizarea acidității se folosește bicarbonat de sodiu, hidroxid de sodiu sau carbonat de sodiu.

O metodă indirectă de falsificare a mierii este hrănirea cu zahăr a albinelor [32].

1.6.5. Metode de examinare și analiză a mierii

Examinarea mierii se execută pentru aprecierea calității și purității mierii, pentru stabilirea stării de degradare și pentru depistarea falsificărilor, prin determinarea valorilor indicatorilor de calitate .

Prin examenul organoleptic se identifică culoarea, mirosul, gustul, consistența și puritatea mierii.

Culoarea se apreciază prin examen vizual pe o cantitate de 10-15 g de miere sau cu ajutorul melascopului, aparat ce stabilește nuanțele mierii. Rezultatele examinării se exprimă în: incoloră, galben-deschis, aurie, portocalie, verzuie, roșcată, brună.

Mirosul și gustul se apreciază prin mirosire și degustare, indicându-se denumirea plantei dominante și proveniența. Termenii folosiți pentru a indica gustul și mirosul sunt plăcut, dulce, slab aromat, etc. Se identifică și posibilele particularități negative: acrișor, amărui, astringent.

Consistența mierii se apreciază după modul de scurgere și poate fi uniformă, fluidă, vâscoasă, cu diferite aspecte de cristalizare. Mierea cristalizată are diferite particularitățile structurale putând fi untoasă, cristalizată fin, cristalizată nisipos, cu critale grosiere.

Puritatea se apreciază prin examinarea probei la lumina directă a zilei pentru a se identifica fragmente de albine moarte, de ceruri sau alte impurități.

Examenul microscopic constă în analizarea sedimentului depus dintr-o soluție de 10 g de miere în 20 ml apă distilată. Se omogenizează și se toarnă în fiole care se centrifughează timp de 4 minute, cu 2.500 rotații pe minut. Se decantează apoi 2/3 din conținut, iar restul din fiole se amestecă, se omogenizează și se centrifughează din nou, în aceleași condiții. Se face din nou decantarea, iar sedimentul se întinde pe 2 lame. Se pune apoi, în picături o soluție caldă de glicerină – gelatină 1:1, iar deasupra se aplică o lamelă. Preparatul se fixează în poziție orizontală la temperatura de 42°C timp de 20 minute. Examinarea se face la microscop stabilindu-se proveniența grăuncioarelor de polen, precum și a celorlalte componente din preparat [33].

Mierea fluidă se omogenizează înainte de analiză, iar mierea cristalizată se încălzește în prealabil la aproximativ 45°C după care se amestecă [33].

- Conținutului de apă se determină cu refractometrul. Pe prisma inferioară a refractometrului, se aplică o picătură din proba de miere și cu ajutorul oglinzii se orientează un fascicul de lumină. Indicele de refracție se citește pe scală, iar cu ajutorul tabelelor care însoțesc refractometrele se stabilește procentul de substanță uscată, respectiv conținutul mierii în apă. Unele refractometre pot citi direct pe scală procentul de apă. La mierea de albine, umiditatea nu trebuie să depășească 20%.
- Greutatea specifică a mierii se poate determina prin cântărire.
- Pentru determinarea cenușii se calcinează 10g miere, într-un creuzet. Se evaporă pe o baie de apă, se carbonizează la o flacără slabă și apoi se calcinează. Se răcește și se cântărește treptat, până se ajunge la masă constantă. Procentul de cenușă este calculat după formula (1):

$$\% \text{ cenușă} = m_1 / m \times 100 ; \quad (1)$$

unde: m_1 - masa cenușii, în g
 m - masa mierii analizată, în g

Pentru aprecierea gradului de prospețime a mierii se determină aciditatea, exprimată în grade de aciditate, adică numărul de cm³ de NaOH n / 10 necesari să neutralizeze aciditatea din 10 g miere.

➤ Aciditatea se determină astfel: în 50 ml apă distilată călduță la 40-50°C se dizolvă 10 g miere (cântărită cu precizie de 0,01 g). Se amestecă și se adaugă 2-3 picături de fenolftaleină. Se titrează până la apariția unei colorații roz, care trebuie să persiste 30 secunde. Volumul în ml de hidroxid de sodiu folosit la titrare, reprezintă aciditatea mierii, exprimată în grade de aciditate. Valoarea acidității la mierea florală este de 4 grade de aciditate, iar la mierea de mană de 5.

➤ Zahărul invertit se determină prin reacția Elser. Glucoza și fructoza în stare liberă au capacitatea de a reduce sulfatul de cupru în mediu alcalin și la cald, transformându-l în oxid cupros. Cantitatea de oxid cupros ce se transformă este proporțională cu concentrația celor două zaharuri reducătoare.

Reactivii folosiți sunt: soluție de sulfat de cupru (50 g sulfat de cupru la 1000 ml apă distilată); soluție apoasă alcalinizată de sare Seignette – tartrat de sodiu și potasiu, 25 g carbonat de sodiu, 15 g hidroxid de sodiu se dizolvă în apă distilată și se aduce la 1000 ml); soluție saturată și acidulată de clorură de sodiu (la 1000 ml soluție saturată de clorură de sodiu se adaugă 250 ml soluție apoasă de acid clorhidric 10 %); bicarbonat de sodiu p.a. soluție de iod 0,05 n; soluție de amidon 1 % proaspăt preparat și soluție de tiosulfat de sodiu 0,05 n.

Într-un balon cotat de 200 ml se cântăresc 3 g miere (cu precizie de 0,0002) și se completează cu apă până la semn. Se iau 20 ml din soluția obținută și se introduc într-un balon cotat de 100 ml completându-se cu apă până la semn.

Într-un alt balon se introduc 20 ml soluție de sulfat de cupru, 20 ml soluția de sare Seignette și 20 ml apă distilată. Se încălzește acest amestec până la fierbere, când se adaugă încă 20 ml din soluția diluată de miere și se mai lasă timp de 5 minute la fiert. După răcire timp de aproximativ un minut, se adaugă 20-25 ml soluție de NaCl. Rezultă o soluție limpede ce arată faptul că soluția de sare dizolvă complet oxidul de cupru format.

Neutralizarea excesului de HCl se face prin adăugarea de bicarbonat de sodiu în exces. După neutralizare trebuie să rămână un rest vizibil pe fundul balonului și se titrează cu soluție de iod până ce turbureala formată dispăre, apărând o colorație verde. Prin adăugarea de amidon 1% în picături, se colorează în alb, apoi se retitrează cu o soluție de tiosulfat de sodiu până ce culoarea verde revine.

Numărul de ml soluție de iod utilizați pentru oxidarea cationului cupros se obține făcându-se diferența dintre numărul de ml soluție de iod și numărul de ml soluție de tiosulfat de sodiu folosit pentru titrarea excesului de iod [14,34,35].

Cantitatea de zahăr invertit în mg, corespunzător numărului de ml soluție de iod, folosită pentru oxidare se calculează astfel:

$$\% \text{ zahăr invertit} = \frac{m \cdot 10 \cdot 5}{3 \cdot 10} \cdot 100 = \frac{5 \cdot m}{3}; \quad (2)$$

Unde :

- m - este cantitatea de zahăr invertit (în mg)
- 10 reprezintă raportul dintre greutatea balonului cotat de 200 ml și greutatea soluției luate pentru diluare
- 5 - raportul dintre greutatea balonului cotat de 100 ml și greutatea soluției diluate pentru analiză
- 3 - greutatea medie luată pentru analiză (în g)

➤ Determinarea zaharozei se face prin metoda Elser și se determină zahărul direct reducător înainte și după invertire, prin diferență calculându-se cantitatea de zaharoză.

Din soluție se iau 20 ml și se diluează cu apă distilată până la volumul de cca. 50 ml într-un balon cotat de 100 ml. Se adaugă 1 ml acid clorhidric, se omogenizează și se ține pe baie de apă la fierbere exact 30 minute. Neutralizarea acidului se face cu 1 ml hidroxid de sodiu de aceeași normalitate, se răcește și se aduce la semn.

Zaharoza este invertită în zahăr direct reducător atunci când hidroliza acidă are loc. Se determină apoi zahărul direct reducător total conform metodei descrise anterior.

Conținutul în zaharoză % se calculează astfel:

$$\text{Zaharoză \%} = (m - m_1) \times 0,95; \quad (3)$$

Unde:

m - este zahărul direct reducător total, după transformare

m_1 - zahărul direct reducător, înainte de invertire

0,95 - factor de convertire a zahărului direct reducător în echivalent zaharoză.

➤ Determinarea indicelui diastazic. În mierea naturală de albine există mai multe enzime dintre care amilaza este ultima enzimă care se distruge prin tratament termic. Pe baza acestei însușiri, amilaza se folosește ca test general de apreciere a calității mierii naturale. Mierea naturală dar și cea falsificată, supusă unui tratament termic brutal va avea indicele diastazic cu valori reduse sau chiar zero. Numărul de ml dintr-o soluție de amidon 1% care a fost transformat în dextrină în timp de o oră, la temperatura de 45°C și pH optim, de către amilaza conținută de 1 g miere se definește ca fiind indicele diastazic.

Reactivii folosiți trebuie să fie proaspăt preparați și sunt următoarele soluții: soluție de carbonat de sodiu 0,05n; acid acetic soluție 0,02 n; clorură de sodiu 0,1 n; iod, soluție 0,1 n; soluție amidon 1%.

Se cântăresc 10 g miere și se dizolvă cu 50 ml apă distilată. Se neutralizează cu carbonat de sodiu și se aduce la semn cu apă distilată într-un balon cotat de 100 ml. Din această soluție se introduc cantități descrescătoare în mai multe eprubete. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă 0,5 ml acid acetic, 0,5 ml soluție de clorură de sodiu, 5 ml amidon și se completează până la volumul de 16 ml cu apă distilată și se omogenizează. Soluția de amidon trebuie adăugată ultima.

Se introduc eprubetele în baia de apă reglată la temperatura de $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ în așa fel încât lichidul băii să depășească puțin nivelul lichidului din eprubete.

Se țin pe baie timp de o oră după care se scot și se introduc într-un vas ce conține apă răcită cu gheață. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte o picătură soluție de iod și se omogenizează prin răsturnare.

În eprubetele în care amidonul nu a fost hidrolizat în întregime, apare culoarea albastră. În eprubetele în care amidonul a fost complet hidrolizat, apar diferite nuanțe: verde – violaceu – roșu – portocaliu – gălbui - incolor.

Limita activității amilazei din miere este dată de prima eprubetă în care apare culoarea albastră. Se ia în calcul eprubeta cu conținut de miere imediat superior, care de obicei apare colorată în violet – închis [14,34,35].

$$\text{Indice diastazic} = \frac{5}{V} \cdot 10; \quad (4)$$

În care:

- 5 este numărul de ml de amidon 1%

- V volumul soluției de miere din eprubeta respectivă (în ml)

1.6.6. Metode uzuale de depistare a mierii falsificate

Mierea se falsifică de către om din dorința de a comercializa o cantitate mai mare de miere. Pentru falsificare se folosesc diverse produse precum zahărul comercial, făina, pasta de cartofi, glucoza, mierea de albine fiind un produs care poate fi falsificat în foarte multe moduri [33].

Principalele căi de falsificare a mierii pot fi directe sau indirecte.

Falsificările indirecte se realizează prin hrănirea cu zahăr a albinelor.

Mierea se falsifică în mod direct pentru a corecta gustul, consistența și culoarea, pentru a împiedica fermentarea, pentru a neutraliza aciditatea sau pentru a corecta echipamentul enzimatic [6].

Pentru corectarea gustului se folosesc substanțe îndulcitoare zaharate precum zahărul alimentar, zahărul invertit artificial, glucoză industrială sau melasă, dar și substanțe îndulcitoare sintetice cum ar fi zaharină, dulcine și glicerină.

În tabelul 10 sunt prezentate substanțe ce se folosesc pentru corectarea diferitelor defecte ale mierii.

Tabelul 10 – Substanțele folosite pentru corectarea defectelor mierii

Falsificări directe	Pentru corectarea consistenței	Amidon Gelatină Clei Substanțe pectice Gume
	Pentru corectarea culorii	Caramel Culori de anilină
	Pentru împiedicarea fermentării	Acid salicilic Acid benzoic
	Pentru neutralizarea acidității	Bicarbonat de sodiu Carbonat de sodiu Hidroxid de sodiu
	Pentru corectarea sedimentului	Polen de flori recoltat manual Polen recoltat de albine
Falsificări indirecte	Pentru corectarea echipamentului enzimatic	Diamaț sau alt extract din culturi de drojdii
	Miere de albine hrănite cu zahăr	

➤ Identificarea zahărului invertit artificial (reacția Fiehe).

Hidroximetil-furfuralul (HMF), produs intermediar, care se obține în urma degradării hexozelor tratate la cald cu un acid. Prin transformarea artificială a zaharozei, glucoza și fructoza se degradează eliberând HMF.

Pentru falsificare se adaugă în miere sirop de zahăr, zaharoza fiind artificial descompusă în glucoză și fructoză prin adăugarea de acid în timpul fierberii siropului. Zaharoza va fi astfel în limite admise, dar apare HMF, care formează cu rezorcina în prezența acidului clorhidric un complex colorat în roșu închis.

Reactivii necesari pentru identificarea zahărului invertit artificial sunt eterul etilic și rezorcina, soluție proaspătă (1 g rezorcină la 100 ml acid clorhidric).

Se amestecă energic în trei reprize de câte un minut, 10 g miere cu eter etilic. Această soluție se filtrează și se lasă la evaporat la temperatura de cel mult 35°C. În reziduul obținut se adaugă în picături soluție de rezorcină.

Dacă apare o colorație intensă roșie – închisă, care persistă și după trei ore, înseamnă că în miere este prezent zahărul invertit artificial. Nu se ia în considerare o colorație roșie – deschisă, care dispare în primele 5 minute. Trebuie să se facă identificarea cantitativă a HMF pentru că acesta poate să fie prezent în miere și în urma unui tratament termic brutal asupra mierii.

- Identificarea glucozei industriale (reacția Fiehe).
Falsificarea mierii se poate face și adaugând glucoză industrială pentru a crește conținutul în glucoză, corelat cu o scădere a conținutului în fructoză, raportul glucoză – fructoză nu mai are astfel o valoare normală.
Se folosesc următorii reactivi: tanin soluție 10%, acid clorhidric 35%; alcool etilic 95%.
5 g miere se dizolvă în 10 g apă distilată, după care se adaugă 1 ml soluție de tanin. Amestecul se încălzește pe baie de apă timp de 15 minute, urmând ca după răcire să se filtreze.
2 ml din acest filtrat, se amestecă cu 2 picături de HCl și 20 ml alcool și se agită. Dacă siropul de glucoză este prezent se produce o turbureală lăptoasă.
- Identificarea adaosurilor de făină, amidon sau compuși amidonoși
Reactivi necesari: soluție de iod – iodură de potasiu 1%
Se fierbe soluția de miere 1:1 pentru a distruge diastaza. După răcire se adaugă soluție de iod în picături. Dacă apare o colorație albastră înseamnă că în miere există un adaos amidonos. Mierea falsificată cu amidon are culoare lăptoasă și devine turbure prin dizolvare la cald.
- Pentru identificarea adaosului de gelatină sau clei se folosește soluție de tanin 5%. Într-o soluție filtrată de miere (1:2) se adaugă câteva picături de tanin. Se formează un precipitat floconos abundent dacă în miere s-a adăugat o substanță gelatinoasă.
- Identificarea adaosurilor de carbonați
Reactivii necesari sunt acid clorhidric diluat și oxalat de amoniu, soluție saturată.
În 10 g probă de miere se picură acid clorhidric. Prezența carbonaților se observă prin formarea unor spumozități cu bule de aer.
Pentru identificarea carbonatului de calciu, la acest amestec se adaugă 5-6 ml apă, apoi se omogenizează și se filtrează. În prezența CaCO₃ apare un precipitat alb, prin adăugarea oxalatului de amoniu, soluție saturată în filtrant.
- Identificarea culorilor de anilină
În 50 ml apă distilată se dizolvă 5 g miere și se adaugă 1 ml soluție de bisulfat de potasiu 10 %. Se fierb 5 minute cu câteva fibre de lână fără usuc. Culorile de anilină colorează lâna, și rezistă la spălare cu apă fierbinte.
- Identificarea mierii de mană se execută prin două metode cu apă de var și una cu alcool.
Apa de var obținută din 100 g var nestins și 500 ml apă distilată, iar după aproximativ 12 ore, soluția limpede de la suprafață se decantează.
Într-o eprubetă se introduc o parte miere, o parte apă și două părți apă de var, se omogenizează și se fierbe. Prezența mierii de mană se observă prin faptul că soluția devine turbure și se formează un precipitat.
O altă metodă de identificare cu apă de var se execută astfel: o parte de miere se amestecă cu două părți apă, iar amestecul rezultat se încălzește până la fierbere. După ce substanțele albuminoide coagulează, se adaugă apoi 10 părți apă de var proaspătă și soluția rezultată se fierbe. Se amestecă, se centrifughează 3 minute la centrifuga electrică și 5 minute la cea manuală și se măsoară sedimentul, stabilind cantitatea mierii de mană (în procente).

Pentru a fi considerată miere de nectar, mierea de mană nu trebuie să depășească 2% la centrifugarea electrică și 2,5% la cea manuală.

Pentru proba cu alcool este necesar alcool etilic 95%. Dacă soluția obținută prin amestecarea unei părți de miere, a uneia de apă și a 10 părți de alcool etilic, se tulbură și se formează flocoane de precipitat, reacția indică prezența mierii de mană.

1.7. Generalități asupra tehnicilor de modelare și simulare numerică

1.7.1. Considerații generale

Utilizarea tot mai frecventă a calculatorului în studierea fenomenelor din ingineria chimică caracterizează tendința actuală de cercetare. În chimie și inginerie chimică se folosesc diverse modele, domeniul de utilizare fiind reprezentat de analiza de date și respectiv simularea de fenomene chimice, fizice și biologice.

Modelul reprezintă o reflectare parțială a fenomenului, fiind un ansamblu de relații matematice, ecuații și inecuații ce descriu interdependențe între diverși parametri funcționali și constr0uctivi ai sistemului. Pentru modelarea corectă a unui fenomen este necesară cunoașterea cât mai amănunțită a acestuia. Comportarea unor sisteme atât în regim staționar cât și în regim dinamic se poate urmări cu ajutorul modelelor matematice.

Modelarea este abordată și prin optica teoriei sistemelor găsimdu-și multe aplicații în monitorizare, precum și în experimentele chimice prin modelare, conducere și reglare a sistemelor [36,37,38,39,40].

Modelarea matematică este necesară în toate fazele de dezvoltare ale unei cercetări științifice, realizându-se prin aceasta înțelegerea procesului, proiectarea și exploatarea optimă a instalațiilor folosite în cercetare, precum și controlul optimal [41,42].

În general, etapele prin care se realizează modelarea sunt [43,44,45,46]:

- ❖ pe baza analizei preliminare a sistemului se construiește structura modelului prin evidențierea parametrilor și a legăturilor funcționale dintre aceștia
- ❖ prin simulare se face analiza modelului
- ❖ comportarea sistemului sursă se compară cu rezultatele analizei în aceleași condiții
- ❖ corectarea modelului

În funcție de forma ecuațiilor modelele matematice pot fi liniare sau neliniare, cu parametri concentrați sau distribuiți.

După gradul de cunoaștere al parametrilor există următoarele modele:

- deterministe - când fiecărei variabile independente i se poate atribui o valoare bine definită
- stohastice - valorile parametrilor pot fi exprimați doar probabilistic

Din punct de vedere al modului de deducere al relațiilor dintre variabile se deosebesc următoarele tipuri de modele [47,48,49]:

- analitice – bazate pe cunoașterea legilor fizicii și chimiei care guvernează starea și evoluția sistemului luat în studiu. Se scriu ecuațiile sistemului, apoi acestea se integrează pentru câteva cazuri particulare idealizate, considerate ca stări limită. Este foarte importantă verificarea experimentală a modelelor propuse.
- statistice (experimentale) – care sunt bazate pe corelarea datelor experimentale. În cazul acestei modelări se renunță la analiza detaliată a fenomenelor care au loc în sistem și a interacțiunii dintre ele. Pe baza principiilor statisticii matematice și a analizei regresionale se urmărește exclusiv stabilirea legăturii dintre variabilele de ieșire și variabilele independente ale sistemului într-o formă matematică cât mai simplă (cel mai frecvent polinomială) care să fie adaptabilă calculului automat.
- analitico – experimentale (mixte) – sunt modelele în care deducerea modelului se realizează mixt, bazându-se pe relațiile dintre variabile la stabilirea structurii modelului. Prin prelucrarea statistică a datelor experimentale se obțin coeficienții din ecuații [48,49,50].

Interesul pentru modelarea sistemelor a crescut considerabil. Acest fapt se datorează numeroaselor aplicații ale modelării în foarte multe domenii, fiind de un real ajutor mai ales în automatizarea și optimizarea proceselor chimice [51].

Schema logică de desfășurare a modelării unui proces este reprezentată în figura 6 [52]:

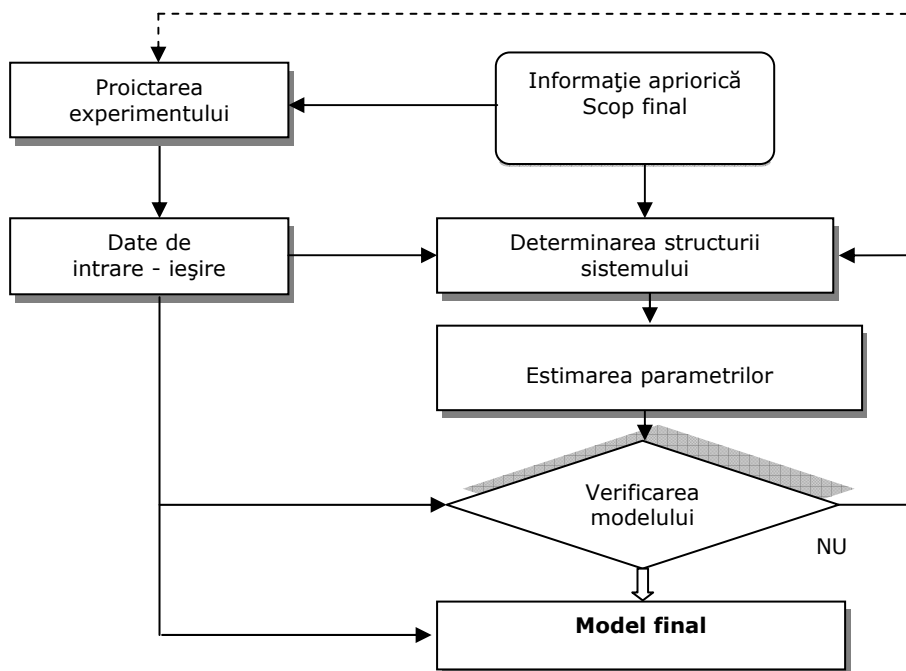


Figura 6 - Schema logică de desfășurare a modelării unui proces

Pe baza legilor fizico-chimice care guvernează procesul se stabilește structura modelului, respectiv forma ecuațiilor care descriu relațiile dintre variabilele procesului. Atunci când structura este mult prea complexă pentru scopul pentru care a fost construit modelul, se trece la liniarizarea și reducerea ecuațiilor cu derivate parțiale. În cazul conducerii procesului cu calculatorul, dacă modelul este prea complex, soluționarea ecuațiilor ar întârzia.

În elaborarea modelului matematic trebuie să existe o corelare între cunoștințele analitice și cele obținute pe bază de experiment.

Schema logică folosită în elaborarea modelului matematic referitoare la corelarea dintre cunoștințele analitice și cele obținute experimental, este prezentată în figura 7 [43,53]:

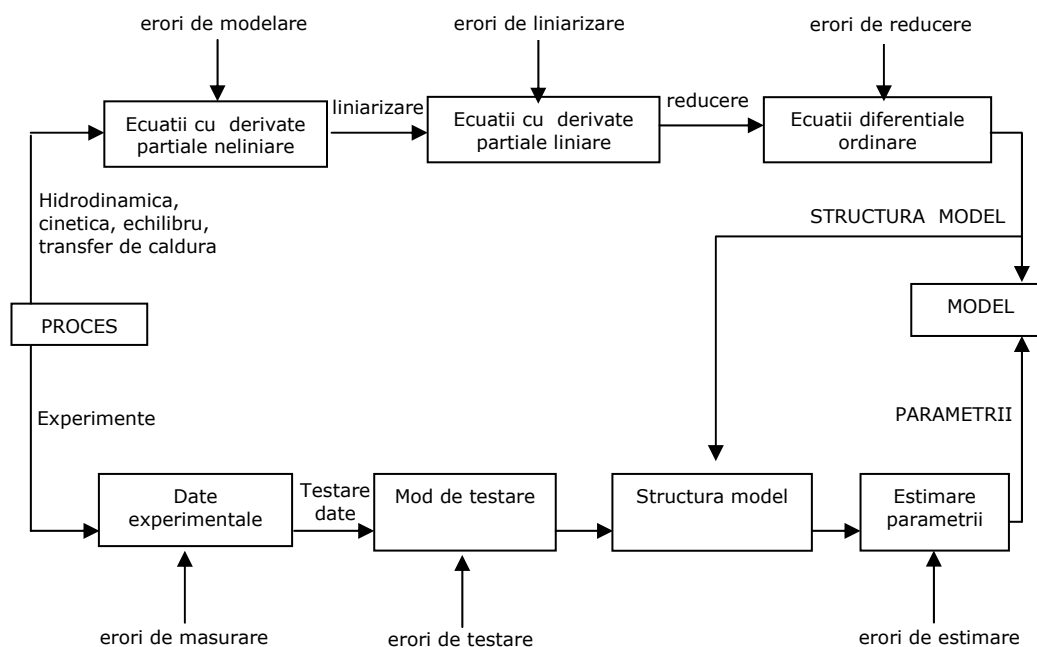


Figura 7 – Corelarea dintre cunoștințele analitice și cele obținute experimental în elaborarea modelului matematic

Coeficienții ecuațiilor se vor determina prin prelucrarea datelor obținute experimental. Aceste date sunt supuse mai întâi unui proces de validare în vederea eliminării celor ce au fost afectate de erori. Se determină parametrii modelului, urmărindu-se prin estimare că diferența între valorile mărimilor de ieșire în cazul procesului și modelului să fie cât mai mică.

O primă etapă în modelarea matematică a proceselor chimice o reprezintă colectarea, analiza și interpretarea datelor experimentale. Analiza fenomenului sau a procesului cuprinde formularea obiectivelor, a problemei și a criteriilor de apreciere.

Formularea legilor empirice care descriu fenomenul reprezintă cea de-a doua etapă a procesului de modelare, urmărindu-se obținerea unui rezumat al cercetării experimentale prin analiza variabilelor și prin determinarea preliminară a relațiilor între elemente.

Cea mai esențială etapă este a treia etapă în care se elaborează propriu-zis modelul matematic. Analiza modelului depinde de profunzimea cunoașterii sistemului studiat, de obiectivele stabilite, de mijloacele de calcul și de instalațiile folosite.

Testarea și validarea se realizează în a patra etapă. Calitatea unui model este dată de măsura în care realitatea concordă cu predicțiile. Este necesar să se mențină un echilibru rațional între precizia cerută și cea a informațiilor primare.

O ultimă etapă se referă la utilizarea modelelor obținute pentru progresul științific și tehnologic, punându-se problema descoperirii unor aspecte necunoscute ale procesului studiat [54].

1.7.2. Modele statistice

Statistica matematică este știința care urmărește explicarea fenomenelor de masă dintr-un număr relativ redus de observații. Se folosesc metode inductive de cercetare, plecând de la particular la general. Modelul adevărat neputând fi atins, se preferă să se găsească două limite, una inferioară și alta superioară, în care să se încadreze răspunsul exact cu probabilitatea respectivă. Aceste limite definesc intervalul de încredere [55].

Concluziile obținute prin inducție statistică nu sunt legi absolut sigure, însă gradul de incertitudine se poate calcula. Metoda statistică de cercetare poate fi considerată o metodă matematică exactă dacă se cunoaște gradul de incertitudine al concluziilor trase [56].

Rezultatele fundamentale ale statisticii își găsesc aplicații aproape universale, limbajul statisticii fiind în prezent familiar oricărui cercetător indiferent de domeniul activității sale. Statistica matematică prezintă cea mai mare pondere în procesul de matematizare al științelor [57].

Modelul statistic al unui proces înlocuiește un model ipotetic, real.

Cercetarea statistică pornește cu strângerea datelor de bază și se continuă cu prelucrări și analize succesive. Elaborarea experimentală a modelului matematic se impune atunci când fenomenul este insuficient cunoscut sau când fiind prea complex se dorește simplificarea lui, prin prelucrarea datelor experimentale [38,58].

1.7.2.1 Elementele matematice ale modelării statistice

Modelele statistice se elaborează pe baza corelării statistice a datelor obținute experimental. Obținerea datelor poate fi afectată de erori, de aceea în modelul experimental este introdusă o anumită incertitudine. Eroarea, E depinde de mărimile de ieșire ale procesului și modelului (y și respectiv y_m): $E = E(y, y_m)$. (5)

Etapele de desfășurare ale identificării sunt următoarele:

- stabilirea structurii modelului
- realizarea experimentelor pe instalația reală
- interpretarea rezultatelor
- deducerea formei finale a ecuațiilor modelului
- calculul parametrilor modelului
- verificarea modelului

Modelarea în regim staționar decurge în următoarele etape [38]:

1. Inventarierea variabilelor
2. Alegerea formei modelului
3. Obținerea și testarea datelor
4. Determinarea coeficienților modelului
5. Testarea modelului

1. Inventarierea variabilelor

Variabilele nesemnificative sunt eliminate în cadrul analizei de regresie. Creșterea numărului de variabile face necesară creșterea numărului de date experimentale. Examinarea unui model analitic reprezintă cel mai sigur mod de a nu greși.

2. Alegerea formei modelului

Forma de bază a modelului matematic pentru un regim staționar este cea a unui sistem de ecuații algebrice. Numărul de ecuații depinde de raportul dintre variabilele de ieșire și variabilele de intrare.

Dacă u_1, u_2, \dots, u_m sunt variabile independente (de intrare) și y_1, \dots, y_k sunt variabile dependente (de ieșire), pentru forma relațiilor de tipul:

$$y_j = f_j(u_1, u_2, \dots, u_m); \quad j = 1, \dots, k \quad (6)$$

nu se pot indica reguli fixe, aceste relații constituind modelul matematic.

Stabilirea formei ecuațiilor se mai poate face și prin analiza dimensională. Alegerea unei forme polinomiale pentru exprimarea dependenței $y(u_1, u_2, \dots, u_m)$ este justificată de faptul că ea corespunde unei dezvoltări în serie trunchiată (serie Taylor).

$$y(u_1, u_2, \dots, u_m) = a_0 + a_1 \cdot u_1 + \dots + a_m \cdot u_m + a_{11} \cdot u_1^2 + a_{12} \cdot u_1 \cdot u_2 + \dots + a_{1m} \cdot u_1 \cdot u_m + \dots + a_{mm} \cdot u_m^2 + \dots \quad (7)$$

Avantajul principal al formei (7) îl constituie liniaritatea în raport cu coeficienții modelului ($a_1, \dots, a_m, a_{11}, \dots, a_{1m}, \dots, a_{mm}$).

3. Obținerea și testarea datelor

Numărul datelor experimentale trebuie să fie suficient de mare pentru a putea determina coeficienții modelului. Experimentele trebuie să fie astfel distribuite încât să acopere în mod uniform domeniul de variație a variabilelor.

Testarea și interpretarea datelor experimentale poate include aspecte referitoare la testarea reproductibilității datelor, verificarea omogenității dispersiilor, respectarea ecuațiilor de conservare (bilanț de materiale, bilanț termic) în cadrul fiecărui experiment, reconcilierea datelor de operare, evaluarea valorilor mărimilor nemăsurate [59].

4. Determinarea coeficienților modelului

Determinarea coeficienților modelului se face cu ajutorul estimatorului celor mai mici pătrate.

Aplicarea acestei metodei impune variabilelor o serie de condiții a căror îndeplinire trebuie testată. Utilizarea corectă a metodei celor mai mici pătrate implică de asemenea o repartizare uniformă a valorilor variabilelor independente în domeniul lor de definiție și un număr însemnat de date experimentale [60].

Pentru un proces cu o intrare u și o ieșire y , informațiile preliminare au dus la concluzia că dependența dintre y și u este liniară: $y = a_0 + a_1 \cdot u$. Se presupune că

măsurând concomitent intrarea și ieșirea s-a obținut un set de date de forma: $(u_1, \hat{y}_1), \dots, (u_n, \hat{y}_n)$. Suma pătratelor abaterii valorilor măsurate \hat{y}_i de la valorile y_i calculate pe baza relației $y = a_0 + a_1 \cdot u$, trebuie să fie minimă:

$$F(a_0, a_1) = [\hat{y}_1 - (a_0 + a_1 \cdot u_1)]^2 + \dots + [\hat{y}_n - (a_0 + a_1 \cdot u_n)]^2 = \sum_{i=1}^n [\hat{y}_i - (a_0 + a_1 \cdot u_i)]^2 = \min . \quad (8)$$

Estimarea coeficienților se realizează punând condiția de minim pentru funcția F . Derivatele parțiale în raport cu coeficienții a_0, a_1 se egalează cu zero.

$$\frac{\partial F(a_0, a_1)}{\partial a_0} = -2 \left[n \cdot a_0 + a_1 \sum_{i=1}^n u_i - \sum_{i=1}^n \hat{y}_i \right] = 0 \quad (9)$$

$$\frac{\partial F(a_0, a_1)}{\partial a_1} = -2 \left[a_0 \sum_{i=1}^n u_i + a_1 \sum_{i=1}^n u_i^2 - \sum_{i=1}^n u_i \cdot \hat{y}_i \right] = 0 \quad (10)$$

Prin rezolvarea următoarei relații se obțin coeficienții a_0 și a_1

$$\begin{bmatrix} n & \sum u_i \\ \sum u_i & \sum u_i^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum y_i \\ \sum u_i \cdot \hat{y}_i \end{bmatrix} \quad (11)$$

În cazul analizei de regresie cu o singură variabilă independentă, cazul dependenței neliniare se pot întâlni două situații:

- dependența nu este liniară, dar este liniarizabilă

Spre exemplu, relația $y = k \cdot e^{au}$, prin logaritmare devine liniară, iar coeficienții se obțin prin rezolvarea sistemului

$$\begin{bmatrix} n & \sum u_i \\ \sum u_i & \sum u_i^2 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum y_i \\ \sum u_i \cdot \hat{y}_i \end{bmatrix}, \text{ unde } a_0 = \ln(k), \text{ iar } a_1 = a. \quad (12)$$

- dependența dintre z și u este liniarizabilă

$$y = a_0 + a_1 \cdot u + a_2 \cdot u^2 \quad (13)$$

Pentru calculul coeficienților modelului se poate aplica metoda celor mai mici pătrate:

$$F(a_0, a_1, a_2) = \sum_{i=1}^n [\hat{y}_i - (a_0 + a_1 \cdot u_i + a_2 \cdot u_i^2)]^2 = \min . \quad (14)$$

Egalând cu zero derivatele parțiale în raport cu coeficienții a_0, a_1 și a_2 se obține următorul sistem de matrici:

$$\begin{bmatrix} n & \sum u_i & \sum u_i^2 \\ \sum u_i & \sum u_i^2 & \sum u_i^3 \\ \sum u_i^2 & \sum u_i^3 & \sum u_i^4 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \sum \hat{y}_i \\ \sum u_i \cdot \hat{y}_i \\ \sum u_i^2 \cdot \hat{y}_i \end{bmatrix} \quad (15)$$

Prin rezolvarea sistemului (15) se obțin coeficienții modelului a_0 , a_1 și a_2 .

Cazul cel mai general al modelării statistice este analiza de regresie multiplă, cazul procesului cu mai multe intrări u_1, \dots, u_m și o singură ieșire. Fiecare mărime de ieșire se exprimă în funcție de mărimile de intrare.

Dacă avem o ieșire și m intrări, iar forma modelului matematic este $y = a_0 + a_1 \cdot u + a_m \cdot u_m$, determinarea coeficienților a_0, \dots, a_m se efectuează minimizând suma abaterilor pătratică ale valorilor măsurate ale ieșirii \hat{y}_i față de cele calculate pe baza relației

$$y = a_0 + a_1 \cdot u + a_m \cdot u_m. \quad (16)$$

$$F(a_0, \dots, a_m) = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 = \min. \quad (17)$$

Dacă,

$$U = \begin{bmatrix} 1 & u_{11} & u_{21} & \dots & u_{m1} \\ 1 & u_{12} & u_{22} & \dots & u_{m2} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & u_{1n} & u_{2n} & \dots & u_{mn} \end{bmatrix} \quad \text{și} \quad Y = \begin{bmatrix} \hat{y}_1 \\ \hat{y}_2 \\ \dots \\ \hat{y}_n \end{bmatrix} \quad (18)$$

unde:

U – matricea valorilor măsurate ale variabilelor de intrare

Y – vectorul valorilor măsurate ale variabilei de ieșire,

atunci vectorul parametrilor modelului se calculează pe baza relației:

$$A = (U^T \cdot U)^{-1} \cdot U^T \cdot Y \quad (19)$$

Utilizarea corectă a estimatorului celor mai mici pătrate implică o repartizare uniformă a valorilor variabilelor independente și un număr însemnat de date experimentale.

Estimatorul celor mai mici pătrate recursiv este un estimator secvențial, vectorul parametrilor modelului obținându-se prin combinația liniară dintre estimăție și un termen de corecție. Corecția depinde de eroarea dintre ultima măsurătoare și valoarea estimată a acesteia [61,62].

Folosirea altor estimatori precum cel al verosimilității maxime și estimatorul Bayes, impun definirea densității de probabilitate a lui y condiționată de parametrii modelului și respectiv densitatea de probabilitate a parametrilor.

5. Testarea modelului

După ce s-au determinat parametrii modelului, este necesar să se efectueze o comparație între estimările făcute modelului și datele pe care le-a furnizat procesul real. Adecvanța globală a modelului reprezintă capacitatea modelului de a reprezenta datele experimentale cu o anumită precizie în raport cu eroarea experimentală [63].

Criteriul Fischer sau testul F reprezintă raportul dintre cea mai mare și cea

mai mică dispersie: $F_C = \frac{S_{e,\max}^2}{S_{e,\min}^2}$. Criteriul Fischer calculat F_C , se compară cu

criteriul Fischer tabelat, F_T .

Dacă:

$F_C < F_T$, atunci dispersiile sunt omogene, diferă neesențial;

$F_C > F_T$, atunci dispersiile sunt neomogene și se retestează până se obține $F_C < F_T$ [56].

Testul F poate fi utilizat și pentru modele matematice cu o singură variabilă dependentă (y) și mai multe independente (x), cu o eroare experimentală constantă necunoscută evaluabilă din n_e experiențe replicate: [64]

$$\sigma^2 \approx E(s_e^2), \quad s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n_e} (y_i - \bar{y})^2}{n_e - 1} \quad (20)$$

Unde:

E – media variabilei repartizate statistic

S_e^2 – dispersiile valorilor variabilelor față de mediile lor aritmetice.

Dispersia de adecvanță σ^2 :

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{i\text{calc}})^2}{n - m - 1} \quad (21)$$

Deviația standard:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{i\text{calc}})^2}{n - m - 1}} \quad (22)$$

Indicatorul preciziei modelului, R^2 :

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{i\text{calc}} - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2} \quad (23)$$

Cu ajutorul coeficientului de corelare multiplă se poate determina capacitatea globală a modelului de a reprezenta datele experimentale. Acest coeficient trebuie să fie mai mare de 90% și se recomandă utilizarea lui doar împreună cu alte teste de adecvanță.

$$R = \sqrt{1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_{icalc})^2}{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2}} \quad (24)$$

Unde:

n - numărul de seturi de date,

m - numărul de variabile independente,

y - variabila dependentă,

y_{icalc} - valoarea rezultată pentru z pe baza ecuației de regresie,

\hat{y}_i - valoarea experimentală,

\bar{y} - valoarea medie

În cazul în care modelul nu este adecvat se pot lua decizii care:

- ✓ nu schimbă forma modelului
- ✓ implică schimbarea modelului prin reluarea determinărilor experimentale.

1.7.3. Noțiuni generale de simulare numerică

În construirea modelelor sistemelor reale modelarea și simularea reprezintă un complex.

Cele trei elemente importante implicate în procesul de simulare sunt [43, 65, 66,67]

- ✓ sistemul real
- ✓ modelul
- ✓ calculatorul

În figura 8, este reprezentată schema logică generală a simulării [66]:

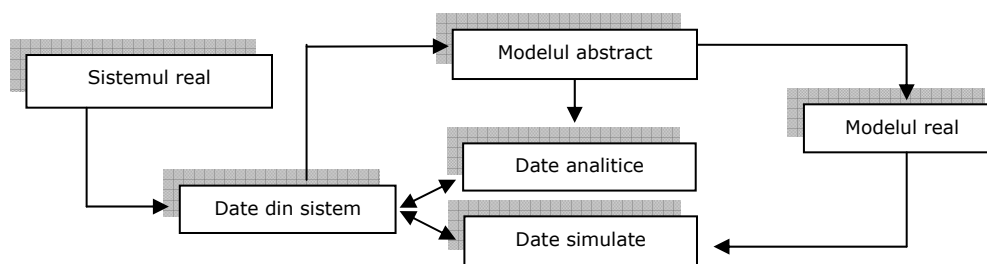


Figura 8 - Schema logică generală a simulării

Simularea reprezintă o tehnică de realizare a experimentelor, reprezentarea unui proces fizic, cu ajutorul calculatorului numeric și implică realizarea unor modele matematice logice ce descriu comportarea sistemului real pentru a obține informații în ceea ce privește comportarea lui [43, 66, 68, 69].

Procesul de simulare se realizează în următoarele faze [65]:

- formularea problemei, care de multe ori se confundă cu formularea obiectivului

atașat unei descrieri

- construirea modelului, care implică identificarea relațiilor dintre parametrii definiții ai procesului și exprimarea obiectivului în funcție de acești parametrii.

Multe dintre tehnicile de validare a modelelor sunt folosite de asemenea la verificarea simulărilor [43, 44, 70].

Principalele avantaje ale metodelor de simulare sunt [43, 66]:

- se pot studia sisteme de orice complexitate
- condițiile unui experiment pot fi controlate mai ușor pe modele de simulare decât pe sistemul real
- în timpul simulării timpul este condensat
- un experiment cu un model de simulare este mai ieftin decât o cercetare pe sistem real
- experimentul cu un model de simulare nu bruiază sistemul real
- unii parametrii pot fi schimbați cu ușurință în timpul simulării, spre deosebire de cercetarea pe sistemul real

Deși, des folosită în cercetare, simularea prezintă și o serie de dezavantaje.

Prin definiție modelul de simulare este mai simplu decât realitatea pe care o reprezintă și de aici, poate apărea pericolul de a nu lua în considerare unele aspecte esențiale. Prin simulare nu pot fi oferite soluții foarte precise, acolo unde acestea sunt absolut necesare fiind preferate metodele analitice.

Simularea nu poate da un rezultat optim și nu prezintă garanția unei soluții optime, lucru datorat faptului că metoda simulării este o metodă euristică ce răspunde doar la întrebarea

“Ce se întâmplă dacă...?”. Atunci când se începe studiul unui model de simulare nu se știe dacă simularea va produce rezultatele scontate [43, 66].

2. STUDII EXPERIMENTALE

Mierea de albine este un produs valoros fiind utilizat frecvent ca și hrană, dar și ca și produs terapeutic. Din vremurile antice, efectul antibacterian al mierii a fost observat datorită abilității sale de a stimula vindecarea rapidă a rănilor și inhibarea agenților patogeni. În plus, față de activitatea antibacteriană, mierea are capacitate antioxidantă, care poate acționa pentru a modula producerea de radicali liberi.

Problema folosirii antibioticelor pentru a trata albinele este abordată cu atenție peste tot în lume. O administrare necontrolată a antibioticelor poate duce la contaminarea produselor și prin aceasta să afecteze siguranța alimentelor.

Scopul general al strategiei sănătății din cadrul Uniunii Europene (UE) 2007-2013 este de a îmbunătăți și proteja sănătatea umană. Una din acțiunile acestei strategii este de a încuraja produsele și tehnologiile sigure, inovative și eficiente din punct de vedere al costurilor.

Din cauza efectelor negative pe care le au produsele apicole contaminate cu reziduuri de antibiotice asupra consumatorilor, este absolut necesară verificarea calității acestora prin metode sigure, care să confere rezultate de încredere.

Principalele antibiotice folosite la tratarea și prevenirea bolilor albinelor, care prin folosirea necorespunzătoare pot influența calitatea mierii sunt tetraciclina și streptomycina.

Determinarea reziduurilor de antibiotice din miere a constituit în ultimii ani o preocupare generală, deoarece acești compuși pot reduce eficacitatea proprietăților benefice ale mierii, iar dacă se găsesc în cantități semnificative, pot reprezenta o amenințare gravă pentru sănătatea umană.

Folosirea tetraciclinei pe perioade îndelungate este periculoasă pentru sănătatea oamenilor. Aceasta determină efecte toxice asupra ficatului și la nivel renal. La nivelul SNC, tetraciclinele produc așa numitul sindrom „Pseudotumor cerebri”. Deoarece traversează bariera placentară, nu se administrează în a 2-a jumătate a sarcinii, când se depune pe mugurele dentar la făt, ceea ce ar duce ulterior la colorația în galben a dentinei. Folosirea tetraciclinelor nu se recomandă la copiii sugari și mai mici de 8 ani, acestea acumulându-se în oase și dinți, determinând astfel afectarea smalțului dentar și inhibarea creșterii.

În conformitate cu Legea (CE) nr. 470/2009 și Legea (UE) nr. 37/2010, în Uniunea Europeană, nivelul maxim de reziduuri pentru tetraciclină în miere nu a fost stabilit. Ceea ce înseamnă că prezența reziduurilor de tetraciclină în miere nu este permisă. În ciuda deciziei, unele țări au stabilit limite maxime admise sau nivele tolerate de tetraciclină în miere. De exemplu, în Belgia, limita maximă admisă pentru tetraciclină a fost fixată la $20 \mu\text{g kg}^{-1}$, Franța aplică o limită de neconformitate pentru tetraciclină în miere de $15 \mu\text{g kg}^{-1}$, limita în Marea Britanie este de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, în timp ce nivelul de toleranță în Elveția este de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Laboratoarele Comunitare de Referință au propus $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ ca fiind limita maximă admisă pentru tetraciclina din miere și $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ pentru streptomycină. România, în concordanță cu legislația europeană a adoptat acest nivel de concentrație pentru detectarea reziduurilor de tetraciclină și streptomycină în miere.

Astfel, pentru a elimina riscul contaminării produselor alimentare cu reziduurile de tetraciclină și streptomycină este necesară monitorizarea lor.

Termenul de "antibiotic" este folosit pentru o gamă largă de compuși cu efect antibacterian. Antibioticele se împart în cinci clase: peniciline, tetraciclone, macrolide, aminoglicozide și amfenicoli.

Utilizarea antibioticelor, mai ales atunci când este nejustificată și nerațională, este însoțită nu numai de riscuri imediate, ci și de reacții secundare care au efecte prelungite asupra organismului și consecințe tardive din cele mai nefaste.

Rezistența microbiană la tetraciclone se instalează treptat mai ales după folosirea repetată în mod prelungit. Prin distrugerea echilibrului microbian intestinal, tetraciclonele dau frecvent tulburări digestive sub formă de: iritație gastrointestinală, diaree, grețuri, vomă, dureri abdominale, senzație de arsură la defecație. Au fost semnalate cazuri de ulcere esofagiene asociate cu pancreatită, de aceea tetraciclonele nu sunt indicate în colită ulceroasă sau când există predispoziții la micoze. Alterațiile mucoaselor datorate folosirii tetraciclonei pot să apară chiar după primele zile. Se pot dezvolta infecții enterice cu *Candida*, foarte rar enterocolita pseudomembranoasă. La femeile însărcinate se pot dezvolta fenomene de insuficiență hepato-renală, cu icter, acidoză, retenție azotată și șoc. În cazul bolnavilor cu insuficiență renală tetraciclonele sunt contraindicate. Acestea se acumulează, dând efecte toxice, inclusiv afectarea toxică a rinichiului, cu degenerescența grasă a celulelor. Tetraciclonele se depun în schelet sub formă de ortofosfat tetraciclino – calcic, având afinitate pentru țesuturile pe cale de calcifiere. Trebuie evitată administrarea tetraciclonei în a doua parte a sarcinii, precum și la copii deoarece inhibă creșterea, iar la făt se depun pe mugurele dentar, ducând ulterior la colorația în galben a dentinei sau chiar la absența emailului dentar. La sugari poate să apară un fenomen reversibil după încetarea administrării tetraciclonei și anume creșterea presiunii lichidului cefalorahidian, cu bombarea frontalelor. Rar pot să producă și fenomene de sensibilizare alergică prin erupții cutanate și febră. Tetraciclonele pot produce tulburări hepatice mai ales la persoane cu antecedente hepatice [71, 72, 73, 74, 75, 76]. Preparatele vechi sunt nefrotoxice [77].

Principalul efect secundar toxic al streptomisinei este afectarea nervului vestibular, ajungându-se chiar la pierdere de echilibru și surditate, dacă administrarea nu este întreruptă. Riscul este ridicat la pacienții cu funcție renală afectată, când se recomandă măsurarea nivelului seric de streptomisină pentru a evita toxicitatea [78].

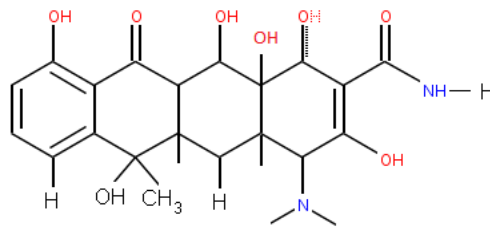
La femeile însărcinate streptomisina nu se folosește, putând cauza lezarea nervului auditiv și nefrotoxicitate la făt. Rar, aceste antibiotice pot da febră însoțită de cefalee, vărsături și rash cutanat.

Din cauza efectelor negative asupra organismului, prin folosirea neadecvată a antibioticelor, concentrațiile de tetraciclina și streptomisina prezente în miere influențează în mod negativ calitatea acesteia. Astfel, prezența antibioticelor în produsele alimentare este privită de autoritățile sanitar-veterinare europene ca foarte nocivă pentru consumator. În acest sens, Uniunea Europeană prin legislația în vigoare a încercat stabilirea limitei maxime admise pentru aceste reziduuri cât mai jos. În ceea ce privește apicultura, legislația națională s-a adaptat la cerințele UE.

Unii apicultori din România încă practică tratamentele preventive cu diverse antibiotice. Aceste tratamente preventive sunt inutile deoarece pot ascunde semnele infectării, ele ducând doar la deprecierea mierii. În urma analizelor de laborator a mierilor propuse la export, s-a evidențiat un număr foarte mare de cazuri de concentrații de streptomisină și tetraciclina peste limitele admise.

În apicultură antibioticele sunt eficiente numai în cazurile de îmbolnăvire a stupului cu loca. Pentru a folosi antibioticele în mod eficient, fără a afecta calitatea mierii, este necesară o bună cunoaștere a simptomelor clinice ale bolilor și cunoașterea metodelor corecte de tratament.

Formula structurală a tetracilinei este:



Formula chimică: $C_{21}H_{24}O_8N_2$

Masa molară: 432 g/mol

Punct de topire: 214 °C

Familia tetraciclinelor cuprinde tetraciline naturale (de extracție) și tetraciline de sinteză precum: clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, rolitetraciclina, metaciclina, dimetilclortetraciclina, doxiciclina, minociclina.

Tetraciclina a fost obținută prin tratarea aureomicinei cu hidrogen în prezența cărbunelui paladat, când se produce o dehalogenare reductivă și se formează clorhidratul tetracilinei. Se mai poate obține și pe cale fermentativă [79].

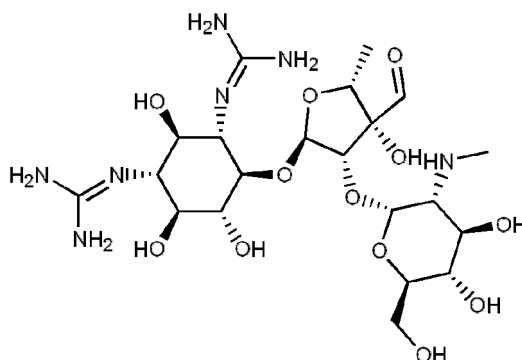
Tetracilinele sunt pulberi cristaline, de culoare galbenă, inodore, cu gust amar, sensibile la lumină și căldură. În condiții corespunzătoare, se mențin nealterate 4-5 ani. În general în prezența ionilor metalelor grele aceste antibiotice sunt instabile. Tetraciclina propriu-zisă este cea mai stabilă din această clasă de substanțe.

Sunt antibiotice cu acțiune aproape exclusiv bacteriostatică, cu spectru larg și cu o absorbție digestivă bună. Toate sunt active asupra germenilor gram-pozitivi și gram-negativi (cu excepția proteusului și piocianicului), asupra germenilor anaerobi, spirochetelor, leptospirelor, rickettsiilor, micoplasmelor. Pot fi asociate cu aminoglicozide, cloramfenicol sau macrolide, dar asocierea cu peniciline și cefalosporine este interzisă deoarece au mecanism de acțiune diferit. [80]

Există o legătură strânsă între structura chimică și efectul farmacodinamic. S-a demonstrat acțiunea antibacteriană prin directă corelație cu grupările fenol-oxo a părții inferioare a celor patru cicluri. Efectele dispar dacă aceste grupuri sunt modificate. Tetracilinele acționează prin chelarea cationilor metalelor bivalente, cu inhibiția ulterioară a unor sisteme enzimactice bacteriene. La nivelul ribozomilor bacterieni este inhibată selectiv legătura dintre aminoacizi și ARN realizându-se blocarea sintezei proteice.

Tetracilinele se metabolizează diferit în organism. În timp ce oxitetraciclina se transformă numai 20 %, tetraciclina se metabolizează în proporție mult mai mare. În proporție de 40 % tetraciclina este eliminată prin scaun, sub forma activă, ceea ce explică influența acesteia asupra florei. Prin urină se elimină aproximativ 90 % din cantitatea de tetraciclina. Viteza cu care se elimină antibioticul depinde de natura substanței.

Formula structurală a streptomicinei este:



Alte denumiri folosite: 5-(2,4-Diguanidino-3,5,6-trihidroxi- ciclohexoxi)-4-[4,5-dihidroxi- 6-(hidroximetil)- 3-metilamino- tetrahidropiran-2-il]oxi- 3-hidroxi-2-metil- tetrahidrofuran- 3-carbaldehid

Formula chimică: $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$

Masa molară: 581,574 g/mol

Punct de topire: 12 °C

Streptomicina face parte din grupa aminoglicozidelor, care acționează asupra bacteriilor gram-negative și asupra celor acido-rezistente. Premiul Nobel pentru descoperirea acestui antibiotic a fost atribuit profesorului Selman Abraham Waksman.

Extrasă din culturile de *Streptomyces gneus*, Streptomicina este o bază puternică, optic activă, solubilă în apă, insolubilă în eter, cloroform și acetonă. Cu acizii formează săruri ușor solubile în apă (HCl, HBr etc). În practică se utilizează o sare dublă cu clorura de calciu, a trichlorhidratului streptomicinei sau sărurile streptomicinei cu acid sulfuric, fosforic sau clorhidric [79].

Streptomicina nu penetrează intracelular de ceea este activă în principal pe micobacteriile extracelulare, micobacterii atipice (*M. kansasii*, *M. avium*), față de *M. tuberculosis*, cât și față de unii bacili Gram-negativ, coci Gram-pozitiv și Gram-negativ. La nivel digestiv se absoarbe redus, aproximativ 20%. Se metabolizează foarte puțin, aceasta eliminându-se practic nemodificată pe cale renală (80%), prin filtrare glomerulară. Acționează bacteriostatic la concentrații mici și bactericid la concentrații mari. Rezistența la streptomicină se instalează relativ repede.

Prezintă un risc mare de producere a unor reacții toxice, în special în condițiile administrării prelungite. Poate produce ototoxicitate, cu tulburări vestibulare și acustice, nefrotoxicitate, cu risc, în special în caz de insuficiență renală, fenomene alergice, cu erupții cutanate și fenomene iritative, radiculare și medulare, după introducerea intrarahidiană. Streptomicina este antibioticul față de care germenii patogeni pot dobândi foarte ușor rezistență [77].

Având în vedere cele prezentate anterior din care se observă importanța limitării concentrației de antibiotice în miere, în cadrul acestei lucrări ne-am propus să efectuăm o serie de studii teoretice și experimentale referitoare atât la concentrațiile de antibiotice existente în produsele obținute în diferite zone ale României cât și la posibilitățile și metodologiile tehnice de reducere a acestora. De asemenea, am încercat să

elaborăm studii teoretice pe baza unor modele matematice, care să reflecte dependențele existente între indicatorii de calitate ai mierii și o serie de parametri fizico-chimici importanți. Pe baza formei acestor modele matematice se poate stabili o predicție asupra modalităților de modificare a parametrilor fizico-chimici, astfel încât indicatorii de calitate ai mierii să fie îmbunătățiți semnificativ.

În concordanță cu scopul acestei lucrări, ne-am propus realizarea unor obiective concrete în partea experimentală. În vederea atingerii acestor obiective s-au abordat o serie de direcții de cercetare adecvate. Atât obiectivele propuse a fi realizate cât și direcțiile de cercetare abordate sunt prezentate în continuare.

2.1. Obiectivele părții experimentale

1. Descrierea metodelor de lucru și a aparaturii utilizate în monitorizarea indicilor de calitate.
2. Realizarea unei baze de date experimentale în urma monitorizării efectuate timp de șase ani asupra diferitelor tipuri de miere, din diferite regiuni ale țării.
3. Prelucrarea datelor experimentale cu programe de calcul specifice.
4. Determinarea modelelor matematice ce caracterizează influența concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină asupra calității diferitelor sorturi de miere în condiții diferite de temperatură
5. Verificarea și testarea modelelor matematice obținute, prin calculul indicatorilor de adecvanță.
6. Elaborarea unor tehnici strategice de îmbunătățire a indicatorilor de calitate a mierii pe baza concluziilor elaborate în urma studiilor efectuate.
7. Generarea și trasarea unei hărți a României cu specific apicol, pe baza studiilor efectuate în lucrare.

2.2. Direcțiile de cercetare abordate

- A). Determinarea gradului de poluare cu reziduuri de tetraciclină și streptomycină în raport cu zona geografică.
- B). Monitorizarea conținutului de reziduuri de antibiotice prin determinarea concentrației de tetraciclină și streptomycină din trei sorturi de miere în județul Timiș.
- C). Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de tetraciclină în mierea de albine în funcție de timp și în funcție de sortul de miere.
- D). Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de streptomycină în mierea de albine în funcție de timp și de temperatură.
- E). Studiul comparativ al metodelor de detectare screening, respectiv de confirmare a concentrației reziduurilor de streptomycină din mierea de albine cu metoda H.P.L.C.
- F). Stabilitatea concentrației reziduurilor de tetraciclină și streptomycină în trei sorturi de miere în condiții diferite de temperatură.

2.2.1 Tehnica de abordare a cercetărilor experimentale

În cadrul cercetărilor experimentale s-au măsurat următorii parametri:

- concentrația de tetraciclină în funcție de timp din sorturi diferite de miere și în raport cu diverse regiuni geografice
- concentrația de streptomycină în funcție de timp, din diverse regiuni geografice
- concentrația de tetraciclină din miere în vederea studierii stabilității acestui antibiotic în mierea de albine
- concentrația de streptomycină în funcție de temperatură și în funcție de tipul de miere

Pentru a urmări influența concentrațiilor reziduurilor de tetraciclină și streptomycină asupra calității mierii, este necesar a se cunoaște stabilitatea acestor antibiotice în timp și în condiții diferite de temperatură.

În cadrul abordării direcțiilor de cercetare menționate la punctul 2.2 au fost monitorizate în timp probe de miere de albine, analizându-se în vederea determinării concentrației de tetraciclină și streptomycină.

Astfel, s-a obținut o bază de date, care a fost prelucrată matematic în vederea formulării unor concluzii referitoare la influența antibioticelor asupra calității mierii de albine și la îmbunătățirea acesteia.

Având în vedere obiectivele propuse, în cele ce urmează se vor prezenta metodele și aparatura utilizată în cadrul efectuării determinărilor experimentale.

Echipamentele de laborator utilizate sunt etalonate conform unei planificări anuale, de către firme specializate și verificate intermediar de către analist în conformitate cu Planul anual de verificare intermediară a aparaturii. De asemenea, micropipetele utilizate sunt etalonate periodic.

2.2.2. Metode experimentale, materiale de lucru, echipamente și aparatură

Metoda Elisa pentru determinarea reziduurilor de tetraciclină

Baza acestui test este reacția dintre antigen și anticorp. Godeurile existente în kit sunt căptușite cu conjugat proteic de tetraciclină. După adăugarea standardelor și probelor se adaugă anticorpii antitetraciclină. Tetraciclina liberă și cea imobilă competiționează pentru situsurile de legare ale anticorpilor antitetraciclină. Orice anticorp nelegat este eliminat în faza de spălare, iar enzima marchează anticorpul secundar antitetraciclină adăugat. După înlăturarea enzimei nelegate prin spălare, se adaugă substrat (peroxid uree) și cromogen și se incubează. Enzima conjugat legată transformă culoarea din incolor în albastru, iar prin adăugarea soluției de stopare, culoarea virează în galben. Măsurătorile se fac fotometric la 450 nm [81].

Echipamentele de încercare și mijloace de măsurare sunt următoarele (figurile 9,10, 11, 14, 15, 16):

- Cititor plăci ELISA TECAN – utilizat la citirea godeurilor, cu sistem de înregistrare automat;
- Balanță analitică Kern 770-60 – utilizată la cântărirea reactivilor
- Balanță tehnică Kern 2200-2NM – utilizată la cântărirea probelor
- pH-metru digital – utilizat la măsurarea pH-ului soluțiilor
- Spălător automat de plăci – utilizat la spălarea godeurilor
- Micropipeta de 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l cu vârfurile corespunzătoare
- Vortex, pentru agitarea probelor
- Baie ultrasonică pentru agitarea probelor



Figura 9 – pH-metru digital



Figura 10 - Spălător automat de plăci



Figura 11 - Vortex

Reactivii și materialele utilizate:

- **Chit Elisa R-Biopharm** (figura 12):



Figura 12 - Chit Elisa R-Biopharm tetraciclină

- **Soluție pentru spălare** – care se prepară astfel: 0,55 g fosfat monosodic, 2,85 fosfat disodic, 9 g clorură de sodiu și 0,1% Tween 20. Se ajustează pH-ul la 7,4 și se aduce la semn într-un balon de 1000 ml cu apă distilată;
- **Soluția tampon 20 mM PBS** – care se prepară din 0,55 g fosfat monosodic hidratat cu o moleculă de apă, 2,85 g fosfat disodic hidratat cu două molecule de apă și 9 g clorură de sodium. Se aduce la semn într-un balon cotat de 1000 ml cu apă distilată;

Pregătirea probelor de miere

S-a cântărit 1 g miere la care s-a adăugat la o diluție de 1:50 (1+49) soluție tampon PBS 20 mM cu un pH=7,4. Pentru dizolvarea completă a mierii

probele s-au agitat energic pe Vortex și cinci minute pe baia ultrasonică. În analiză s-au utilizat 50 μ l probă.

Pregătirea reactivilor specifici determinării tetraciclinei

Standardele și reactivii se utilizează conform protocolului de lucru a chitului ELISA R-Biopharm R3501-Enzime Linked Immunosorbent Assay (redy to use), nefiind necesară diluarea acestora.

Soluțiile standard prevăzute în chit sunt concentrate și trebuie diluate 1:10 (1+9) cu soluție tampon 1. Înainte de utilizare se agită ușor. În chit există 6 standarde de concentrații diferite care vor fi diluate astfel:

Standard 1:	0 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1	0 ppb
Standard 2:	0,50 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1.....	0,05 ppb
Standard 3:	1,50 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1.....	0,150 ppb
Standard 4:	4,5 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1.....	0,450 ppb
Standard 5:	13,5 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1.....	,350 ppb
Standard 6:	40,50 ppb	50 μ l conc. + 450 μ l tampon 1.....	050 ppb

Determinarea propriu - zisă ELISA s-a efectuat astfel [81]:

- s-au inserat un număr suficient de godeuri în rama microplăcii, pentru testarea standardelor și a probelor în duplicat
- s-au adăugat câte 50 μ l probă și standard în godeuri separate, în duplicat;
- în fiecare godeu s-au introdus 50 μ l de anti-tetraciclină - anticorp;
- după agitarea plăcii, s-a incubat timp de 1 h, la temperatura camerei (20-25⁰C), la întuneric.
- s-a scurs lichidul din godeuri pe hârtie de filtru și s-au spălat cu 250 μ l soluție de spălare repetându-se operațiunea de trei ori.
- s-au adăugat 100 μ l conjugat enzimatic în fiecare godeu și s-a incubat placa timp de 15 minute la temperatura camerei (20-25⁰C), la întuneric.
- s-a spălat placa cu 250 μ l soluție de spălare repetându-se operația de trei ori;
- s-au adăugat câte 50 μ l de substrat și 50 μ l cromogen și s-a incubat placa timp de 15 minute la temperatura camerei, la întuneric
- s-au adăugat 100 μ l soluție de stopare (existentă în chit) în fiecare godeu și s-a măsurat absorbanta la 450 nm în decurs de 60 minute de la adăugarea soluției de stopare.

Exprimarea rezultatelor

Valorile medii ale absorbantei standardelor și respectiv, probelor se împart la valoarea absorbantei primului standard (zero standard) și se înmulțesc cu 100. Astfel, standardul zero devine egal cu 100% și valorile absorbantelor apar în procente.

Programul Ridawin calculează valorile concentrației în funcție de absorbantă, înregistrând graficul semilogaritm și calculând concentrația reală de tetraciclină din probă.

Curba de calibrare este liniară în domeniul 0,150-1,350 μ g/kg (ppb), iar concentrațiile de tetraciclină în μ g/kg corespunzătoare absorbantei fiecărei probe se pot citi de pe curba de calibrare [81].

Pentru a obține concentrația reală de tetraciclină în probă, valoarea obținută trebuie multiplicată cu factorul de diluție, care este egal cu 50.

Metoda Elisa pentru determinarea reziduurilor de streptomicină

Principiul testului este reacția dintre antigen și anticorp. Godeurile plăcuței sunt căptușite cu anticorpi antistreptomicină. Adăugându-se standardele, probele, conjugatul și anticorpii antistreptomicină are loc o reacție competitivă imunoenzimatică între streptomicina liberă și conjugatul enzimatic de streptomicină. În același timp, anticorpii antistreptomicină sunt de asemenea, legați de anticorpii imobilizați capturați. Orice enzimă conjugată rămasă nelegată este înlăturată în faza de spălare. După introducerea în godeuri a substratului (peroxid de uree) și a cromogenului (3,3', 5,5'-tetrametilbifenil-4,4'-diamină) și după faza de incubare, enzima conjugată legată transformă culoarea cromogenului de la albastru. Prin adăugarea soluției de stopare (acid sulfuric) culoarea virează la galben. Măsurătorile se fac fotometric la o lungime de undă de 450nm. Absorbanța este invers proporțională cu concentrația de streptomicină din probă.

Echipamentele de încercare și mijloacele de măsurare utilizate sunt prezentate în figurile 9, 10, 11, 12,13,14,15,16.

Acestea sunt:

- Rotavapor Laborotta cu baie de apă termoreglabilă – utilizat la concentrarea probelor și la evaporarea solvenților;
- Cititor plăci ELISA TECAN – utilizat la citirea godeurilor, cu sistem de înregistrare automat;
- Balanță analitică Kern 770-60 – utilizată la cântărirea reactivilor;
- Balanță tehnică Kern 2200-2NM – utilizată la cântărirea probelor;
- pH-metru digital – utilizat la măsurarea pH-ului soluțiilor;
- Spălător automat de plăci – utilizat la spălarea godeurilor;
- Sistem de extracție SPE Manifold – utilizat la purificarea și extracția probelor;
- Micropipeta de 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l cu vârfulurile corespunzătoare.



Figura 13 - Sistem SPE Manifold



Figura 14 - Balanță analitică



Figura 15 - Cititor Tecan



Figura 16 - Rotavapor

Reactivii și materialele utilizate:

- **Chit Elisa** (figura 17)



Figura 17 - Chit Elisa R-Biopharm streptomycină

- **Soluția de extracție pH 2** care se prepară astfel: se amestecă 2,0 g (=50 mM) sare de sodiu a acidului heptan-sulfonic cu 1,9 g (=25 mM) fosfat trisodic hidratat cu 12 molecule de apă și se aduce la semn într-un balon cotat de 200 ml cu apă distilată. Se ajustează pH-ul cu acid o-fosforic la 2,0.
- **Soluția tampon PBS** care se prepară astfel: din 0,55 g fosfat monosodic mono-hidratat, 2,85 g fosfat disodic dihidratat și 9 g clorură de sodiu și se aduce la semn într-un balon cotat de 1000 ml cu apă distilată [82].

Pregătirea probelor de miere:

Pentru **extracție** s-au parcurs următoarele etape [82]:

- s-a cântărit câte un gram de miere din probele luate în discuție în eprubete gradate
- s-au adus la semn la un volum de 10 ml cu soluție de extracție cu pH=2,0
- s-au agitat probele timp de 10 minute până la dizolvarea completă a mierii
- s-au centrifugat apoi timp de 10 minute la centrifugă, cu 3000 rotații / minut, la o temperatură de 20-25°C , până când soluția a devenit limpede

Pentru **purificarea extractului** s-a folosit o coloană RIDA C18.

- s-a spalat această coloană cu 2 ml metanol (100%) și cu 2 ml apă distilată
- apoi s-a trecut pe coloană 5 ml de extract de probă cu o viteză de aproximativ 15 picături/min
- s-a spalat coloana cu 3 ml apă distilată
- s-a înlăturat orice exces de lichid folosind un jet de aer sau de azot timp de 2 minute
- s-a eluat proba cu 1 ml metanol (100%), cu 15 picături/minut

- s-a evaporat eluatul cu ajutorul rotavaporului până la sec sub curent de aer sau azot la o temperatură de 40-50°C
- s-a redizolvat reziduul în 10 ml soluție tampon PBS
- s-a folosit în analiză 50 µl/godeu

Pregătirea reactivilor specifici determinării streptomicinei

În chit, **conjugatul enzimatic de streptomicină** este concentrat. În stare diluată are o stabilitate mică și de aceea se prepară doar cantitatea care se utilizează în analiză, în ziua respectivă. Diluarea se face 1:11 (1+10) cu soluția tampon existentă în chit (de exemplu: 200 µl conjugat concentrat + 2 ml soluție tampon poate fi folosit pentru 4 rânduri de godeuri).

Anti-streptomicina-anticorp este de asemenea în stare concentrată. Soluția se diluează 1:11 (1+10) cu soluție tampon. De exemplu, la 200 µl anti-streptomicină-anticorp concentrată se adaugă 2 ml soluție tampon. Aceasta poate fi folosită pentru 4 rânduri de godeuri.

Soluțiile standard prevăzute în chit sunt concentrate și trebuie diluate 1:10 (1+9) cu soluție tampon. Standardele diluate se agită ușor înainte de folosire.

În chit există 6 standarde de concentrații diferite care vor fi diluate astfel:

Standard 1:	0 ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon0 ppb
Standard 2:	5 ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon0,5 ppb
Standard 3:	20 ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon2 ppb
Standard 4:	80 ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon8 ppb
Standard 5:	320ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon32 ppb
Standard 6:	1280ppb	50 µl conc. + 450 µl tampon128 ppb

Determinarea propriu - zisă ELISA s-a efectuat astfel:

- s-a inserat pe ramă un număr suficient de godeuri, astfel încât, atât probele cât și standardele să fie prelucrate în duplicat și s-a înregistrat poziția lor pe placă.
- s-au adăugat câte 50 µl din fiecare standard sau probă și 50 µl de conjugat enzimatic diluat în fiecare godeu.
- s-au adăugat apoi, 50 µl de anticorp diluat în fiecare godeu.
- s-a agitat ușor placa și s-a incubat timp de 2 h la temperatura camerei (20-25°C), la întuneric.
- s-a spălat placa cu câte 250 µl apă distilată de trei ori, după care s-a înlăturat lichidul în totalitate, scuturând bine placa.
- s-au adăugat 50 µl substrat și 50 µl de cromogen în fiecare godeu. S-a agitat ușor placa și s-a incubat timp de 30 minute la temperatura camerei, la întuneric.
- s-au adăugat 100 µl soluție de stopare în fiecare godeu. S-a amestecat ușor prin mișcarea plăcii manual și s-a măsurat absorbanta la 450 nm. Placa s-a citit în decurs de 60 minute de la adăugarea soluției de stopare.

Exprimarea rezultatelor

Valorile medii ale absorbantei standardelor și respectiv, probelor se împart la valoarea absorbantei primului standard (zero standard) și se înmulțesc cu 100. Astfel, standardul zero devine egal cu 100 % și valorile absorbantelor apar în procente.

Pentru calculul concentrației s-a folosit programul Ridawin. Acesta calculează valorile concentrației în funcție de absorbantă, înregistrând grafic semilogaritmice și calculând concentrația reală de streptomicină din probă în µg/kg.

Curba de calibrare este liniară în domeniul 2-32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb), iar concentrațiile de streptomycină în $\mu\text{g}/\text{kg}$ corespunzătoare absorbantei fiecărei probe se pot citi de pe curba de calibrare [82].

Pentru a obține concentrația reală de streptomycină în probă, valoarea obținută trebuie multiplicată cu factorul de diluție. În cazul metodei de lucru prezentate factorul de diluție este 20.

2.3. Studii efectuate în cadrul direcțiilor de cercetare propuse

În continuare sunt prezentate studiile efectuate în cadrul direcțiilor de cercetare menționate la punctul 2.2:

2. 3.A Determinarea gradului de poluare cu reziduuri de tetraciclină și streptomycină în raport cu zona geografică

Reziduurile de antibiotice odată ajunse în miere în mare parte rămân acolo. Pe lângă o posibilă degradare chimică în timp a antibioticului din miere, o altă cale de diminuare a nivelului de reziduuri în timpul recoltei este efectul de diluție, care în mare măsură depinde de locul producției (aria geografică) și de condițiile meteorologice din timpul înfloririi [83].

Monitorizarea reziduurilor de substanțe antimicrobiene este indispensabilă, recoltarea de probe efectuându-se în scop bine determinat în cadrul unui control oficial, în vederea verificării siguranței produsului și respectiv a conformității alimentului cu criteriile de siguranță prevăzute de legislația în vigoare.

Scopul studiului constituie testarea gradului de contaminare cu antibiotice a trei sorturi de miere, comparativ pentru mai multe județe din țară. Această cercetare s-a efectuat pe probe de miere de salcâm, de tei și polifloră, acestea fiind cele mai comercializate mieri din România. Prelevarea probelor în vederea analizării lor s-a făcut de la stupine din diverse zone geografice, iar cercetările se bazează pe determinarea reziduurilor de tetraciclină și streptomycină pe o perioadă de 6 ani, respectiv 2003-2008.

Acest studiu prezintă cercetările efectuate pe mierile provenite din județele din jumătatea de vest a țării, cercetări care se referă la monitorizarea concentrațiilor de tetraciclină și de streptomycină în vederea obținerii unor mieri de calitate superioară. În această direcție s-au folosit seturi de date furnizate de Direcția Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Timiș.

Determinările experimentale efectuate pentru a detecta concentrațiile de tetraciclină și respectiv streptomycină, s-au realizat folosind chitul Elisa cu o limită de detecție de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pentru determinarea tetraciclinei, respectiv 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pentru detectarea streptomicinei. Chiturile au fost furnizate de firma R-biopharm. Pentru citirea absorbanțelor la lungimea de undă de 450 nm, în vederea obținerii concentrațiilor de antibiotic din probe, s-a folosit cititorul de microplăci Tecan, componentă a liniei Elisa. Datele obținute în urma citirii au fost prelucrate cu ajutorul programului furnizat de firma distribuitor a chitului și astfel s-au obținut concentrațiile de antibiotic prezente în miere.

Practic, s-a efectuat monitorizarea antibioticelor prin determinarea concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină în mierea de tei, de salcâm și în mierea polifloră, elaborându-se apoi două hărți ale României cu profil apicol. În cadrul laboratorului s-au făcut determinări de antibiotice pentru următoarele județe: Timiș, Bihor, Hunedoara, Satu-Mare, Cluj-Napoca, Alba-Iulia, Sibiu, Arad, Sălaj, Caraș-Severin, Argeș, Vâlcea, Mehedinți, Olt, Giurgiu, Dolj, Prahova, Gorj.

Probele de miere de albine au fost prelevate în condiții standard adecvate, atât din punct de vedere fizico-chimic cât și microbiologic. Cantitatea probelor a fost de 400 grame/probă și au fost recoltate în condiții normale de temperatură și umiditate.

Datele experimentale obținute în urma monitorizării sunt redată în tabelele 11, 12, 13,14, 15, 16:

Tabelul 11- Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină detectate în anul 2003

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomycină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
BH	POLIFLORĂ	10	10.5
BH	POLIFLORĂ	67	11
BH	POLIFLORĂ	35.6	17.5
BH	POLIFLORĂ	45.7	11
BH	POLIFLORĂ	9.8	18.6
BH	POLIFLORĂ	12.5	11.9
BH	SALCÂM	9.8	13
BH	SALCÂM	13.5	16.8
BH	SALCÂM	11	12.7
BH	SALCÂM	121.2	12.9
BH	SALCÂM	12.7	15
BH	SALCÂM	9.6	8
BH	SALCÂM	11	16.9
BH	TEI	8.9	18
HD	POLIFLORĂ	98.4	9.7
HD	POLIFLORĂ	14.1	18.5
HD	SALCÂM	12.4	14.5
HD	SALCÂM	10.5	13.5
SM	POLIFLORĂ	12.7	10
SM	POLIFLORĂ	14	12.7
SM	SALCÂM	12.4	10
TM	POLIFLORĂ	11.9	8.9
TM	POLIFLORĂ	11.7	10.3
TM	POLIFLORĂ	12.8	12.9
TM	POLIFLORĂ	11.5	17.8

TM	POLIFLORĂ	42.1	11.8
TM	POLIFLORĂ	12.3	64.7
TM	POLIFLORĂ	9.8	299
TM	POLIFLORĂ	34.5	16.9
TM	POLIFLORĂ	90.7	12.8
TM	POLIFLORĂ	51.6	11
TM	POLIFLORĂ	30.5	9.7
TM	POLIFLORĂ	21.9	10.6
TM	POLIFLORĂ	22.9	9.4
TM	POLIFLORĂ	21.7	18.8
TM	POLIFLORĂ	43	11
TM	POLIFLORĂ	39.3	13.2
TM	POLIFLORĂ	23.9	11
TM	POLIFLORĂ	41.8	17.3
TM	POLIFLORĂ	22.8	9.9
TM	POLIFLORĂ	10.2	17.5
TM	POLIFLORĂ	33.2	9.7
TM	POLIFLORĂ	21,7	11
TM	SALCÂM	13.2	143.6
TM	SALCÂM	22.7	9.7
TM	SALCÂM	23.9	17.9
TM	SALCÂM	28.5	16.2
TM	SALCÂM	11.7	58.1
TM	SALCÂM	9.7	56.3
TM	SALCÂM	23.8	9.8
TM	TEI	89.5	18.1
TM	TEI	32	12.6
TM	TEI	25.4	10.7
TM	TEI	13.5	42.7
TM	TEI	36.1	8.9
TM	TEI	79.9	11.9
TM	TEI	24.8	10.1
TM	TEI	21.9	14
TM	TEI	10.4	41.5
TM	TEI	10.1	44.2

Tabelul 12 - Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină detectate în anul 2004

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomycină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
BH	POLIFLORĂ	38.1	11
BH	POLIFLORĂ	14	9.7
BH	SALCÂM	9	10.5
CJ	POLIFLORĂ	8.9	9.7
HD	POLIFLORĂ	10.5	43
HD	POLIFLORĂ	56	17
HD	POLIFLORĂ	12.4	14.7
HD	POLIFLORĂ	13	13.9
HD	POLIFLORĂ	12,3	13
HD	POLIFLORĂ	12	12.7
HD	POLIFLORĂ	11	12.5
HD	POLIFLORĂ	9.6	12
SM	POLIFLORĂ	10.2	12.9
SM	POLIFLORĂ	10.4	10.7
SM	POLIFLORĂ	29.6	9.8
TM	POLIFLORĂ	10.8	65
TM	POLIFLORĂ	9.6	63.7
TM	POLIFLORĂ	11.9	60.1
TM	POLIFLORĂ	12.3	59
TM	POLIFLORĂ	9.5	58.7
TM	POLIFLORĂ	10.4	56.1
TM	POLIFLORĂ	11	56
TM	POLIFLORĂ	12.9	54.8
TM	POLIFLORĂ	9.8	52.8
TM	POLIFLORĂ	12.5	49.9
TM	POLIFLORĂ	9.8	49
TM	POLIFLORĂ	13.1	47.3
TM	POLIFLORĂ	11	43.8
TM	POLIFLORĂ	11	18.1
TM	POLIFLORĂ	14.8	17.4
TM	POLIFLORĂ	10.5	15.9
TM	POLIFLORĂ	12.6	15.8
TM	POLIFLORĂ	12	14.6
TM	POLIFLORĂ	42.1	13.9
TM	POLIFLORĂ	41.6	13.8
TM	POLIFLORĂ	9	13.7
TM	POLIFLORĂ	9.8	13.6

TM	POLIFLORĂ	32	13
TM	POLIFLORĂ	9.7	12.9
TM	POLIFLORĂ	10.7	12.9
TM	POLIFLORĂ	9.7	12.8
TM	POLIFLORĂ	11	12.6
TM	POLIFLORĂ	34.1	12.6
TM	POLIFLORĂ	41.7	12.6
TM	POLIFLORĂ	11.4	12.5
TM	POLIFLORĂ	12.5	12.1
TM	POLIFLORĂ	9.8	12
TM	POLIFLORĂ	10,4	12
TM	POLIFLORĂ	11	12
TM	POLIFLORĂ	11,3	11.9
TM	POLIFLORĂ	11.5	11.9
TM	POLIFLORĂ	9.6	11.9
TM	POLIFLORĂ	65	11.9
TM	POLIFLORĂ	14.2	11.7
TM	POLIFLORĂ	10.9	11
TM	POLIFLORĂ	11	11
TM	POLIFLORĂ	24	11
TM	POLIFLORĂ	10.6	11
TM	POLIFLORĂ	32	11
TM	POLIFLORĂ	32.9	11
TM	POLIFLORĂ	12.4	11
TM	POLIFLORĂ	12.4	11
TM	POLIFLORĂ	11	10.6
TM	POLIFLORĂ	36	10.5
TM	POLIFLORĂ	29.8	10.3
TM	POLIFLORĂ	9.5	9.9
TM	POLIFLORĂ	155	9.7
TM	POLIFLORĂ	12	9.6
TM	POLIFLORĂ	33.4	9.6
TM	POLIFLORĂ	25.3	9.5
TM	POLIFLORĂ	9.3	9.3
TM	POLIFLORĂ	10	8
TM	POLIFLORĂ	12.9	7.8
TM	POLIFLORĂ	13.4	7.8
TM	POLIFLORĂ	44.2	7.8
TM	POLIFLORĂ	8.9	6.9
TM	SALCÂM	9	76.9
TM	SALCÂM	11	75.7
TM	SALCÂM	12.4	44.9

TM	SALCÂM	9.7	43
TM	SALCÂM	9.5	19.7
TM	SALCÂM	14	19.1
TM	SALCÂM	11.7	18.6
TM	SALCÂM	13.7	17
TM	SALCÂM	39.2	17
TM	SALCÂM	33.4	15.9
TM	SALCÂM	11	15.8
TM	SALCÂM	12.9	13.9
TM	SALCÂM	33	13.9
TM	SALCÂM	47	12.6
TM	SALCÂM	13	12.6
TM	SALCÂM	10	12.6
TM	SALCÂM	9.5	12.6
TM	SALCÂM	21.5	12.5
TM	SALCÂM	13.6	12.5
TM	SALCÂM	9.7	12.4
TM	SALCÂM	11	12.4
TM	SALCÂM	54.9	12
TM	SALCÂM	13.7	12
TM	SALCÂM	11.1	12
TM	SALCÂM	8.6	12
TM	SALCÂM	11	11.9
TM	SALCÂM	32	11.8
TM	SALCÂM	11.4	11.8
TM	SALCÂM	54	11.6
TM	SALCÂM	14	11
TM	SALCÂM	11	11
TM	SALCÂM	11.4	10.9
TM	SALCÂM	12.6	10.8
TM	SALCÂM	32.5	10.8
TM	SALCÂM	12.8	10.5
TM	SALCÂM	11	9.8
TM	SALCÂM	65	9.6
TM	SALCÂM	8.9	9.4
TM	SALCÂM	12	7.9
TM	SALCÂM	10,6	7.8
TM	TEI	23.1	16.9
TM	TEI	11	14.6
TM	TEI	28.9	13.9
TM	TEI	55.1	12.3
TM	TEI	44	11.9

TM	TEI	10.7	11.1
TM	TEI	32.6	11
TM	TEI	12	10.6
TM	TEI	11.7	9.6
TM	TEI	14	9.5
TM	TEI	12.1	9.2

Tabelul 13 - Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomicină detectate în anul 2005

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomicină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
AB	POLIFLORĂ	43.9	9.6
AB	POLIFLORĂ	8.9	10.7
AB	POLIFLORĂ	11.8	10.6
AB	SALCÂM	12.8	9.4
AB	SALCÂM	12.6	11.6
AB	SALCÂM	13.9	18.7
AB	SALCÂM	12.8	18.2
AB	SALCÂM	9.7	9.6
AB	SALCÂM	11.6	12.5
AB	SALCÂM	9	12.4
AB	SALCÂM	10.5	19
AB	TEI	9.1	11.9
AB	TEI	11.9	19
AB	TEI	7.9	17.8
AB	TEI	9.9	11.2
AB	TEI	13.7	12
AB	TEI	12.4	10.2
BH	POLIFLORĂ	56.1	11
BH	POLIFLORĂ	91	8.6
BH	SALCÂM	28.7	13.7
CJ	POLIFLORĂ	9.5	19
CJ	POLIFLORĂ	10.5	11.8
CJ	POLIFLORĂ	29.9	13.9
CJ	SALCÂM	13.9	11.8
CS	POLIFLORĂ	9.6	
HD	POLIFLORĂ	11	10.6
HD	POLIFLORĂ	12.8	16.9
HD	POLIFLORĂ	13.7	15.8
HD	POLIFLORĂ	29.7	17.1
HD	SALCÂM	10.3	11

HD	SALCÂM	11.9	18.2
HD	TEI	12.9	14.7
SB	POLIFLORĂ	125.7	9.7
SB	POLIFLORĂ	11.9	
SB	POLIFLORĂ	11.9	
SB	POLIFLORĂ	9.2	
SJ	SALCÂM	10.5	
SM	POLIFLORĂ	22.7	12
SM	POLIFLORĂ	9.5	11.8
SM	POLIFLORĂ	13.7	10.6
TM	POLIFLORĂ	8.3	18.4
TM	POLIFLORĂ	13	14.6
TM	POLIFLORĂ	13.4	18.4
TM	POLIFLORĂ	11.4	199
TM	POLIFLORĂ	9.4	9.5
TM	POLIFLORĂ	9.1	9.9
TM	POLIFLORĂ	11.1	36.9
TM	POLIFLORĂ	9.8	12.9
TM	POLIFLORĂ	12.6	13.9
TM	POLIFLORĂ	49.9	10.7
TM	POLIFLORĂ	27.9	11.5
TM	POLIFLORĂ	9.6	14.2
TM	SALCÂM	14.7	10.2
TM	SALCÂM	9.3	10.5
TM	TEI	13.5	11.9
TM	TEI	24	11.3
TM	TEI	32.4	12.8
TM	TEI	9.5	15.9

Tabelul 14 - Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină detectate în anul 2006

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomycină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
AB	POLIFLORĂ	9.9	12.7
AB	POLIFLORĂ	12.5	9.1
AB	POLIFLORĂ	11	11.6
AB	POLIFLORĂ	9.5	12
AB	SALCÂM	13.7	12.7
AB	SALCÂM	9.7	11.9
AB	SALCÂM	9.4	12.7
AB	SALCÂM	10.1	9.6

AG	POLIFLORĂ	9	
AG	POLIFLORĂ	10.7	
AG	POLIFLORĂ	12.6	
AG	SALCÂM	9.5	
AG	SALCÂM	9.8	
AG	SALCÂM	12	
AG	SALCÂM	15	
AG	SALCÂM	10.6	
AR	POLIFLORĂ	13.6	19.7
AR	POLIFLORĂ	12.1	15
AR	POLIFLORĂ	10.6	
AR	POLIFLORĂ	9.6	
AR	POLIFLORĂ	14.5	
AR	POLIFLORĂ	8.2	
AR	SALCÂM	9.7	
AR	SALCÂM	11.1	11.7
AR	TEI	10.1	
BH	POLIFLORĂ	29.8	
BH	POLIFLORĂ	12.6	
BH	SALCÂM	11.4	11
BH	SALCÂM	11	14.8
BH	SALCÂM	12.4	11.9
BH	SALCÂM	11	
BH	SALCÂM	11	
CJ	POLIFLORĂ	11.9	12.4
CJ	SA LCAM	9.2	11
CJ	SALCÂM	9.7	19
CJ	SALCÂM	13	
CS	SALCÂM	10.7	
CS	SALCÂM	12.9	
HD	POLIFLORĂ	13.7	13.9
HD	POLIFLORĂ	9.6	
HD	POLIFLORĂ	9.1	
HD	SA LCAM	12.8	12.1
HD	SALCÂM	11.3	14.6
HD	SALCÂM	11.9	9.3
HD	SALCÂM	10.8	
MH	POLIFLORĂ	12.5	
SB	POLIFLORĂ	10.7	9.9
SB	POLIFLORĂ	11	
SB	POLIFLORĂ	13.5	8.6
SB	POLIFLORĂ	9.6	8.9

SB	POLIFLORĂ	10.3	
SB	POLIFLORĂ	9.7	10.5
SB	POLIFLORĂ	9.3	11.8
SB	POLIFLORĂ	12.5	18
SB	POLIFLORĂ	9.4	
SB	SALCÂM	8.5	9.7
SB	SALCÂM	12	
SB	SALCÂM	13.6	11.9
SB	SALCÂM	12	9.4
SB	SALCÂM	11.5	10.4
SB	SALCÂM	11	10.7
SB	SALCÂM	12.9	17.9
SB	SALCÂM	10.7	16.4
SJ	POLIFLORĂ	9.2	
SJ	POLIFLORĂ	11.7	
SM	POLIFLORĂ	13.6	12
SM	POLIFLORĂ	10.6	13
SM	POLIFLORĂ	9.9	
TM	POLIFLORĂ	9.7	11
TM	POLIFLORĂ	11.4	17.7
TM	POLIFLORĂ	9.7	15.4
TM	POLIFLORĂ	12	
TM	POLIFLORĂ	10.4	
TM	POLIFLORĂ	9.4	
TM	POLIFLORĂ	10.6	
TM	POLIFLORĂ	9.9	
TM	POLIFLORĂ	8.5	
TM	POLIFLORĂ	12.8	
TM	POLIFLORĂ	19	
TM	POLIFLORĂ	14.8	
TM	POLIFLORĂ	14.7	
TM	POLIFLORĂ	14.3	
TM	POLIFLORĂ	12.8	
TM	POLIFLORĂ	9.5	
TM	POLIFLORĂ	14.2	
TM	POLIFLORĂ	11.5	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	129.7	
TM	POLIFLORĂ	10.5	
TM	POLIFLORĂ	9.7	
TM	POLIFLORĂ	9.3	

TM	POLIFLORĂ	11.8	
TM	POLIFLORĂ	12.6	
TM	POLIFLORĂ	11.7	
TM	POLIFLORĂ	12.5	
TM	POLIFLORĂ	12.6	
TM	POLIFLORĂ	10.5	
TM	POLIFLORĂ	10.9	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	12.5	
TM	POLIFLORĂ	12.9	
TM	POLIFLORĂ	10.7	
TM	POLIFLORĂ	10.3	
TM	POLIFLORĂ	14.1	
TM	POLIFLORĂ	13.9	
TM	SALCÂM	11.9	
TM	SALCÂM	11	
TM	SALCÂM	9.8	
TM	SALCÂM	11	
TM	SALCÂM	13.7	
TM	SALCÂM	13.6	
TM	SALCÂM	11.9	
TM	SALCÂM	12.8	
TM	SALCÂM	11.8	
TM	SALCÂM	11.5	
TM	TEI	12	
VL	POLIFLORĂ	12.9	
VL	POLIFLORĂ	11	

Tabelul 15 - Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomicină detectate în anul 2007

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomicină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
AG	POLIFLORĂ	10.4	15
AG	POLIFLORĂ	10.7	
AG	SALCÂM	11.9	
AG	SALCÂM		12
AG	SALCÂM	12.1	10.7
AG	SALCÂM	11	12.9
AR	POLIFLORĂ	9.6	9.9
AR	POLIFLORĂ	9.7	12.5
AR	POLIFLORĂ	11	11.6
AR	POLIFLORĂ	12	8.9

AR	POLIFLORĂ	9.9	19
AR	POLIFLORĂ	12	
AR	POLIFLORĂ	12.9	
AR	TEI	11	15.9
CS	POLIFLORĂ	9.5	155
CS	POLIFLORĂ		14.7
CS	POLIFLORĂ	9	12.7
CS	SALCÂM		15.9
CS	SALCÂM		12.3
CS	SALCÂM	11.3	10.4
CS	TEI		11
CS	TEI	9.7	13.6
GR	POLIFLORĂ	10.2	19
GR	POLIFLORĂ	8.9	17.1
GR	POLIFLORĂ	10.6	10.5
GR	POLIFLORĂ	10.4	11.2
GR	POLIFLORĂ	12.5	11
GR	POLIFLORĂ	13.6	10.6
MH	POLIFLORĂ	10.2	11.7
MH	POLIFLORĂ		11
MH	SALCÂM	12.5	11.7
OT	POLIFLORĂ	12.9	13.5
OT	POLIFLORĂ	12.8	8.3
SB	POLIFLORĂ	11.5	11
TM	POLIFLORĂ	10.6	12.8
TM	POLIFLORĂ	9,0	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	11.7	
TM	POLIFLORĂ		9.8
TM	POLIFLORĂ	11	10
TM	POLIFLORĂ	12.7	11.7
TM	SALCÂM	12.8	
TM	SALCÂM	8.9	15
TM	TEI		17
TM	TEI		9.8
VL	POLIFLORĂ		17.3
VL	POLIFLORĂ		16
VL	POLIFLORĂ	11	12.3
VL	POLIFLORĂ	13.6	9.4
VL	SALCÂM	13.4	10.1

Tabelul 16 - Valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină detectate în anul 2008

JUDETUL	TIPUL DE MIERE	Concentrația detectată de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația detectată de streptomycină, $\mu\text{g}/\text{kg}$
AR	SALCÂM	12.4	8.7
CS	POLIFLORĂ	11.1	12.7
DJ	POLIFLORĂ	13.8	15.1
GJ	POLIFLORĂ	12.5	12.9
GJ	POLIFLORĂ	14	14.2
GJ	TEI	13.1	10.5
MH	POLIFLORĂ	17.3	21
MH	POLIFLORĂ	10.5	22.4
MH	POLIFLORĂ	11.3	23.6
MH	POLIFLORĂ	9	13
MH	POLIFLORĂ	11	12.6
MH	POLIFLORĂ	12.1	14.9
MH	POLIFLORĂ	9.5	13.1
MH	POLIFLORĂ	8.4	20
PH	POLIFLORĂ	11.7	22
PH	POLIFLORĂ	16	12.3
PH	POLIFLORĂ	14.1	12.8
PH	SALCÂM	12.6	21,3
PH	TEI	13.2	12.5
TM	POLIFLORĂ	14.3	16.2
TM	POLIFLORĂ	11	9.1
TM	POLIFLORĂ	16	11.2
TM	POLIFLORĂ	15	10
TM	POLIFLORĂ	10	11
TM	POLIFLORĂ	11	21.4
TM	SALCÂM	12.5	10
TM	SALCÂM	10	15.9

În tabelul 17 se găsesc prezentate datele referitoare la numărul total de probe analizate în perioada luată în studiu:

Tabelul 17 - Numărul total de probe de miere analizate în perioada 2003-2008

Judetul	Probe analizate în vederea determinării tetraciclinei	Probe pozitive tetraciclină	Probe analizate în vederea determinării streptomicinei	Probe pozitive streptomicină
TM	234	61	187	27
BH	27	9	23	0
HD	26	3	23	1
SM	12	2	11	0
CJ	9	1	8	0
AB	31	1	31	0
SB	22	1	15	0
AR	18	0	10	0
SJ	3	0	0	0
CS	8	0	9	1
AG	13	0	4	0
VL	5	0	5	0
MH	11	0	11	0
OT	2	0	2	0
GR	6	0	6	0
DJ	1	0	1	0
PH	5	0	5	0
GJ	3	0	3	0
TOTAL	436	78	354	29
TOTAL PROBE ANALIZATE: 790				

Rezultate și discuții

Din totalul de probe analizate în perioada 2003-2008 cel mai mare număr de probe contaminate atât cu tetraciclină cât și cu streptomicină a fost în județul Timiș, așa cum se observă și în figura 18:

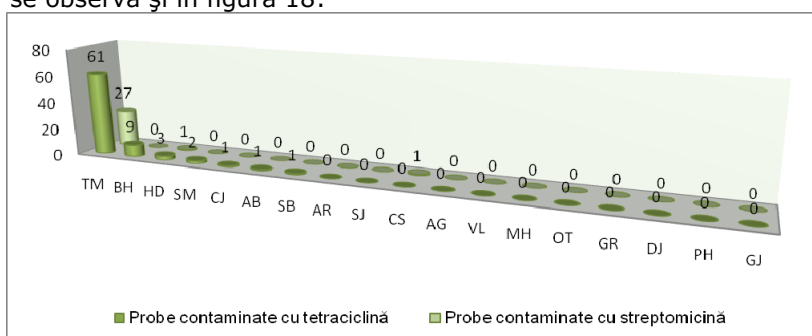


Figura 18 - Numărul total de probe poluate cu tetraciclină, respectiv streptomicină în funcție de județ, în perioada 2003-2008

Pe o perioadă de 6 ani s-au recoltat în vederea analizării un număr total de 790 de probe, din care 436 pentru determinarea tetraciclinei și 354 pentru detecția conținutului de streptomicină, după cum se observă și în figura 19:

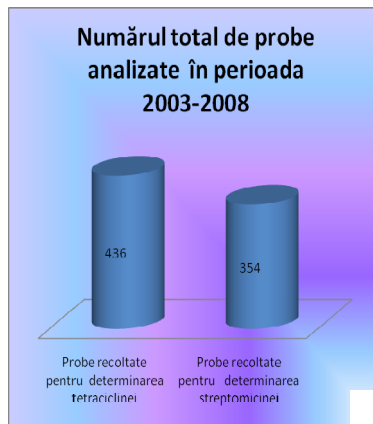


Figura 19 – Numărul total de probe analizate în perioada 2003-2008

Distribuția numărului de probe recoltate și analizate pe județe în perioada 2003 – 2008, în vederea determinării tetraciclinei, respectiv streptomisinei este redată în figurile 20 și 21:

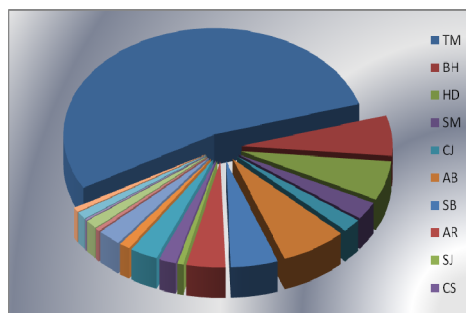


Figura 20 - Distribuția numărului de probe de miere analizate pentru determinarea tetraciclinei

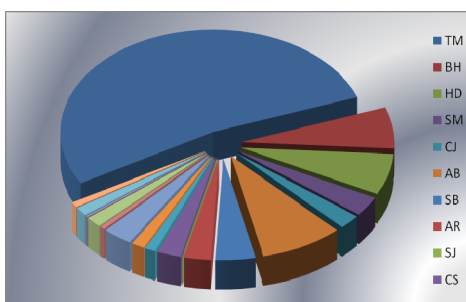


Figura 21 - Distribuția numărului de probe de miere analizate pentru determinarea streptomisinei

Din totalul de probe analizate din cele 18 județe, au fost încadrate în categoria eșantioanelor prezumtiv pozitive, 78 de probe prin conținutul lor în tetraciclină, respectiv 29 de probe prin conținutul în streptomycină.

Dinamica contaminării mierii de albine cu tetraciclină pe perioada 2003-2008, raportat la numărul total de probe este prezentată în figura 22:

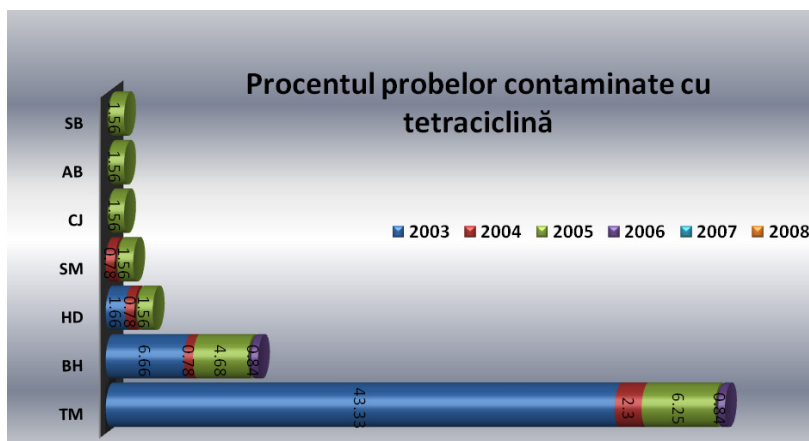


Figura 22 - Dinamica probelor contaminate cu tetraciclină în perioada 2003-2008

Se remarcă tendința de scădere a numărului de probe pozitive pe parcursul celor 6 ani. În această perioadă cel mai ridicat procent de probe contaminate cu tetraciclină s-a înregistrat în județul Timiș în anul 2003 de 43,33%, urmat de județele Bihor în anul 2003 cu 6,66%, Hunedoara în anul 2003 cu un procent de 1.66%, Satu Mare în anul 2005 cu 1,56%, Cluj Napoca în anul 2005 cu 1,56% probe pozitive, Alba Iulia în anul 2005 cu 1,56%, respectiv Sibiu în anul 2005 cu 1,56%.

Procentul probelor poluate cu tetraciclină diferă de la an la an și de la județ la județ. Defalcat pe ani numărul de probe pozitive a fost de 60 (51,66%) în anul 2003, 33(25,98%) în 2004, 12 (18,75%) în 2005, 2 (1.68%) în anul 2006, iar în anii 2007 și 2008 nu au fost identificate probe prezumtiv pozitive.

În figura 23 sunt reprezentate probele prezumtiv pozitive în funcție de ani:

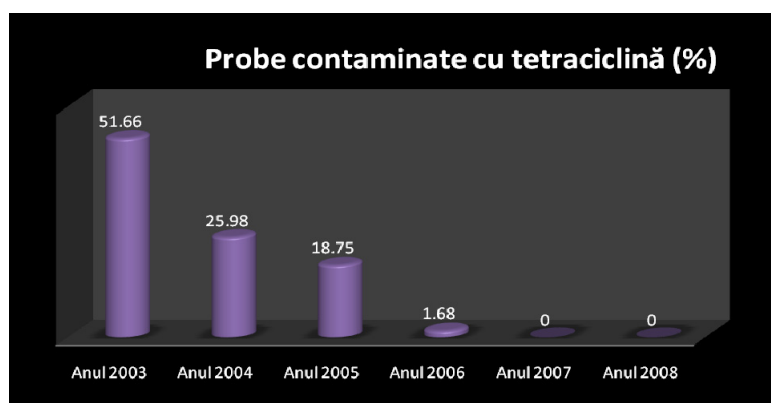


Figura 23 - Numărul de probe identificate ca fiind contaminate cu tetraciclină în perioada 2003-2008

Din cele 18 județe din care s-au recoltat probe de miere de albine pentru controlul contaminării acestora cu tetraciclină, în șapte dintre acestea au fost identificate probe pozitive.

Raportând numărul de probe neconforme la numărul total de probe analizate pe parcursul celor 6 ani în funcție de județ, avem următoarea clasificare a gradului de poluare cu tetraciclină a mierii de albine: Bihor cu un procent de 33,33%, urmat de Timiș cu 26,06% probe pozitive, Satu Mare cu 16,66%, Hunedoara cu 11,53% probe neconforme, Cluj Napoca 11,11%, Sibiu cu 4,54% și Alba Iulia cu un procent de 3,22%.

Analizând numărul de probe prezumtiv pozitive pentru reziduurile de tetraciclină în funcție de tipul de miere, în perioada 2003-2008, s-au obținut următoarele procente prezentate în figura 24:

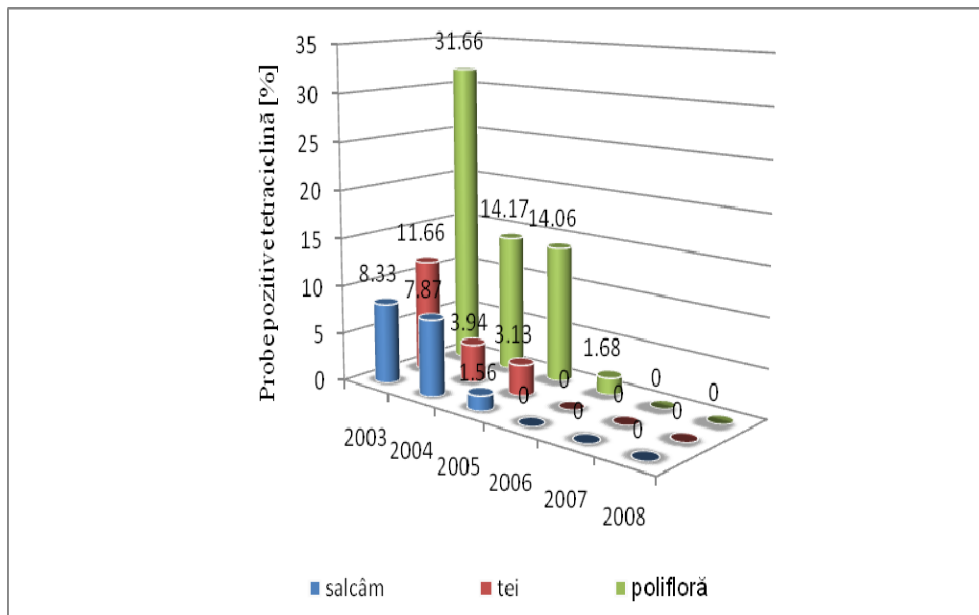


Figura 24 – Distribuția probelor prezumtiv pozitive pentru tetraciclină în funcție tipul de miere

S-a efectuat aceeași analiză și pentru probele de miere testate în vederea determinării streptomycinei, în perioada 2003-2008 și s-a obținut următoarea distribuție (Figura 25):

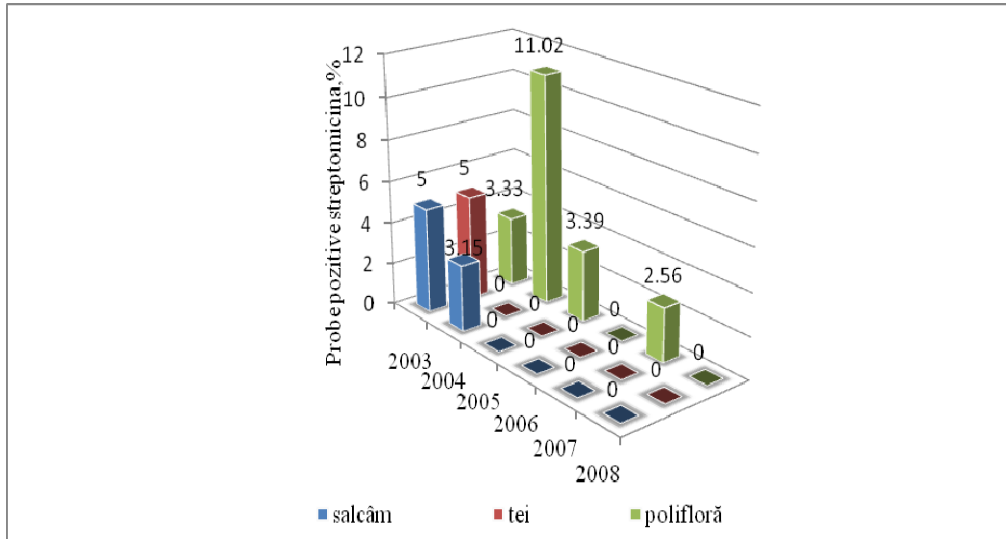


Figura 25 – Distribuția probelor prezumtiv pozitive pentru streptomicină în funcție tipul de miere

Distribuția probelor pozitive (%) în funcție de tipul de antibiotic detectat în perioada 2003-2008 este prezentată în figura 26:

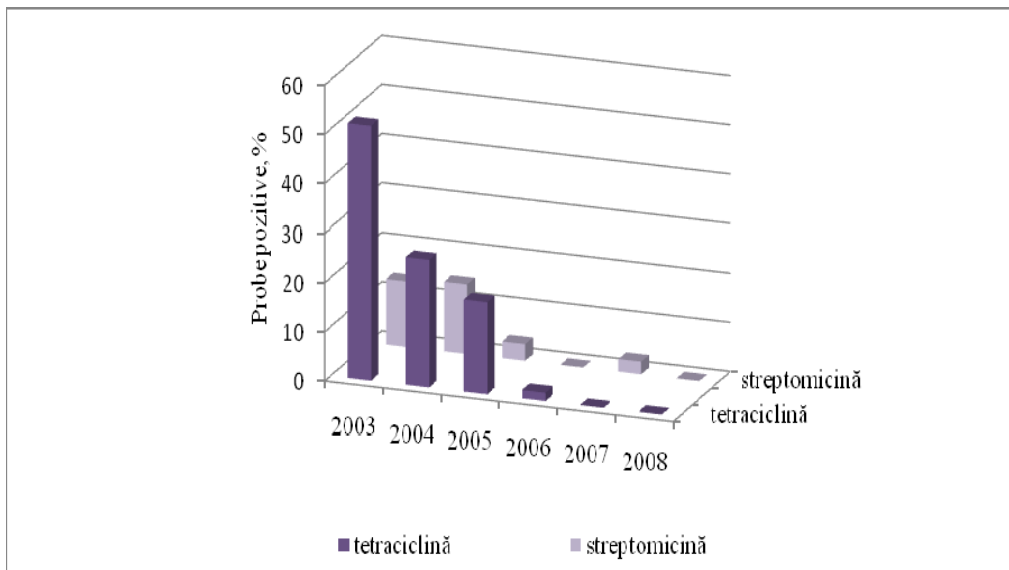


Figura 26 - Distribuția probelor pozitive (%) în funcție de tipul de antibiotic

Pe baza acestor determinări experimentale s-a trasat o hartă care redă gradul de poluare cu tetracilină a mierii din județele din care au fost recoltate probe (Figura 27).

S-au recoltat probe de miere de albine din 18 județe pentru controlul contaminării acestora cu tetraciclină și în șapte județe au fost identificate probe pozitive. Raportând numărul de probe neconforme la numărul total de probe analizate pe parcursul celor 6 ani în funcție de județ, Bihorul se situează pe primul loc în ceea ce privește gradul de poluare cu tetraciclină a mierii de albine, cu un procent de 33,33%, urmat de Timiș cu 26,06%, Satu Mare cu 16,66%, Hunedoara cu 11,53% probe neconforme, Cluj Napoca 11,11%, Sibiu cu 4,54% și Alba Iulia cu un procent de 3,22%.

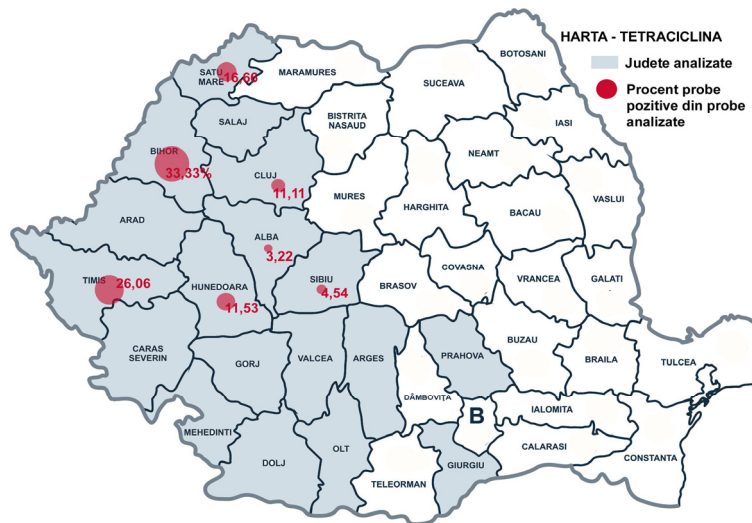


Figura 27 – Gradul de poluare cu reziduuri de tetraciclină a mierii de albine

În perioada 2003-2008 frecvența contaminării mierii de albine cu streptomicină, raportată la numărul total de probe este redată în figura 28:

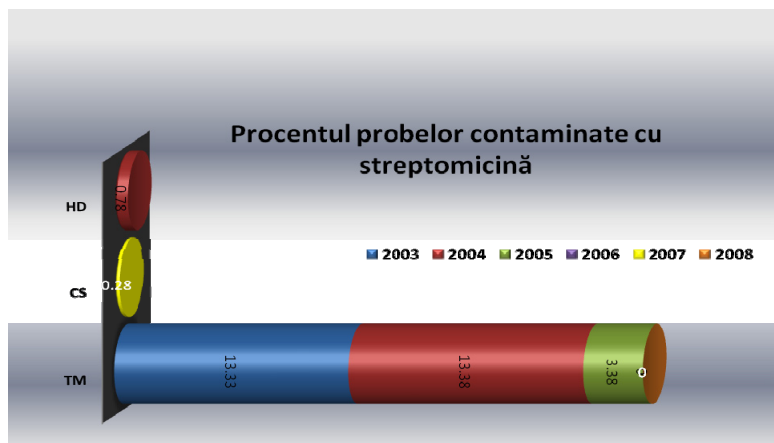


Figura 28 - Dinamica probelor contaminate cu streptomicină în perioada 2003-2008

Din numărul de probe analizate în perioada luată în studiu, în anul 2003 și 2004 numărul de probe pozitive este aproximativ egal, remarcându-se o scădere semnificativă în anii următori.

Cel mai ridicat procent de probe contaminate cu streptomicină s-a înregistrat în județul Timiș (13,38%) în anul 2004, urmat de județele Caraș-Severin (2,56%) și Hunedoara (0,78%).

Procentul probelor poluate cu streptomicină diferă de la an la an și de la județ la județ. Defalcat pe ani numărul de probe pozitive a fost de 8 (13,33%) în anul 2003, 18 (14,17%) în 2004, 2 (3,38%) în 2005, 1 (2,56%) în 2007, iar în anii 2006 și 2008 nu au fost identificate probe prezumtiv pozitive. În figura 29 sunt reprezentate probele prezumtiv pozitive în funcție de ani:

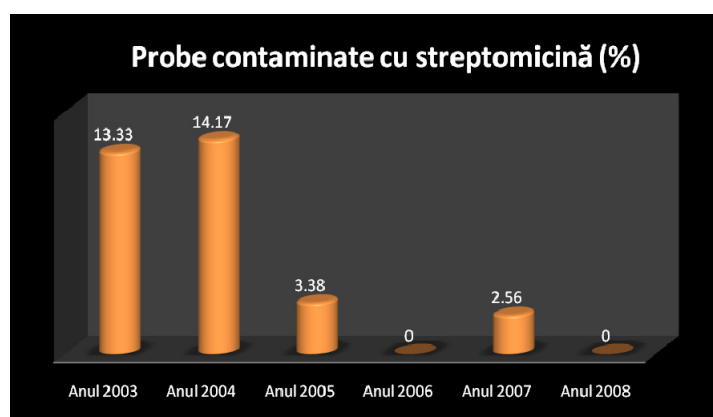


Figura 29 - Numărul de probe identificate ca fiind contaminate cu streptomicină în perioada 2003-2008

În figura 30 este prezentată harta trasată pe baza determinărilor experimentale, din care se observă distribuția pe județe a gradului de poluare cu reziduuri de streptomicină a mierii de albine:

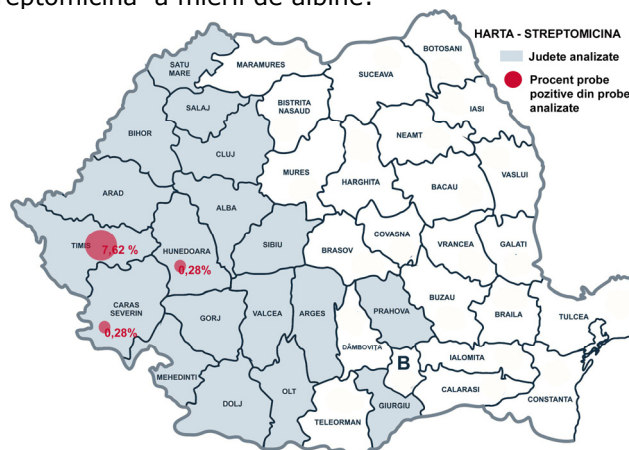


Figura 30 - Gradul de poluare cu reziduuri de streptomicină a mierii de albine

Din figura 30 se observă că din numărul total de 18 județe din care s-au recoltat probe de miere de albine pentru controlul poluării acestora cu streptomycină, doar în trei dintre acestea au fost identificate probe pozitive. Raportând numărul de probe neconforme la numărul total de probe analizate pe parcursul celor 6 ani în funcție de județ, avem următoarea clasificare a gradului de poluare cu streptomycină a mierii: Timiș cu 7,62 % probe pozitive, Hunedoara și Caraș – Severin cu un procent de 0,28 % probe neconforme. În restul județelor numărul de probe pozitive este egal cu zero.

Concluzii

Din totalul de probe analizate în perioada 2003-2008 cel mai mare număr de probe contaminate atât cu tetraciclină cât și cu streptomycină a fost în județul Timiș.

Urmărind conținutul de antibiotic detectat, distribuția în procente a probelor încadrate în categoria mierilor pozitive este de 17,88 % din totalul de 436 probe analizate în vederea detectării tetraciclinei și 8,19 % din totalul de 354 probe analizate în vederea detectării streptomicinei.

Din numărul total de probe recoltate pe fiecare an în parte pentru determinarea conținutului de antibiotic, cel mai mare procent de probe contaminate atât cu streptomycină cât și cu tetraciclină s-a înregistrat în județul Timiș în anul 2003 pentru tetraciclină și în anul 2004 pentru streptomycină.

Frecvența probelor poluate cu tetraciclină, respectiv streptomycină diferă de la un an la altul, astfel că pentru tetraciclină cel mai mare număr de probe pozitive a fost în anul 2003 (51,66%), iar pentru streptomycină în anul 2004 (14,17%).

Se remarcă tendința de scădere a numărului de probe pozitive pe parcursul celor 6 ani.

Procentul probelor poluate cu tetraciclină diferă de la an la an și de la județ la județ.

Din numărul de probe analizate în vederea determinării streptomicinei, în perioada luată în studiu, în anul 2003 și 2004 numărul de probe pozitive este aproximativ egal, remarcându-se o scădere semnificativă în anii următori.

Din numărul total de județe din care s-au recoltat probe de miere de albine pentru controlul poluării acestora cu streptomycină, doar în trei dintre acestea au fost identificate probe pozitive după cum urmează: Timiș cu 7,62 %, Hunedoara și Caraș – Severin cu un procent de 0,28 %.

Pe baza acestor determinări experimentale s-au trasat două harti ce ilustrează teritoriul României și care redau distribuția probelor contaminate cu tetraciclină, respectiv streptomycină a mierii din județele din care au fost recoltate probe. Aceste hărți prezintă importanță deosebită pentru orientarea consumatorilor spre mieri de calitate superioară.

2.3.B Monitorizarea conținutului de reziduuri de antibiotice prin determinarea concentrației de tetraciclină și streptomycină din trei sorturi de miere în județul Timiș

Comisia Europeană a adoptat o serie de măsuri privind controlul sever a conținutului de antibiotice, reziduuri care pot afecta sănătatea consumatorului. Trebuie avut în vedere că mierea provenită de la familiile de albine tratate cu antibiotice nu poate fi valorificată pe piața europeană. Asumarea conceptelor Uniunii Europene legate de reziduurile de substanțe antimicrobiene este esențială pentru

integrarea deplină a României în rândul țărilor unde siguranța alimentelor și respectul față de consumator este politică de stat [84,85].

Produsele medicamentoase au fost împărțite în următoarele categorii:

- produse medicamentoase interzise parțial, admise în anumite limite; cu recomandarea de a se reduce total; din această categorie fac parte antibioticele;
- produse medicamentoase interzise complet: care sunt dăunătoare sănătății consumatorului în orice concentrație; include nitrofuranul (cu toți compușii săi) și cloramfenicolul.

Administrarea necorespunzătoare de substanțe antimicrobiene albinelor, poate avea ca efect prezența reziduurilor respective în miere, dar și în celelalte produse ale stupului.

Obiectul acestui studiu constă în detectarea prezenței antibioticelor în mierile din județul Timiș, prin monitorizarea acestora în timp.

Acest studiu de caz prezintă cercetările efectuate în județul Timiș, cercetări care se referă la monitorizarea concentrațiilor de tetraciclină și de streptomicină în vederea obținerii unor mieri de calitate superioară. Pentru realizarea studiului referitor la influența concentrațiilor de antibiotice asupra indicilor de calitate a mierii s-au urmărit valorile acestor parametri timp 6 ani. Studiul s-a efectuat pe baza datelor obținute de la Direcția Sanitară și pentru Siguranța Alimentelor Timiș, iar analizele s-au realizat pe probe de miere de albine, recoltate din județul Timiș urmărindu-se în timp, gradul de contaminare cu reziduuri de antibiotice a trei sorturi de miere: salcâm, tei și polifloră.

Pentru determinările experimentale ale concentrațiilor de tetraciclină și respectiv streptomicină s-a folosit kitul Elisa cu o limită de detecție de 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pentru determinarea tetraciclinei, respectiv 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pentru detectarea streptomicinei. Kiturile au fost furnizate de firma R-biopharm. Pentru citirea absorbanțelor la lungimea de undă de 450nm, în vederea obținerii concentrațiilor de antibiotic din probe, s-a folosit cititorul de microplăci Tecan, componentă a liniei Elisa. Datele obținute în urma citirii au fost prelucrate cu ajutorul programului furnizat de firma distribuitorului a kitului și s-au obținut concentrațiile de antibiotic prezente în miere.

Practic, s-a efectuat monitorizarea antibioticelor prin determinarea tetraciclinei și streptomicinei în mierea de tei, de salcâm și în mierea polifloră, evidențiindu-se distribuția probelor detectate ca fiind pozitive în funcție de timp.

Pe o perioadă de 6 ani s-au recoltat în vederea analizării un număr de 233 de probe pentru determinarea tetraciclinei și un număr de 186 de probe pentru detecția conținutului de streptomicină.

În tabelele 18, 19, 20, 21, 22 și 23 sunt prezentate datele experimentale obținute în urma monitorizării celor trei sorturi de miere luate în studiu, în anii 2003-2008:

Tabelul 18 - Monitorizarea reziduurilor de tetraciclină și streptomicină în anul 2003

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația de streptomicină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$
TM	POLIFLORĂ	11.9	8.9
TM	POLIFLORĂ	11.7	10.3
TM	POLIFLORĂ	12.8	12.9

TM	POLIFLORĂ	11.5	17.8
TM	POLIFLORĂ	42.1	11.8
TM	POLIFLORĂ	12.3	64.7
TM	POLIFLORĂ	9.8	299
TM	POLIFLORĂ	34.5	16.9
TM	POLIFLORĂ	90.7	12.8
TM	POLIFLORĂ	51.6	11
TM	POLIFLORĂ	30.5	9.7
TM	POLIFLORĂ	21.9	10.6
TM	POLIFLORĂ	22.9	9.4
TM	POLIFLORĂ	21.7	18.8
TM	POLIFLORĂ	43	11
TM	POLIFLORĂ	39.3	13.2
TM	POLIFLORĂ	23.9	11
TM	POLIFLORĂ	41.8	17.3
TM	POLIFLORĂ	22.8	9.9
TM	POLIFLORĂ	10.2	17.5
TM	POLIFLORĂ	33.2	9.7
TM	POLIFLORĂ	21,7	11
TM	SALCÂM	13.2	143.6
TM	SALCÂM	22.7	9.7
TM	SALCÂM	23.9	17.9
TM	SALCÂM	28.5	16.2
TM	SALCÂM	11.7	58.1
TM	SALCÂM	9.7	56.3
TM	SALCÂM	23.8	9.8
TM	TEI	89.5	18.1
TM	TEI	32	12.6
TM	TEI	25.4	10.7
TM	TEI	13.5	42.7
TM	TEI	36.1	8.9
TM	TEI	79.9	11.9
TM	TEI	24.8	10.1
TM	TEI	21.9	14
TM	TEI	10.4	41.5

Tabelul 19 - Monitorizarea reziduurilor de tetraciclină și streptomicină în anul 2004

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată μg/kg	Concentrația de streptomicină detectată μg/kg
TM	POLIFLORĂ	155	9.7
TM	POLIFLORĂ	10	8

2.3 - Studii efectuate în cadrul direcțiilor de cercetare propuse 101

TM	POLIFLORĂ	11.4	12.5
TM	POLIFLORĂ	10.9	11
TM	POLIFLORĂ	9.8	12
TM	POLIFLORĂ	12	14.6
TM	POLIFLORĂ	9.3	9.3
TM	POLIFLORĂ	11,3	11.9
TM	POLIFLORĂ	10,4	12
TM	POLIFLORĂ	11	43.8
TM	POLIFLORĂ	11	11
TM	POLIFLORĂ	9.7	12.9
TM	POLIFLORĂ	12.9	7.8
TM	POLIFLORĂ	12.9	12
TM	POLIFLORĂ	10.8	19.8
TM	POLIFLORĂ	25.3	9.5
TM	POLIFLORĂ	12	31.6
TM	POLIFLORĂ	10.5	33
TM	POLIFLORĂ	8.9	6.9
TM	POLIFLORĂ	9.8	11
TM	POLIFLORĂ	11	56
TM	POLIFLORĂ	12.5	49
TM	POLIFLORĂ	11	12
TM	POLIFLORĂ	24	11
TM	POLIFLORĂ	32	13
TM	POLIFLORĂ	11.9	9.5
TM	POLIFLORĂ	10.6	11
TM	POLIFLORĂ	41.6	13.8
TM	POLIFLORĂ	32	11
TM	POLIFLORĂ	32.9	11
TM	POLIFLORĂ	29.8	10.3
TM	POLIFLORĂ	11	12.6
TM	POLIFLORĂ	9.8	13.6
TM	POLIFLORĂ	34.1	12.6
TM	POLIFLORĂ	36	10.5
TM	POLIFLORĂ	41.7	12.6
TM	POLIFLORĂ	11	18.1
TM	POLIFLORĂ	12.5	26
TM	POLIFLORĂ	9.8	32.8
TM	POLIFLORĂ	10.7	12.9
TM	POLIFLORĂ	14.2	11.7
TM	POLIFLORĂ	9.5	9.9
TM	POLIFLORĂ	14.8	17.4
TM	POLIFLORĂ	12.4	11

102 Studii experimentale - 2

TM	POLIFLORĂ	11.5	11.9
TM	POLIFLORĂ	9.7	12.8
TM	POLIFLORĂ	10.4	56.1
TM	POLIFLORĂ	12.3	29
TM	POLIFLORĂ	9.6	23.7
TM	POLIFLORĂ	13.1	27.3
TM	POLIFLORĂ	9.5	28.7
TM	POLIFLORĂ	42.1	13.9
TM	POLIFLORĂ	33.4	9.6
TM	POLIFLORĂ	13.4	7.8
TM	POLIFLORĂ	9	13.7
TM	POLIFLORĂ	12.6	15.8
TM	POLIFLORĂ	11	10.6
TM	POLIFLORĂ	9.6	11.9
TM	POLIFLORĂ	65	11.9
TM	POLIFLORĂ	44.2	7.8
TM	POLIFLORĂ	12.4	11
TM	SALCÂM	14	11
TM	SALCÂM	11.4	10.9
TM	SALCÂM	19,6	7.8
TM	SALCÂM	65	9.6
TM	SALCÂM	54.9	54.8
TM	SALCÂM	11	11.9
TM	SALCÂM	32	66.3
TM	SALCÂM	47	12.6
TM	SALCÂM	8.9	9.4
TM	SALCÂM	12	7.9
TM	SALCÂM	13	12.6
TM	SALCÂM	9.5	19.7
TM	SALCÂM	21.5	12.5
TM	SALCÂM	33.4	15.9
TM	SALCÂM	11	11
TM	SALCÂM	13.7	12
TM	SALCÂM	9.7	12.4
TM	SALCÂM	11.7	18.6
TM	SALCÂM	12.8	10.5
TM	SALCÂM	9.7	9.8
TM	SALCÂM	12.9	13.9
TM	SALCÂM	11.1	12
TM	SALCÂM	13.7	17
TM	SALCÂM	14	19.1
TM	SALCÂM	33	13.9

TM	SALCÂM	9	76.9
TM	SALCÂM	39.2	17
TM	SALCÂM	10	12.6
TM	SALCÂM	12.6	10.8
TM	SALCÂM	11	12.4
TM	SALCÂM	11	75.7
TM	SALCÂM	13.6	12.5
TM	SALCÂM	11.4	11.8
TM	SALCÂM	15.7	15.8
TM	SALCÂM	9.5	12.6
TM	SALCÂM	11	9.8
TM	SALCÂM	8.6	12
TM	SALCÂM	54	11.6
TM	SALCÂM	12.4	34.9
TM	SALCÂM	32.5	10.8
TM	TEI	44	11.9
TM	TEI	12.1	65
TM	TEI	23.1	16.9
TM	TEI	12	10.6
TM	TEI	10.7	11.1
TM	TEI	32.6	11
TM	TEI	55.1	12.3
TM	TEI	14	9.5
TM	TEI	28.9	13.9
TM	TEI	11.7	9.6
TM	TEI	11	14.6

Tabelul 20 - Monitorizarea reziduurilor tetraciclinei și streptomicinei în anul 2005

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația de streptomicină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$
TM	POLIFLORĂ	8.3	18.4
TM	POLIFLORĂ	13	14.6
TM	POLIFLORĂ	13.4	18.4
TM	POLIFLORĂ	11.4	199
TM	POLIFLORĂ	9.4	9.5
TM	POLIFLORĂ	9.1	9.9
TM	POLIFLORĂ	11.1	36.9
TM	POLIFLORĂ	9.8	12.9
TM	POLIFLORĂ	12.6	13.9
TM	POLIFLORĂ	49.9	10.7
TM	POLIFLORĂ	27.9	11.5

TM	POLIFLORĂ	9.6	14.2
TM	SALCÂM	14.7	10.2
TM	SALCÂM	9.3	10.5
TM	TEI	13.5	11.9
TM	TEI	24	11.3
TM	TEI	32.4	12.8
TM	TEI	9.5	15.9

Tabelul 21- Monitorizarea reziduurilor de tetraciclină și streptomicină în anul 2006

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația de streptomicină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$
TM	POLIFLORĂ	9.7	11
TM	POLIFLORĂ	11.4	17.7
TM	POLIFLORĂ	9.7	15.4
TM	POLIFLORĂ	12	
TM	POLIFLORĂ	18.6	
TM	POLIFLORĂ	9.4	
TM	POLIFLORĂ	10.6	
TM	POLIFLORĂ	9.9	
TM	POLIFLORĂ	8.5	
TM	POLIFLORĂ	12.8	
TM	POLIFLORĂ	19	
TM	POLIFLORĂ	18.9	
TM	POLIFLORĂ	18.4	
TM	POLIFLORĂ	19	
TM	POLIFLORĂ	12.8	
TM	POLIFLORĂ	9.5	
TM	POLIFLORĂ	17	
TM	POLIFLORĂ	19.5	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	129.7	
TM	POLIFLORĂ	10.5	
TM	POLIFLORĂ	9.7	
TM	POLIFLORĂ	9.3	
TM	POLIFLORĂ	11.8	
TM	POLIFLORĂ	12.6	
TM	POLIFLORĂ	11.7	
TM	POLIFLORĂ	19.5	
TM	POLIFLORĂ	12.6	
TM	POLIFLORĂ	10.5	

TM	POLIFLORĂ	10.9	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	12.5	
TM	POLIFLORĂ	12.9	
TM	POLIFLORĂ	10.7	
TM	POLIFLORĂ	10.3	
TM	POLIFLORĂ	18.1	
TM	POLIFLORĂ	13.9	
TM	SALCÂM	11.9	
TM	SALCÂM	11	
TM	SALCÂM	9.8	
TM	SALCÂM	11	
TM	SALCÂM	13.7	
TM	SALCÂM	13.6	
TM	SALCÂM	11.9	
TM	SALCÂM	12.8	
TM	SALCÂM	11.8	
TM	SALCÂM	11.5	
TM	TEI	12	

Tabelul 22 - Monitorizarea reziduurilor de tetraciclină și streptomicină în anul 2007

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația de streptomicină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$
TM	POLIFLORĂ	10.6	12.8
TM	POLIFLORĂ	9,0	
TM	POLIFLORĂ	11	
TM	POLIFLORĂ	11.7	
TM	POLIFLORĂ	11	9.8
TM	POLIFLORĂ	12.7	10
TM	POLIFLORĂ		11.7
TM	SALCÂM	12.8	
TM	SALCÂM	8.9	15
TM	TEI		17
TM	TEI		9.8

Tabelul 23 - Monitorizarea reziduurilor de tetraciclină și streptomicină în anul 2008

Judetul	Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$	Concentrația de streptomicină detectată $\mu\text{g}/\text{kg}$
TM	POLIFLORĂ	14.3	16.2
TM	POLIFLORĂ	11	9.1

TM	POLIFLORĂ	16	11.2
TM	POLIFLORĂ	15	10
TM	POLIFLORĂ	10	11
TM	POLIFLORĂ	11	21.4
TM	SALCÂM	12.5	10
TM	SALCÂM	10	15.9

Rezultate și discuții

Pentru realizarea acestui studiu asupra gradului de poluare cu substanțe antimicrobiene a mierilor din județul Timiș, s-au urmărit valorile concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină între anii 2003-2008. În tabelele 24, 25, 26, 27, 28 și 29 este redat numărul de probe de miere de albine analizate pe perioada studiului, precum și numărul și procentele de probe pozitive.

Tabelul 24 - Numărul de probe de miere polifloră analizate în vederea determinării tetraciclinei:

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	22	15	10.34
2004	61	15	10.34
2005	12	2	1.37
2006	38	1	0.68
2007	6	0	0
2008	6	0	0
Total	145	33	22.75

În perioada 2003-2008, din numărul total de 145 de probe de miere polifloră analizate în vederea determinării tetraciclinei 22,75% sunt pozitive. Distribuția probelor pozitive (în %) pe perioada 2003-2008 este reprezentată în figura 31:

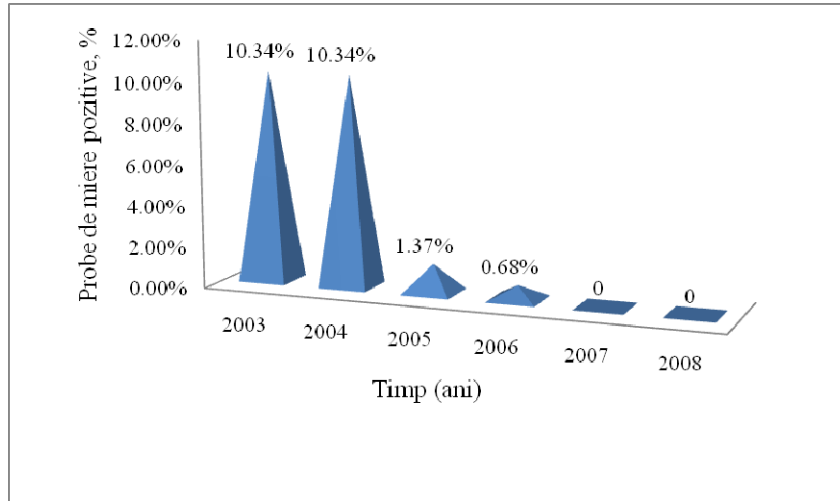


Figura 31 - Distribuția probelor de miere polifloră detectate pozitive pentru tetraciclină

Tabelul 25 - Numărul de probe de miere polifloră analizate în vederea determinării streptomicinei:

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	22	2	1.85
2004	61	12	11.11
2005	12	2	1.85
2006	3	0	0
2007	4	0	0
2008	6	0	0
Total	108	16	14.81

În perioada 2003-2008, din numărul total de 108 probe de miere polifloră analizate în vederea determinării streptomicinei 14,81% sunt pozitive. Distribuția probelor de miere polifloră pozitive pentru streptomicină, pe perioada 2003-2008 este reprezentată în figura 32:

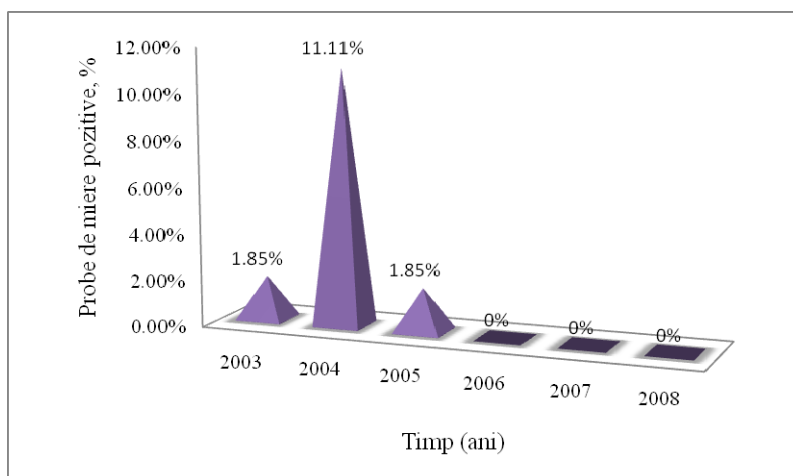


Figura 32 - Distribuția probelor de miere polifloră detectate pozitive pentru streptomicină

Tabelul 26 - Numărul de probe de miere de salcâm analizate în vederea determinării tetraciclinei:

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	7	4	6.34
2004	40	10	15.87
2005	2	0	0
2006	10	0	0
2007	2	0	0
2008	2	0	0
Total	63	14	22.22

Între anii 2003-2008 s-au analizat un număr de 63 probe de miere de salcâm în vederea determinării tetraciclinei, fiind identificate 22,22% probe pozitive. Distribuția probelor pozitive de miere de salcâm pentru tetraciclină, în %, pe perioada 2003-2008, este reprezentată în figura 33:

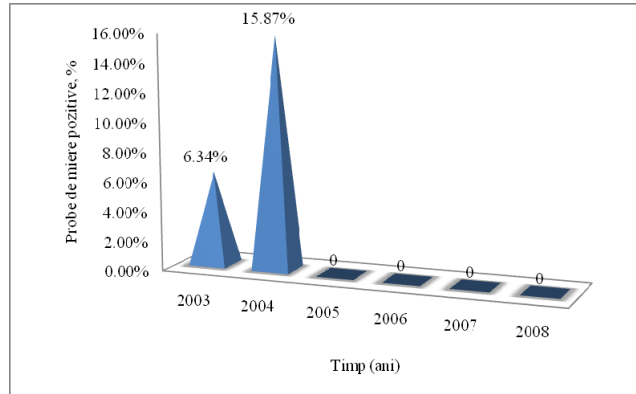


Figura 33- Distribuția probelor de miere de salcâm detectate pozitive pentru tetraciclină

Tabelul 27 - Numărul de probe de miere de salcâm analizate în vederea determinării streptomicinei

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	7	3	5.76
2004	40	4	7.69
2005	2	0	0
2006	0	0	0
2007	1	0	0
2008	2	0	0
Total	52	7	13.46

Din numărul total de 52 de probe de miere de salcâm analizate în vederea determinării streptomicinei au fost identificate 13,46% probe pozitive. Distribuția probelor pozitive (în %), pe perioada 2003-2008, este reprezentată în figura 34:

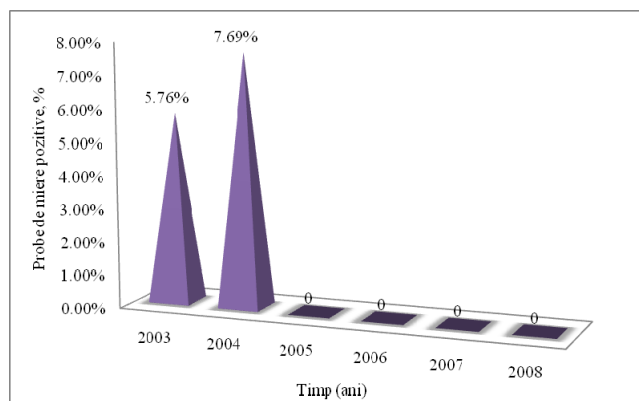


Figura 34 - Distribuția probelor de miere de salcâm detectate pozitive pentru streptomicină

Tabelul 28 - Numărul de probe de miere de tei analizate în vederea determinării tetraciclinei

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	9	7	28
2004	11	5	20
2005	4	2	8
2006	1	0	0
2007	0	0	0
2008	0	0	0
Total	25	14	56

Din numărul total de 25 de probe de miere de tei analizate în vederea determinării tetraciclinei, în perioada 2003-2008, au fost identificate 56% probe pozitive. Distribuția probelor pozitive (în %), pe perioada 2003-2008, este reprezentată în figura 35:

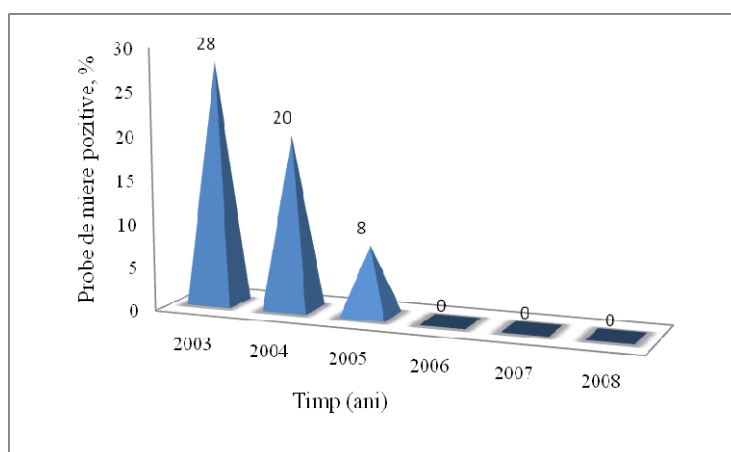


Figura 35 - Distribuția probelor de miere de tei detectate pozitive pentru tetraciclină

Tabelul 29 - Numărul de probe de miere de tei analizate în vederea determinării streptomicinei

Anul	Numărul total probe	Numărul probelor pozitive	Probe pozitive în perioada 2003-2008 (%)
2003	9	2	7.69
2004	11	0	0
2005	4	0	0
2006	0	0	0
2007	2	0	0
2008	0	0	0
Total	26	2	7.69

Din totalul de 26 de probe de miere de salcâm analizate în vederea determinării streptomicinei au fost identificate 7,69% probe pozitive. Distribuția probelor pozitive (în %), pe perioada 2003-2008, este reprezentată în figura 36:

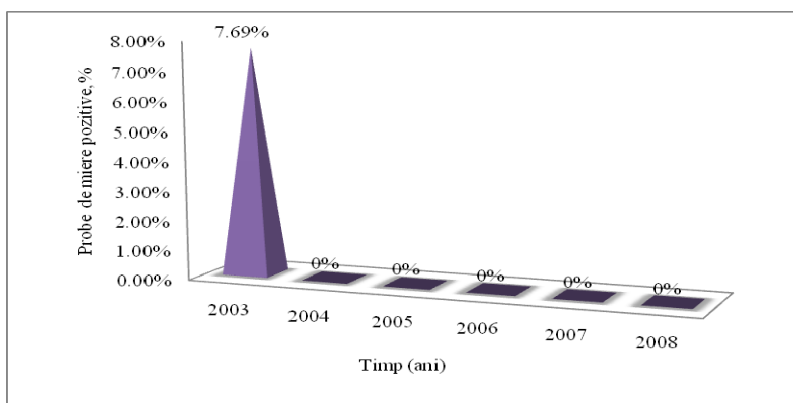


Figura 36 - Distribuția probelor de miere de tei detectate pozitive pentru streptomicină

În perioada 2003 - 2008 în județul Timiș au fost recoltate și analizate pentru decelarea reziduurilor de tetraciclină 233 de probe de miere de albine de la producători particulari. Dintre acestea 145 probe sunt mieri poliflore, 63 probe miere de salcâm și 25 probe miere de tei. Din totalul de 233 de probe analizate 26,18% au fost încadrate prin conținutul lor în tetraciclină, în categoria eșantioanelor prezumtiv pozitive.

Urmărind conținutul de tetraciclină detectat în funcție de tipul de miere, distribuția în procente a probelor încadrate în categoria mierilor pozitive sunt: 22,75 % din mierile poliflore analizate, 22,22% din mierile de salcâm și 56% din probele de miere de tei după cum se observă din figura 37:

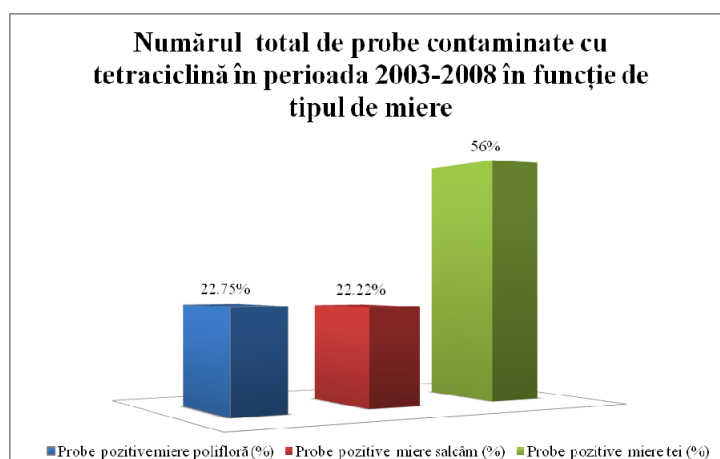


Figura 37 - Numărul probelor poluate cu reziduuri de tetraciclină în perioada 2003-2008

În aceeași perioadă, 2003 – 2008, în județul Timiș au fost recoltate și analizate pentru decelarea reziduurilor de streptomicină un număr de 186 de probe de miere de albine. Dintre acestea 108 sunt probe de miere poliflore, 52 probe miere de salcâm și 26 de probe de miere de tei. Din totalul de 186 de probe analizate 25 de probe, reprezentând 13,44 %, au fost încadrate prin conținutul lor în streptomicină, în categoria eșantioanelor prezumtiv pozitive.

Procentul de probe încadrate în categoria mierilor pozitive prin detectarea de streptomicină este: de 14,81% din categoria mierilor poliflore analizate, 13,46 % din mierile de salcâm și 7,69% din probele de miere de tei (Figura 38):

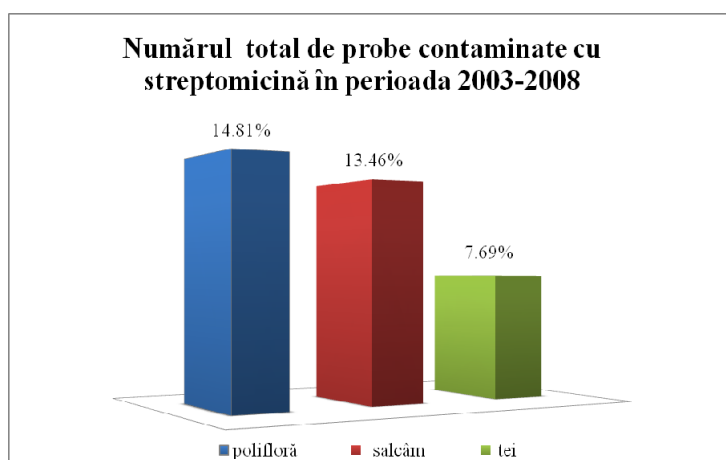


Figura 38 – Numărul probelor poluate cu reziduuri de streptomicină în perioada 2003-2008

În figurile 39 și 40 este reprezentată dinamica contaminării cu tetraciclină respectiv streptomicină a probelor de miere polifloră, de salcâm și de tei în județul Timiș, între anii 2003 -2008.

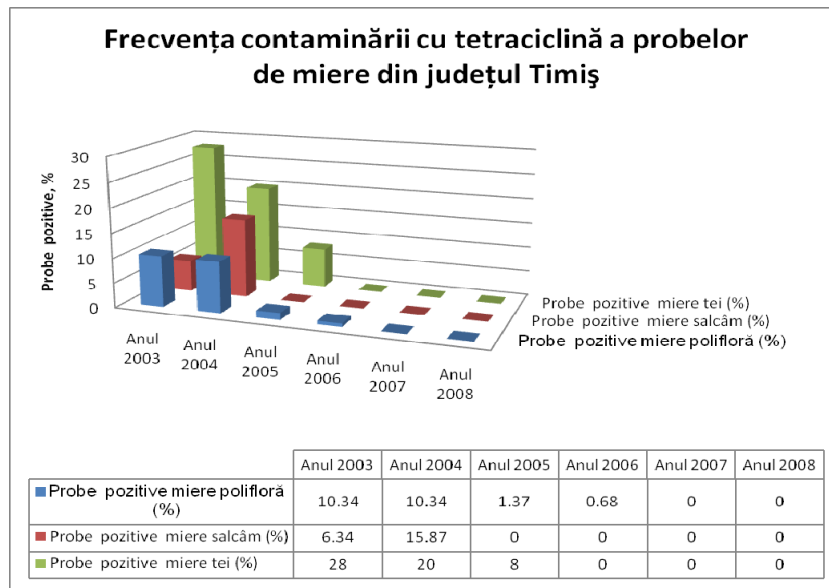


Figura 39 – Frecvența contaminării cu tetraciclină a probelor din județul Timiș între anii 2003-2008

Se observă că, frecvența contaminării cu tetraciclină a probelor din județul Timiș diferă de la an la an și de la un sort de miere la altul. Astfel, în anii 2003, 2004 și 2005, din numărul total de mieri analizate cea mai poluată miere cu tetraciclină este mierea de tei, iar în anul 2006 mierea polifloră.

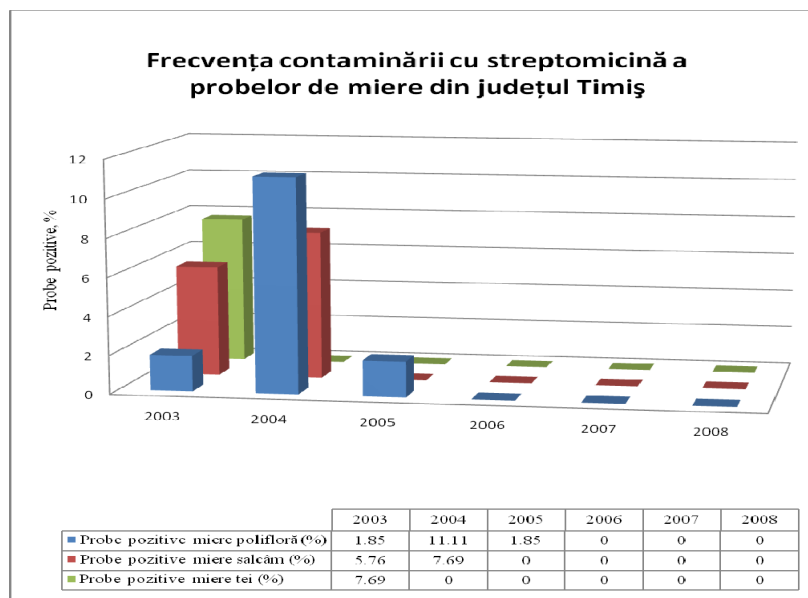


Figura 40 – Frecvența contaminării cu streptomicină a probelor din județul Timiș între anii 2003-2008

Frecvența contaminării cu streptomicină a probelor din județul Timiș diferă de la an la an și de la un sort de miere la altul. Astfel, din numărul total de mieri analizate cea mai poluată miere cu streptomicină în anul 2003 este mierea de tei, în anii 2004 și 2005 mierea polifloră, iar în anii 2006, 2007, 2008 nu au existat mieri pozitive.

Concluzii

Pentru a înțelege importanța gradului de toxicitate al antibioticelor din miere, menționăm că un gram de antibiotic poate contamina 100 de tone de miere. Așadar, prezența antibioticelor în mierea de albine, chiar și la un nivel foarte mic, poate provoca unei persoane care consumă frecvent acest produs o imunitate la antibiotic.

În perioada 2003-2008, din numărul total de probe de miere polifloră analizate 22,75% au fost poluate cu tetraciclină și 14,81% cu streptomicină. Prin analizarea probelor de miere de salcâm în vederea determinării tetraciclinei au fost identificate 22,22% probe pozitive, iar în vederea determinării streptomicinei s-au găsit 13,46% probe pozitive. Din numărul total de probe de miere de tei analizate în vederea determinării tetraciclinei, în perioada 2003-2008, au fost identificate 56% probe pozitive, iar 7,69% au fost probe în care s-a detectat prezența streptomicinei.

Distribuția în procente a probelor încadrate în categoria mierilor pozitive pentru tetraciclină în funcție de tipul de miere, sunt: 22,75 % din mierile poliflore analizate, 22,22% din mierile de salcâm și 56% din probele de miere de tei.

Mierile găsite pozitive pentru streptomicină sunt în procent de 14,81% mieri poliflore, 13,46 % mieri de salcâm și 7,69% mieri de tei.

Datorită creșterii exigenței privind nivelul antibioticelor din mierea destinată exportului folosirea acestora trebuie făcută cu foarte mare discernământ. În acest sens, s-a stabilit Planul Anual de Supraveghere Sanitară Veterinară a acestor reziduuri. Pentru a elimina riscul contaminării produselor alimentare cu reziduurile de tetraciclină și streptomicină este necesară monitorizarea lor.

2.3.C Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de tetraciclină în mierea de albine în funcție de timp și în funcție de sortul de miere

Obiectivul general al Uniunii Europene (UE) 2007 - 2013 - Strategia de sănătate, este protejarea sănătății umane. Una dintre acțiunile prevăzute de prezenta strategie este de a sprijini obținerea unor produse sigure [86].

Prezența tetraciclinei (TC) în miere poate cauza efecte dăunătoare asupra consumatorilor, prin reacții alergice, leziuni hepatice, îngălbenirea dinților și tulburări gastro-intestinale ca urmare a acțiunii antibioticelor asupra microflorei intestinale [87].

În conformitate cu Regulamentul (CE) nr 470/2009 [88] și Regulamentul (UE) nr. 37/2010 [89], în Uniunea Europeană, nivelul maxim de reziduuri (LMR) pentru tetraciclina în miere nu a fost stabilit. Acest lucru înseamnă că prezența reziduuri de tetraciclina în miere nu este permisă. În ciuda acestei decizii, unele țări au stabilit limite de acțiune admise de tetraciclină în miere. De exemplu, în Belgia, limita de acțiune pentru grupul de tetraciclină a fost stabilită la 20 μg/ kg. Franța aplică o limită de neconformitate de tetraciclină în miere de 15 μg/ kg, limita de

raportare, în Marea Britanie este de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, în timp ce nivelul de toleranță în Elveția este de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [90].

Laboratoarele comunitare de referință au propus pentru detectarea tetraciclinei din miere ca limita maximă admisă să fie 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [91].

În literatură se găsesc foarte puține informații despre stabilitatea tetraciclinei din miere în timpul stocării acesteia. Primul studiu a fost publicat în 1957 [92]. S-a constatat că după nouă luni de stocare la 34 °C, concentrația reziduurilor de tetraciclină în miere a scăzut de la concentrația inițială de 100 mg kg^{-1} la 2 mg kg^{-1} .

În studiul efectuat de Martel et al. [93] tetraciclina era foarte stabilă în miere: timpul de înjumătățire al clorhidratului de tetraciclină în miere stocată la 4, 20 și 35 de °C, la întuneric a fost de 520, 242 și respectiv 121 de zile. Čuláková et al. [94] a depozitat miere fortifiată cu 209.4 mg kg^{-1} de tetraciclină în întuneric, semiîntuneric și lumină naturală la o temperatură de 25°C. Timpul de înjumătățire al tetraciclinei în întuneric a fost de 210 zile și, pentru că este sensibilă la lumină, timpul de înjumătățire a scăzut la 147 de zile în semiîntuneric și la 19,3 zile în lumina naturală.

Recent, Tayar et. al [95] a raportat că nivelul reziduurilor de tetraciclină în miere a fost redus la 76% după 60 de zile de depozitare și conform Molino et. al [96] după 90 de zile de depozitare la 20 °C în întuneric, s-a observat o scădere de 50% a nivelului de tetraciclină.

Scopul acestui studiu a fost de a determina gradul de contaminare al probelor de miere cu tetraciclină și de a caracteriza, din punct de vedere cinetic, degradarea tetraciclinei în diferite tipuri de miere în timpul depozitării.

Trei tipuri de miere (două monoflore – de salcâm și de tei și una polifloră) au fost recoltate în anul 2009 de la patru apicultori din zona de vest a României.

Probele de miere au fost prelevate în următoarele condiții:

- masa probei 400 g
- temperatura 22± 2°C
- umiditate 45± 2%
- presiunea atmosferică 1007 hPa
- pH-ul initial al probelor a fost: 4,2 pentru mierea de salcâm, 4,1 pentru tei și pentru mierea polifloră 3,8.

Eșantioanele de miere au fost stocate în recipiente de sticlă, la temperatura camerei (21±1) °C, la întuneric pentru 30 de zile, fiind analizate la fiecare 3 zile prin metoda de imunodifuzie Elisa.

Toate aceste eșantioane de miere au fost analizate pentru a stabili concentrația reziduurilor de tetraciclină (TC).

Pentru determinarea conținutului de antibiotic s-a utilizat chitul Elisa (Ridascreen® Tetracycline, R-Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany) ce are limită de detecție 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sistemul de detecție pentru ELISA a fost cititorul de absorbantă pentru microplăci Tecan Sunrise. Prepararea standardelor și a reactivilor s-a făcut conform instrucțiunilor de lucru existente în kit.

În scopul de a demonstra fiabilitatea metodei, în conformitate cu Decizia Comisiei Europene 2002/657/CE au fost investigați următorii parametri: repetabilitatea, reproductibilitatea, recuperarea, specificitatea și precizia. Repetabilitatea s-a demonstrat prin analizarea a câte 6 probe de matrice îmbogățită

la trei niveluri de concentrație: 1, 1.5 și 2 din limita maximă admisă [97] - 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, calculându-se media și deviația standard (SD).

Recuperarea a fost demonstrată prin analizarea a câte 6 probe de matrice îmbogățită la trei niveluri de concentrație: 1, 1.5 și 2 din limita maximă admisă 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, calculându-se gradul de recuperare, care poate fi cuprins între 70 și 120 conform protocolului de lucru.

Reproductibilitatea s-a demonstrat prin analizarea a câte 6 probe de matrice îmbogățită la trei niveluri de concentrație: 1, 1.5 și 2 din limita maximă admisă 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, comparativ de către 2 analiști, calculându-se media și deviația standard (SD).

Precizia a fost demonstrată analizând 15 replicare îmbogățite cu 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclină, calculându-se media, deviația standard și coeficientul de variație (CV).

Pentru a demonstra specificitatea metodei o probă de miere a fost analizată în prealabil pentru a verifica dacă este lipsită de substanțe antimicrobiene. S-a împărțit apoi în 6 eșantioane care au fost fortificate cu 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclină și 6 probe fortificate cu 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ clortetraciclină. S-a calculat media și deviația standard.

Tabelul 30 – Parametrii care demonstrează fiabilitatea metodei

Parametrii		Cantitatea de tetraciclină adăugată în probă, $\mu\text{g}/\text{kg}$			Cantitatea de clortetraciclină adăugată în probă, $\mu\text{g}/\text{kg}$
		20	30	40	30
Repetabilitate*	Media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$	20.3 \pm 0.67	30.5 \pm 0.54	39.8 \pm 0.28	-
Recuperare*	%	101.5	101.6	99.5	-
Reproductibilitate*	Analist 1 Media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$	20.3 \pm 0.67	30.5 \pm 0.54	39.8 \pm 0.28	-
	Analist 2 Media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$	19.66 \pm 0.33	28.44 \pm 0.91	39.85 \pm 0.20	-
Precizie**	Media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$	20.23 \pm 0.5	-	-	-
	CV, %	2.47	-	-	-
Specificitate*	Media \pm SD, $\mu\text{g}/\text{kg}$	-	29.65 \pm 0.18	-	ND***

*numărul de replicare analizate (n=6); ** numărul de replicare analizate (n=15);

***nedetectabil

Pregătirea și testarea probelor s-a făcut conform protocolului de lucru furnizat de către firma producătoare a kitului, astfel: 1 gram de probă de miere a fost dizolvată în 49 ml PBS buffer (pH = 7,4). Pentru a obține o mai bună dizolvare a probei, soluția a fost agitată pe Vortex și ținută în baia ultrasonic timp de 5 minute. Din această soluție se folosesc 50 μ L pentru continuarea analizei.

În urma citirii la aparatul Tecan la o lungime de undă de 450 nm, s-au obținut valorile absorbanțelor, atât pentru standarde cât și pentru probe.

Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale obținute în urma analizării probelor de miere sunt redată în tabelul 31:

Tabelul 31 - Cantitatea de tetraciclină detectată în μ g/kg, în cele trei tipuri de miere

Tipul de miere	Concentrația de tetraciclină detectată (μ g/kg)			
	Apicultorul 1	Apicultorul 2	Apicultorul 3	Apicultorul 4
Salcâm	38,32	19,14	27,03	16,18
Tei	15,47	21,27	18,04	60,67
Polifloră	16,63	30,72	15,47	22,89

Reprezentând concentrațiile de reziduu detectate în fiecare sort de miere (figurile 41, 42 și 43), se evidențiază faptul că, cantitatea cea mai mare de antibiotic a fost identificată în mierea de tei, recoltată de la apicultorul numărul 4, urmată de cea de salcâm de la apicultorul numărul 1. În cazul mostrelor de miere polifloră, tetraciclina s-a determinat în cantitatea cea mai mare în proba recoltată de la cel de-al doilea apicultor.

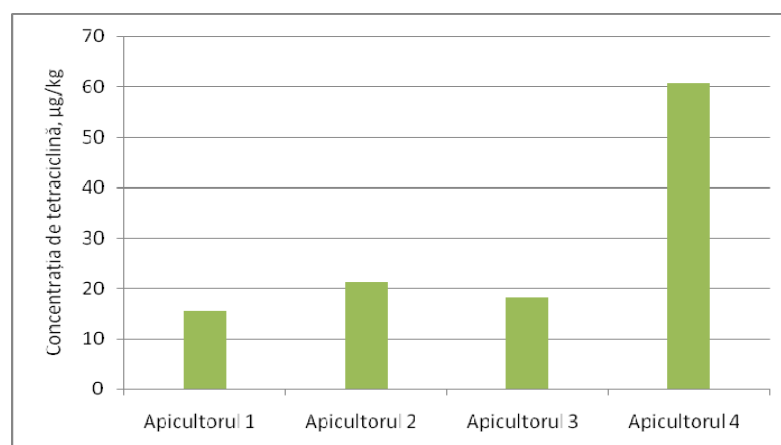


Figura 41 – Concentrația de tetraciclină detectată în mierea de tei în funcție de apicultorul de la care s-a recoltat proba

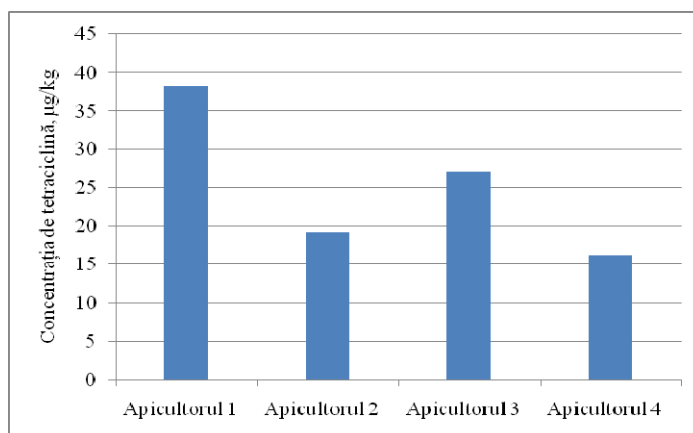


Figura 42 – Concentrația de tetraciclină detectată în mierea de salcâm în funcție de apicultorul de la care s-a recoltat proba

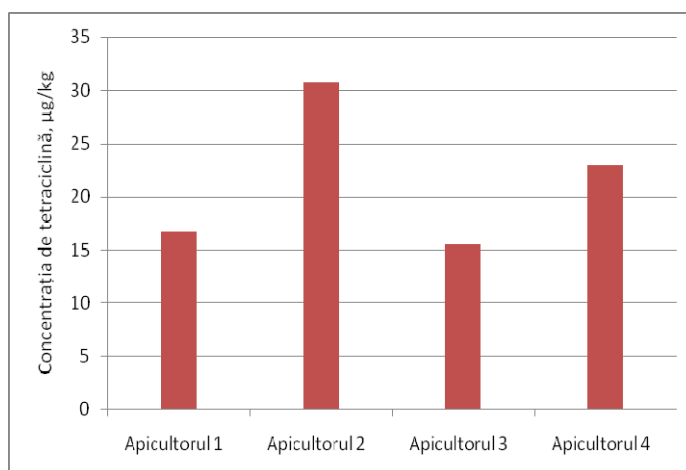


Figura 43 – Concentrația de tetraciclină detectată în mierea polifloră în funcție de apicultorul de la care s-a recoltat proba

Analizând concentrația de antibiotic detectată în funcție de tipul de miere pe fiecare apicultor în parte, se observă că, dintre mierile recoltate de la apicultorul numărul 1 cea mai poluată cu tetraciclină este cea de salcâm (figura 44), în cele recoltate de la apicultorul numărul 2 concentrația cea mai mare de tetraciclină a fost detectată în mierea polifloră (figura 45), la apicultorul 3 în mierea de salcâm (figura 46), iar la apicultorul numărul 4 în mierea de tei (figura 47).

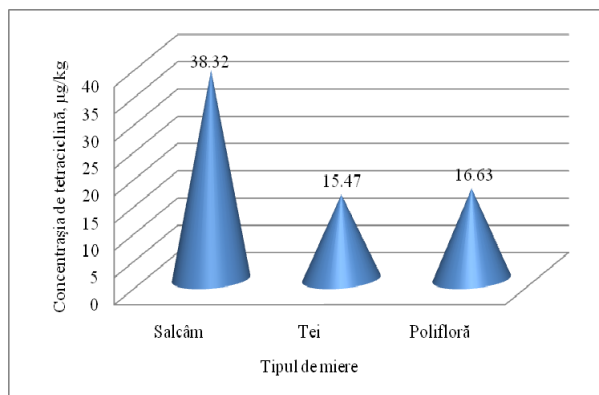


Figura 44 - Concentrația de tetraciclină detectată de la apicultorul numărul 1, în funcție de tipul de miere

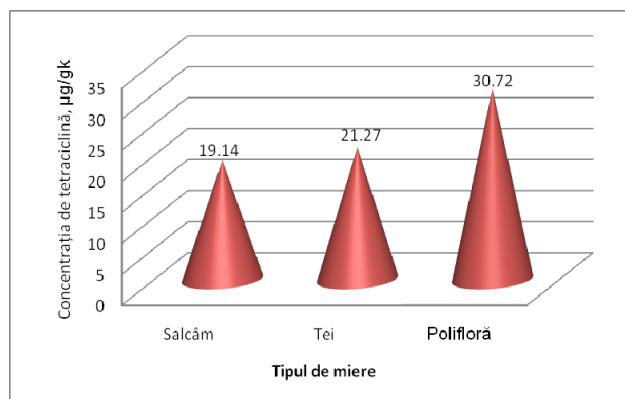


Figura 45 - Concentrația de tetraciclină detectată de la apicultorul numărul 2, în funcție de tipul de miere

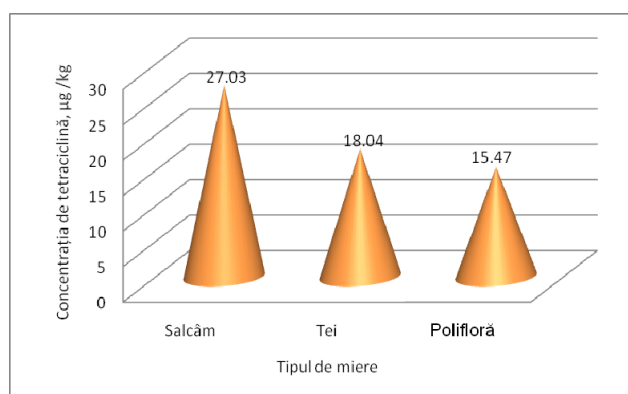


Figura 46 - Concentrația de tetraciclină detectată de la apicultorul numărul 3, în funcție de tipul de miere

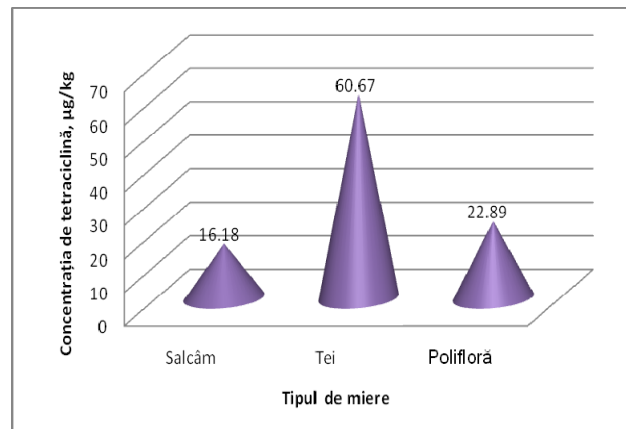


Figura 47 - Concentrația de tetraciclină detectată de la apicultorul numărul 4, în funcție de tipul de miere

Făcând o medie a concentrațiilor obținute pe fiecare tip de miere, se observă că, cea de tei este cea mai poluată dintre ele, după cum este redat și în figura 48:

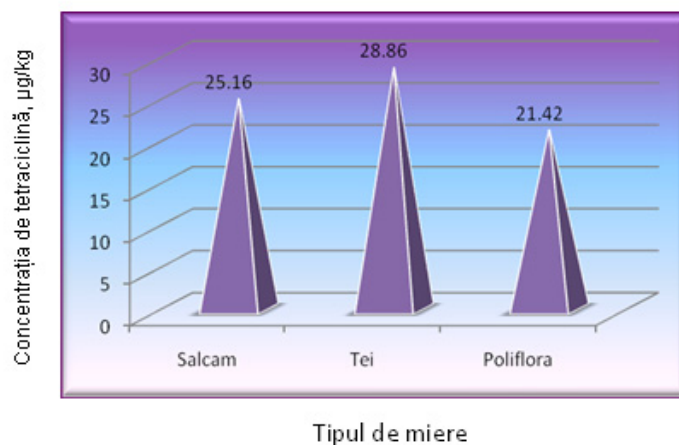


Figura 48 - Concentrația de tetraciclină în funcție de tipul de miere

Prezența reziduurilor de tetraciclină în eşantioanele de miere colectate de la cei patru apicultori din zona de vest a României sunt prezentate în figura 49:

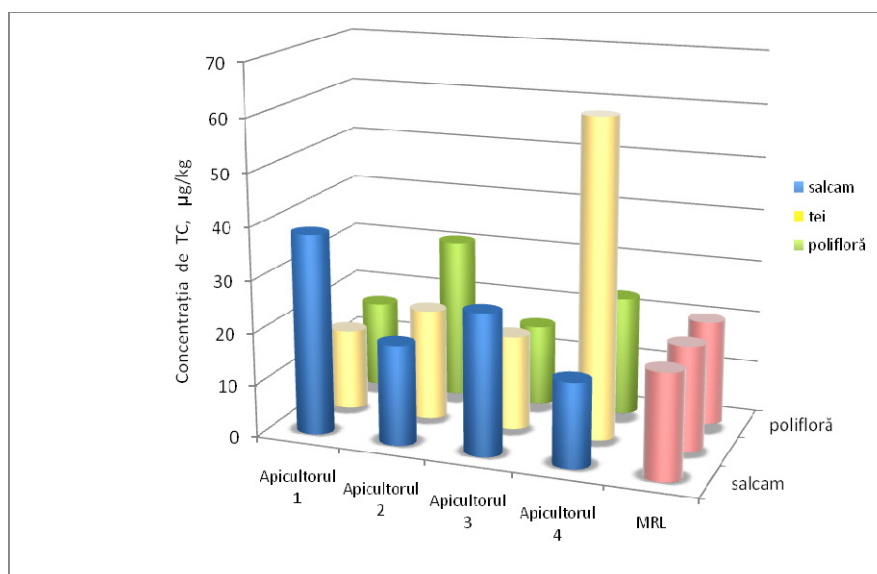


Figura 49 - Concentrația de tetraciclină detectată în mierea testată precum și limita maximă admisă (MRL)

După cum se observă în figura 49, dintre toate eșantioanele de miere analizate, 50% au fost pozitive. Nivelul cel mai înalt de tetraciclină a fost detectat în eșantionul de miere de tei (60,67 [µg/kg]). Pentru celelalte tipuri de miere, conținutul de tetraciclină găsit a fost de 38,32 [µg/kg] în mierea de salcâm, respectiv 30,72 [µg/kg] în mierea polifloră. În cazul mierii de salcâm, cantitatea cea mai mare de tetraciclină a fost detectată în mierea recoltată de la primul apicultor, iar cea mai poluată cu antibiotic dintre mierile de tei recoltate, a fost cea de la apicultorul numărul 4. În urmă analizării mostrelor de miere polifloră recoltate de la cei patru apicultori, cel mai mare grad de poluare o are cea de la apicultorul numărul 2.

Pentru a studia degradarea în timp a reziduurilor de tetraciclină, eșantioanele din fiecare tip de miere, cu cele mai înalte nivele a reziduurilor de tetraciclină, au fost introduse în pahare Erlenmeyer și stocate la temperatura laboratorului (21±1)°C, la întuneric. Experimentele au avut loc de la începutul lunii August 2009, până în Septembrie 2009, aceste probe fiind analizate din 3 în 3 zile. Determinările experimentale sunt redată în tabelele 32, 33 și respectiv 34:

Tabelul 32- Concentrația de tetraciclină detectată în mierea de salcâm

Timp, zile	Concentrația de tetraciclină, [µg/kg]	Nivelul de TC, %
0	38.32	100.00
3	38	99.16
6	37.6	98.12
9	37.44	97.70

12	37.2	97.08
15	37	96.56
18	36.68	95.72
21	36.4	94.99
24	36.26	94.62
27	35.9	93.68
30	35	91.34
33	34.8	90.81

Tabelul 33 - Concentrația de tetraciclină detectată în mierea polifloră

Timp, zile	Concentrația de tetraciclină, [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Nivelul de TC, %
0	30.72	100.00
3	30.54	99.41
6	29.99	97.62
9	29.29	95.35
12	29.06	94.60
15	28.9	94.08
18	28.64	93.23
21	28.2	91.80
24	27.72	90.23
27	27.36	89.06
30	26.53	86.36
33	26	84.64

Tabelul 34 - Concentrația de tetraciclină detectată în mierea de tei

Timp, zile	Concentrația de tetraciclină, [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Nivelul de TC, %
0	60.67	100.00
3	59.7	98.40
6	59.18	97.54
9	58.77	96.87
12	58.49	96.41
15	58.2	95.93
18	57.8	95.27
21	57.5	94.78
24	57	93.95
27	56.08	92.43
30	54.83	90.37
33	54.4	89.67

Variația nivelului de tetraciclină în cele trei tipuri de miere, pe durata stocării la temperatura camerei și la întuneric este redată în figura 50.

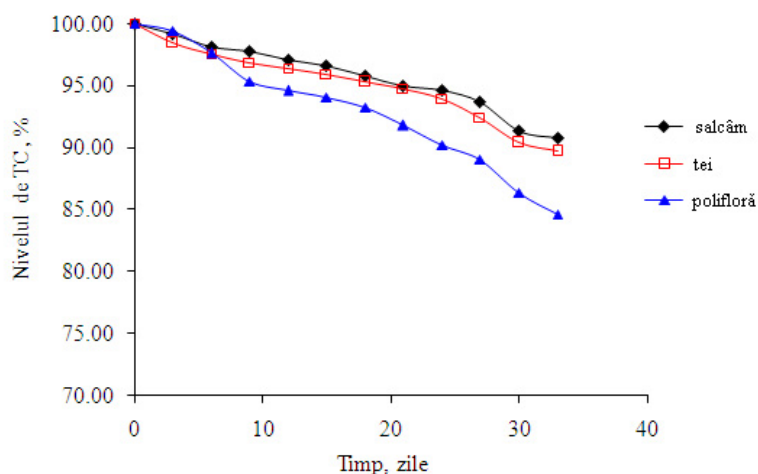


Figura 50 - Variația nivelului de tetraciclină în cele trei tipuri de miere, pe durata stocării la temperatura camerei și la întuneric

Din grafic, poate fi observată o continuă scădere a concentrației de tetraciclină, pentru toate eșantioanele de miere.

După trei zile de stocare, nivelul de tetraciclină a scăzut cu 2,5 % pentru toate cele trei eșantioane de miere. Această scădere a continuat, dar a fost mai pronunțată în cazul mierii poliflore. În ziua 30, a fost obținută o scădere a nivelului de tetraciclină cu 10% în cazul mierii monoflore (salcâm și tei) și 15% în cazul mierii poliflore.

Molino et al. (2011) [96] a constatat o scădere de 21% a nivelului de tetraciclină în miere după 30 de zile de depozitare la o temperatură 20°C, dar tipul mierii nu a fost specificat. Rezultate asemănătoare au fost obținute de Culacova et al. (2008) [94] și Martel et. all (2006) [93].

În scopul caracterizării din punct de vedere teoretic a proceselor fizico-chimice care au loc în cadrul fenomenelor de degradare a tetraciclinei în cele trei sorturi de miere a fost adoptată ipoteza utilizării unui model cinetic de ordinul întâi, reprezentat prin ecuația de forma $C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$ (25),

obținută prin integrarea relației $-\frac{dc}{dt} = k \cdot c$ [98]

unde: C – concentrația de tetraciclină în miere la momentul t ($\mu\text{g}/\text{kg}$); C_0 – concentrația inițială de tetraciclină ($\mu\text{g}/\text{kg}$); k – constantă cinetică de ordinul întâi.

Relația (25) se logaritmează rezultând o ecuație de forma:

$$\ln c = \ln c_0 - k \cdot t \text{ din care se obține } \ln \frac{c}{c_0} = -k \cdot t; \text{ prin prelucrarea acesteia}$$

$$\text{rezultă relația: } -\ln \frac{c}{c_0} = k \cdot t.$$

Pentru determinarea valorilor constantei k , s-au folosit datele experimentele din tabelele 32, 33 și 34.

Prin prelucrarea acestor date, trasând graficul $-\ln(c/c_0)$ funcție de timpul t , au fost determinate valorile constantei k . Dependența $-\ln(c/c_0)$ funcție de timpul t este o dreaptă cu panta egală cu valoarea constantei de ordinul unu, k .

Degradarea tetraciclinei în timp în mierea de salcâm, stocată la temperatura camerei este reprezentată în figura 51:

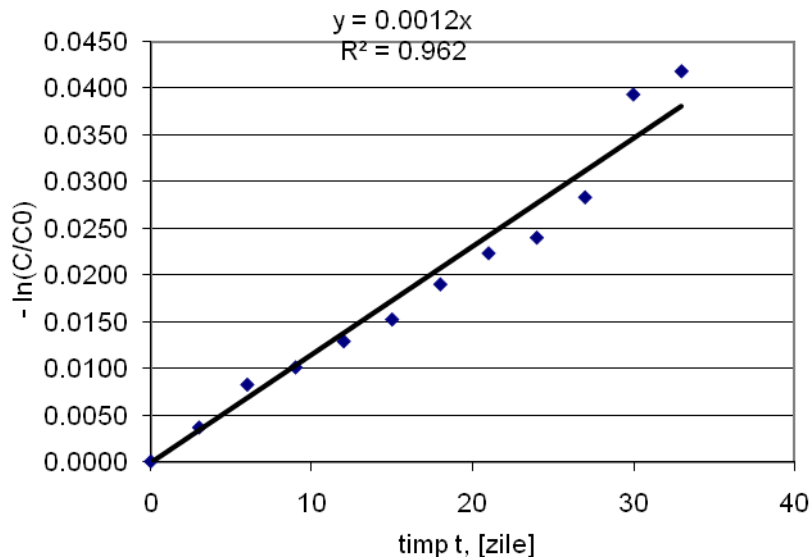


Figura 51 - Evoluția degradării tetraciclinei în timp în mierea de salcâm

Degradarea tetraciclinei în timp în mierea polifloră, stocată la temperatura camerei este reprezentată în figura 52:

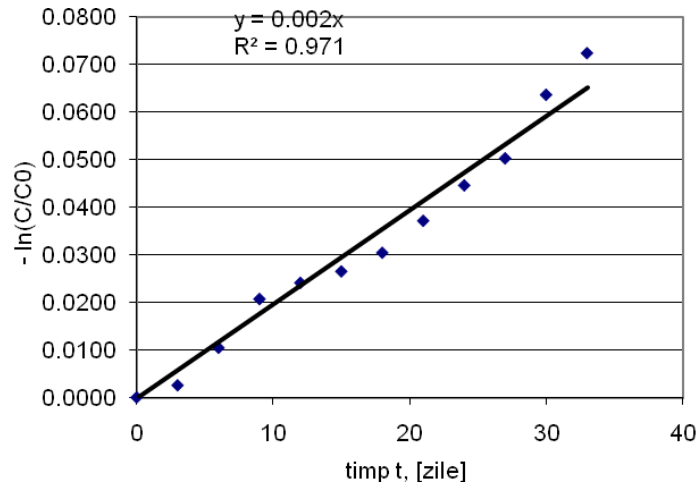


Figura 52 – Evoluția degradării tetraciclinei în timp în mierea polifloră

Degradarea tetraciclinei în timp în mierea de tei, stocată la temperatura camerei este reprezentată în figura 53:

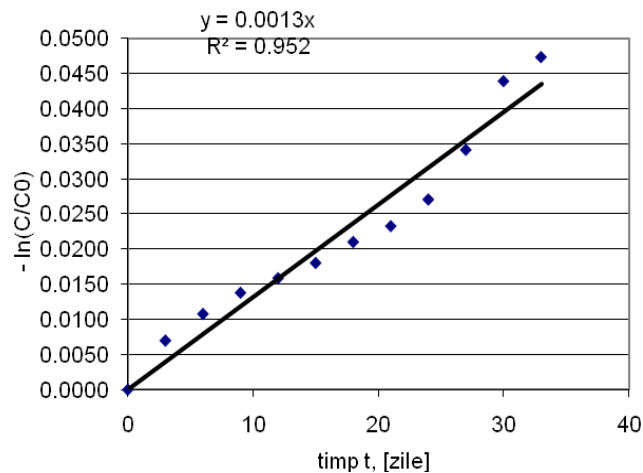


Figura 53 - Evoluția degradării tetraciclinei în timp în mierea de tei

Din aceste date, valorile lui k au fost evaluate prin trasarea $-\ln(C/C_0)$ funcție de timpul t (figura 54). Graficul, $-\ln(C/C_0)$ funcție de timpul t este o dreaptă cu panta egală cu valoarea constantei de ordinul întâi, k .

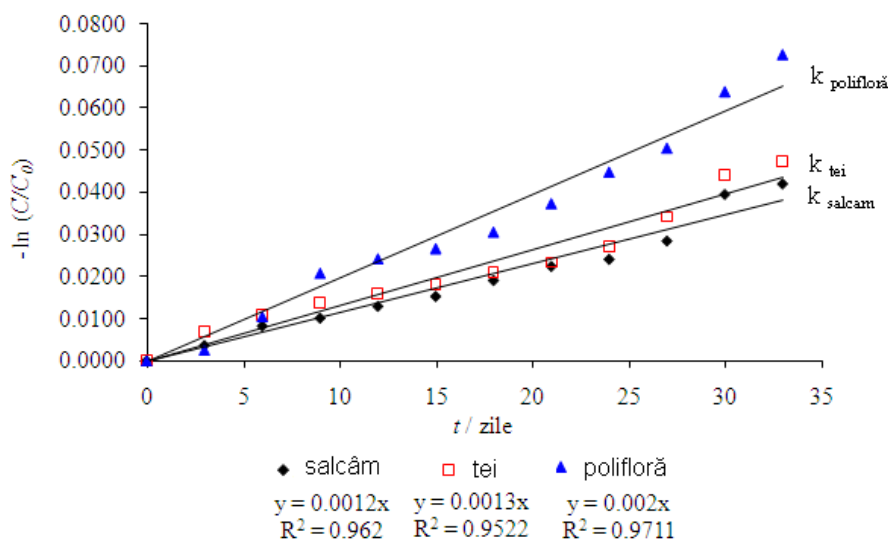


Figura 54 - Evoluția degradării tetraciclinei în timp în cele trei tipuri de miere

Timpul de înjumătățire pentru procesul de degradare a tetraciclinei este independent de concentrația inițială și este dat de formula:

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (26) \quad [99]$$

Valorile pentru constanta cinetică de ordinul întâi (k) și pentru timpul de înjumătățire ($t_{1/2}$) determinate sunt prezentate în tabelul 35:

Tabelul 35 – Valorile constantei k și a timpul de înjumătățire, $t_{1/2}$, valori ale degradării tetraciclinei din mierea păstrată la temperatura camerei, în întuneric.

Tipul de miere	$k \cdot 10^3$, [zile ⁻¹]	$t_{1/2}$, [zile]	R^2
Salcâm	1,2	251	0,9522
Tei	1,3	232	0,9620
Polifloră	2,0	151	0,9711

În toate cazurile, valorile R^2 sunt mai mari 0,95, indicând adecvanța datelor cu modelul cinetic de ordin întâi. Valorile lui k sunt aproape identice pentru cele două tipuri de miere monofloră: de salcâm și de tei. Prin compararea vitezelor de degradare a tetraciclinei în mierea monofloră și în cea polifloră, se poate observa că, degradarea în eșantionul de miere polifloră a fost de 1,6 ori mai rapidă decât în cea monofloră. Aceasta se poate datora diferențelor cantitative și calitative a compoziției mierii monoflore și poliflore, precum și datorită pH-ului. Degradarea tetraciclinei în mierea polifloră se mai poate datora și prezenței enzimelor.

Analizând pH-ul probelor inițiale și valorile timpului de înjumătățire a tetraciclinei în diferite tipuri de miere, se observă că, timpul de înjumătățire a tetraciclinei crește cu creșterea pH-ului. Corelația liniară între cei doi parametri este prezentată în figura 55 [100]:

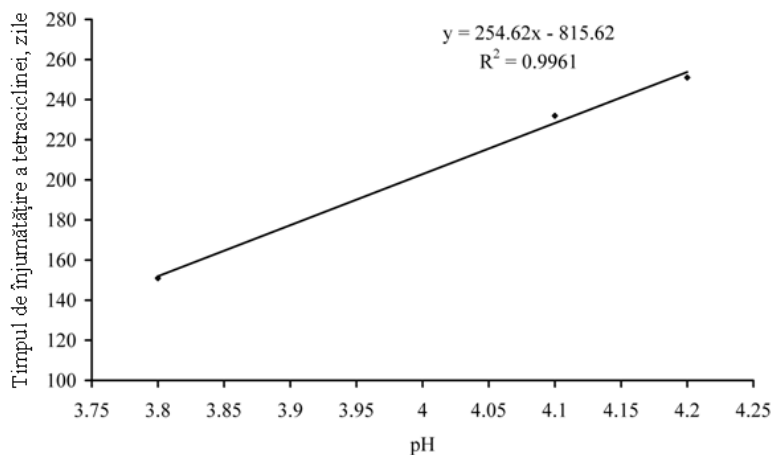


Figura 55 - Variația timpului de înjumătățire în funcție de pH

Corelația liniară foarte bună între cei doi parametri este confirmată de R^2 , coeficient de corelație egal cu 0,9961. Valorile pH-ului au fost măsurate, de asemenea, la sfârșitul studiului de stocare și rezultatele au arătat că pH-ul probelor au fost constante în timpul celor 30 de zile de analiză.

Pe baza datelor experimentale, redată în tabelele 32, 33 și 34 s-a reprezentat grafic variația concentrației de tetraciclină în mierea de tei, salcâm și polifloră după cum se observă și în figurile 56, 57 și 58:

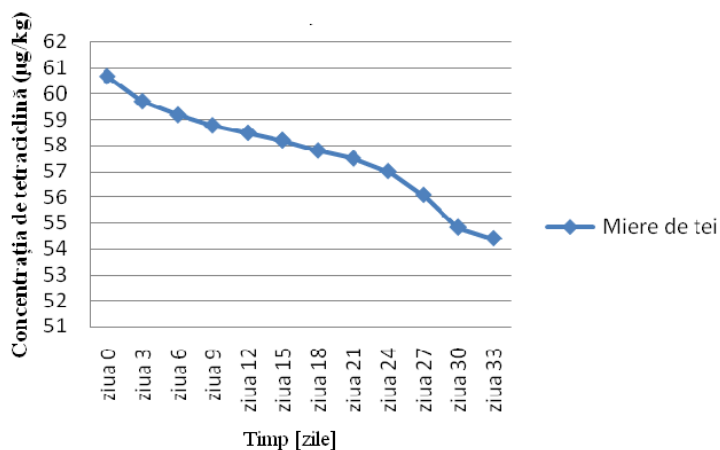


Figura 56 - Variația concentrației de tetraciclină în mierea de tei în funcție de timp

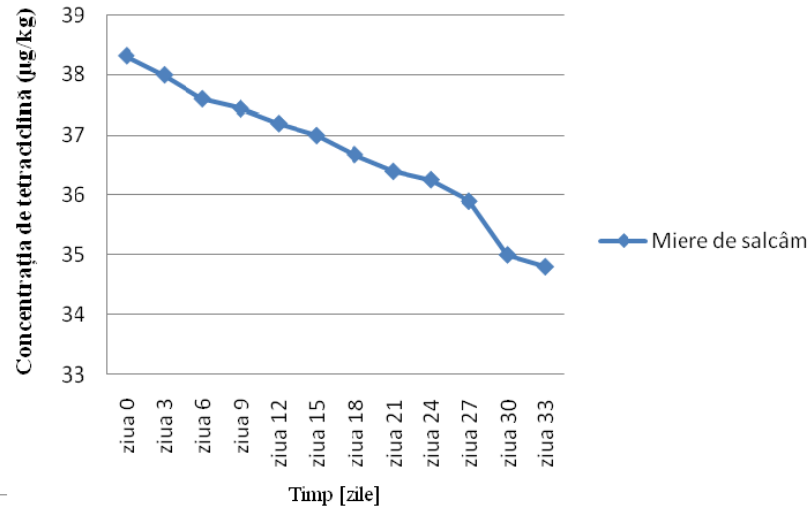


Figura 57 - Variația concentrației de tetraciclină în mierea de salcâm în funcție de timp

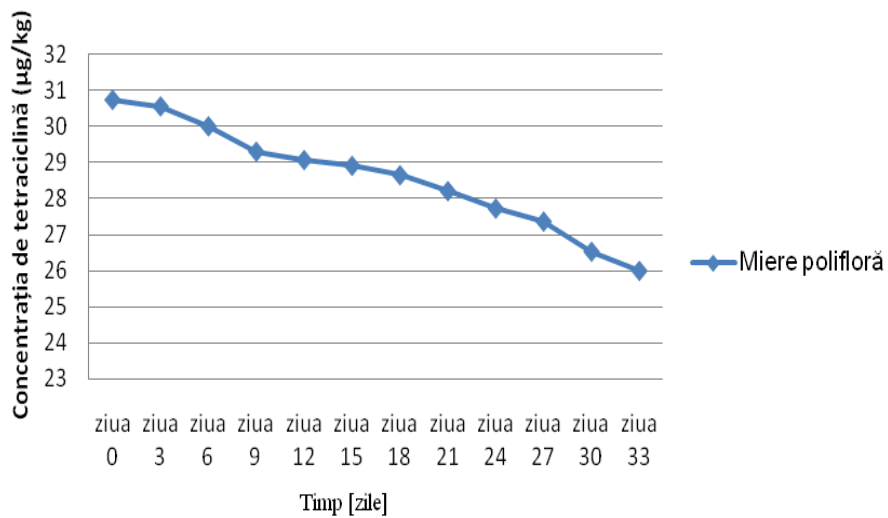


Figura 58 - Variația concentrației de tetraciclină în mierea polifloră în funcție de timp

Punând în același grafic (figura 59) reprezentările celor trei seturi de concentrații de tetraciclină se observă o evoluție similară pentru cele trei tipuri de miere luate în studiu:

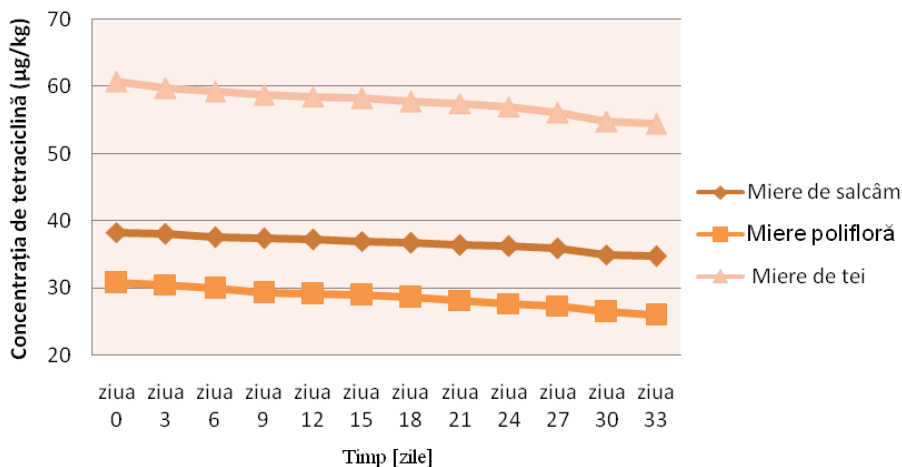


Figura 59 - Variația concentrației de tetraciclină în funcție de timp în cele trei tipuri de miere

În vederea verificării exactității rezultatelor obținute prin prelucrarea determinărilor experimentale, s-a construit o diagramă de control.

Diagrama de control este un grafic utilizat în studiul schimbărilor produse în instrumentul de măsurare în funcție de timp. Informațiile sunt introduse în ordine cronologică. Diagrama de control are mereu o linie centrală CL, ce reprezintă media, o linie superioară pentru limita de control superioară (UCL) și o linie inferioară pentru limita de control inferioară (LCL) [101, 102, 103, 104].

Diagramele de control sunt unele dintre cele mai sofisticate instrumente ale sistemului statistic de calitate. Atâta timp cât punctele sunt între LCL și UCL, se presupune că procesul este în control și nu este necesar să se ia nici o măsură. În cazul în care un punct este situat în afara limitelor se presupune că procesul este în afara controlului, și sunt necesare acțiuni corective pentru a găsi și a elimina cauzele care au dus la aceea comportare. Chiar dacă toate punctele de pe diagrama de control sunt situate între LCL și UCL, dacă ele se comportă într-un mod aleator acest lucru reprezintă o indicație că procesul este din nou în afara controlului.

Una dintre cele mai importante acțiuni care poate ajuta la menținerea calității rezultatelor chimice, este de a colecta date relevante în mod constant în timp și de a le interpreta cu grijă cu ajutorul diagramelor de control.

Acuratețea rezultatelor arată gradul de apropiere dintre rezultatul măsurat și valoarea adevărată. Limitele de acceptabilitate pentru diagramele de control sunt cuprinse între limita superioară 3 SD, respectiv 2 SD și limita inferioară 3 SD, respectiv 2 SD. Prin observarea directă a hărții de control se apreciază acuratețea măsurărilor, valoarea determinată trebuie să se situeze între limitele de acceptabilitate: $M-2SD$, $M+2SD$, $M-3SD$, $M+3SD$.

Unde:

- M este media valorilor concentrației probei
- SD este deviația standard

O probă de miere de salcâm, lipsită de substanțe antimicrobiene a fost împărțită în 12 subșantioane, care apoi au fost fortificate la un nivel de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetraciclină. Aceste probe s-au analizat în vederea detectării concentrației de

tetraciclină, iar rezultatele obținute au fost utilizate pentru a calcula valorile medii ale concentrației de tetraciclină și respectiv deviația standard (SD), în scopul obținerii limitelor de acceptabilitate în vederea construirii diagramei de control.

Din diagrama de control obținută se observă, că valorile sunt situate în limitele de acceptabilitate, demonstrându-se astfel acuratețea rezultatelor.

Pentru elaborarea diagramelor de control, pentru tetraciclină, s-a calculat media concentrațiilor de tetraciclină și deviația standard (SD), obținându-se următoarele valori pentru limitele de acceptabilitate:

- $M - 2SD = 33.96$
- $M + 2SD = 39.48$
- $M - 3SD = 32.58$
- $M + 3SD = 40.86$

În figura 60 este reprezentată diagrama de control pentru mierea de salcâm, în cazul tetraciclinei:

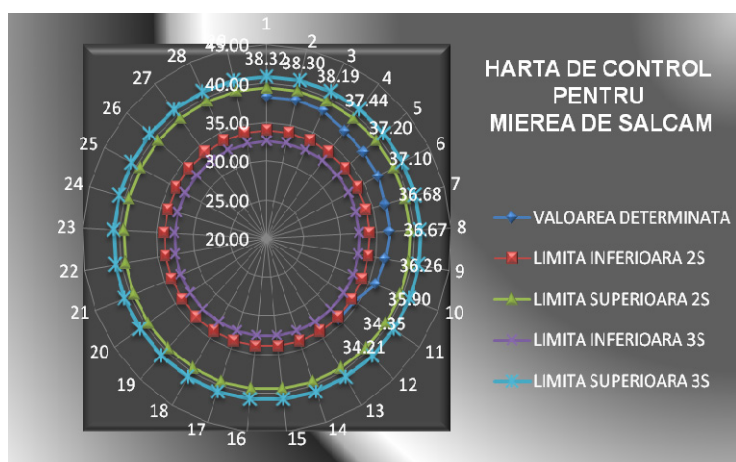


Figura 60 – Diagrama de control pentru mierea de salcâm

Din figura 60, se observa că, valorile măsurate se găsesc în intervalul de încredere. Prin analiza diagramei de control prezentată, se observă că măsurătorile experimentale s-au efectuat cu o acuratețea și o precizie ridicată. Acest lucru demonstrează faptul că rezultatele obținute în urma analizei unor probe reale vor fi rezultate precise și valide.

Concluzii

Deși, studiile de degradare a concentrațiilor de tetraciclină din miere sunt destul de rare în literatura de specialitate, rezultatele prezentate în această studiu de caz sunt în concordanță cu cele raportate de către alți autori. Toate acestea subliniază necesitatea îmbunătățirii educației apicultorilor, în scopul evitării utilizării într-un mod neadecvat a antibioticelor, prevenind astfel contaminarea mierii.

Făcând o medie a concentrațiilor obținute pe fiecare tip de miere recoltate de la cei patru apicultori, se observă că dintre cele trei sorturi de miere cea de tei este cea mai poluată dintre ele. Dintre eşantioanele de miere analizate, 50% au fost pozitive, nivelul cel mai înalt de tetraciclină fiind detectat în eşantionul de miere de tei.

Rezultatele prezentate au arătat că, concentrația de tetraciclină a scăzut în timp, în toate probele de miere, degradarea tetraciclinei având loc mult mai rapid în mierea polifloră. De remarcat unele modificări în conținutul de antibiotic la câteva luni de păstrare.

Pe baza rezultatelor experimentale s-a constatat că în toate tipurile de miere analizate pentru descrierea degradării reziduurilor de tetraciclină a fost adoptat un model cinetic de ordinul întâi.

Timpul de înjumătățire a tetraciclinei crește cu creșterea pH-ului, corelația liniară foarte bună între cei doi parametri fiind confirmată de R^2 , coeficient de corelație.

Variația concentrației de tetraciclină în funcție de timp are o evoluție similară pentru cele trei tipuri de miere.

Fiabilitatea metodei s-a demonstrat prin investigarea următorilor parametri: repetabilitatea, reproductibilitatea, recuperarea, specificitatea și precizia.

Analizând diagrama de control prezentată, se observă că măsurătorile experimentale s-au efectuat cu o acuratețea și o precizie ridicată, obținându-se rezultate precise și valide.

Modelul cinetic caracterizează modul de degradare al tetraciclinei în timp și este un model cinetic de ordinul unu.

2.3.D Studiul stabilității limitei concentrației reziduurilor de streptomycină în mierea de albine în funcție de timp și de temperatură

Se pune tot mai mare accent pe calitatea alimentelor, de aceea prezența contaminanților (streptomycină sau tetraciclină) trebuie tratată cu deosebită atenție. Pentru diminuarea sau chiar eliminarea acestor reziduuri din mierea de albine se urmărește dezvoltarea de strategii de management, având la bază principiul "prevenirea este mai eficientă decât tratarea". Protejarea consumatorului împotriva efectelor toxice ale acestor contaminanți, impune încurajarea unei bune practici apicole [105], depozitarea să se facă în condiții corespunzătoare, iar apicultorii să respecte termenele impuse de tratamente, precum și dozele recomandate în simptomatologia diferitelor boli ale albinelor [106].

Astfel, în miere, în urma tratamentelor aplicate albinelor, reziduurile de streptomycină pot să apară dacă nu se respectă perioada de descompunere sau dacă medicamentul nu este administrat corect. Concentrațiile ridicate de streptomycină au efecte ototoxice și nefrotoxice.

Concentrații scăzute, cum sunt cele care pot să apară în alimente, pot cauza alergii, dezechilibre ale florei intestinale și favorizează microorganismele rezistente. Prezența reziduurilor de antibiotice în miere este o problemă de sănătate publică, de aceea pentru a proteja consumatorul este necesar ca administrarea substanțelor antimicrobiene să se facă cu mare strictețe.

Controlul calității produselor este considerat marca industriei alimentare, condiție esențială ca un produs să fie competitiv [107].

Scopul studiului îl constituie urmărirea stabilității reziduurilor de streptomycină la diferite temperaturi, în mierea de albine.

Condițiile de prelevare a eșantioanelor au fost următoarele:

- masa probei 400 g

- temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- umiditate $47 \pm 2\%$
- presiunea atmosferică 1011 hPa

Proba de miere de tei a fost recoltată într-un recipient de sticlă. În prealabil a fost analizată cu ajutorul kitului Elisa, pentru a verifica dacă există în compoziția ei substanțe antimicrobiene. După ce s-a constatat absența antibioticilor din mierea supusă testului, aceasta a fost fortificată cu $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ standard de streptomicină. Este necesar să se asigure calitatea rezultatelor analizei, acest obiectiv fiind atins prin folosirea unei metode validate.

Pentru analizarea probelor s-a folosit aceeași metodă, același analist, aceeași aparatură (cititor de probe, micropipete, rotavapor) și același chit. Depozitarea probei de miere de albine s-a făcut în condiții de temperatură normale, în flacon de sticlă, la temperatura camerei (21°C - 22°C), în spațiu aerisit și în absența luminii.

Pentru a determina conținutul de antibiotic s-a utilizat chitul Elisa R-Biopharm cu limită de detecție de $20 \mu\text{g}/\text{kg}$. Pregătirea și testarea probelor s-a făcut conform protocolului de lucru furnizat de către firma producătoare a kitului [108]. Cu ajutorul aparatului Tecan Sunrise, componentă a Liniei Elisa, s-au obținut valori ale absorbanțelor, atât pentru standarde cât și pentru probă. În funcție de absorbanțele citite la lungimea de undă de 450 nm , cu ajutorul softului Ridascreen R-biopharm a fost calculată valoarea concentrației probei luate în studiu. Experimentele au avut loc de la începutul lunii noiembrie 2009, până în decembrie 2010, aceste probe fiind analizate din 3 în 3 zile.

Rezultate și discuții

Rezultatele experimentale obținute în urma analizelor se regăsesc în tabelul

36:

Tabelul 36 - Concentrația de streptomicină detectată, în $\mu\text{g}/\text{kg}$

Ziua	Concentrația de streptomicină ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
0	48.3
3	47.1
6	47.0
9	46.1
12	45.9
15	45.1
18	44.9
21	44.4
24	43.8
27	43.4
30	43.0
33	42.8

Reprezentând grafic concentrația de streptomicină detectată în urma testării probei fortificate la un nivel de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, s-a obținut următoarea evoluție pentru antibioticul detectat (Figura 61)

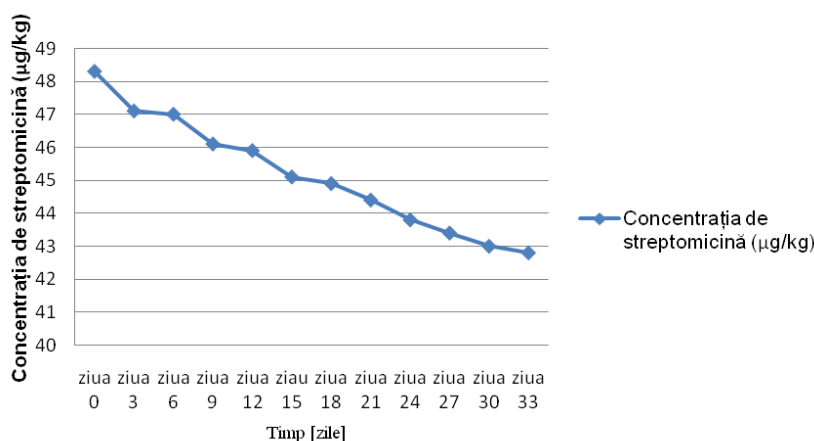


Figura 61 - Variația concentrației de streptomicină în funcție de timp

Din grafic, poate fi observată o scădere continuă, dar nesemnificativă a concentrației de streptomicină, pentru proba de miere studiată.

După trei zile de stocare, nivelul de streptomicină a scăzut cu 2,48 %. Această scădere a continuat, ajungând în ziua a cincisprezecea, la o scădere a nivelului de streptomicină cu 6,25 %, iar în ultima zi de analiză la 11,38 %.

În scopul caracterizării din punct de vedere teoretic a proceselor fizico-chimice care au loc în cadrul fenomenelor de degradare a streptomicinei în mierea de tei a fost adoptată ipoteza utilizării unui model cinetic de ordinul întâi, reprezentat prin ecuația de forma $C = C_0 \cdot e^{-kt}$ (27),

obținută prin integrarea relației $-\frac{dc}{dt} = k \cdot c$

unde: C – concentrația de streptomicină în miere la momentul t ($\mu\text{g}/\text{kg}$); C_0 – concentrația inițială de streptomicină ($\mu\text{g}/\text{kg}$); k – constantă cinetică de ordinul întâi.

Pentru determinarea valorilor constantei k , s-au folosit datele experimentele din tabelul 36.

Prin prelucrarea acestor date, trasând graficul $-\ln(c/c_0)$ funcție de timpul t , au fost determinate valorile constantei k . Dependența $-\ln(c/c_0)$ funcție de timpul t este o dreaptă cu panta egală cu valoarea constantei de ordinul unu, k .

Relația (27) se logaritizează rezultând o ecuație de forma:

$\ln c = \ln c_0 - k \cdot t$ din care se obține $\ln \frac{c}{c_0} = -k \cdot t$; prin prelucrarea acesteia rezultă

relația: $-\ln \frac{c}{c_0} = k \cdot t$.

Din datele experimentale, valorile lui k au fost evaluate prin trasarea $-\ln(C/C_0)$ funcție de timpul t (Figura 62).

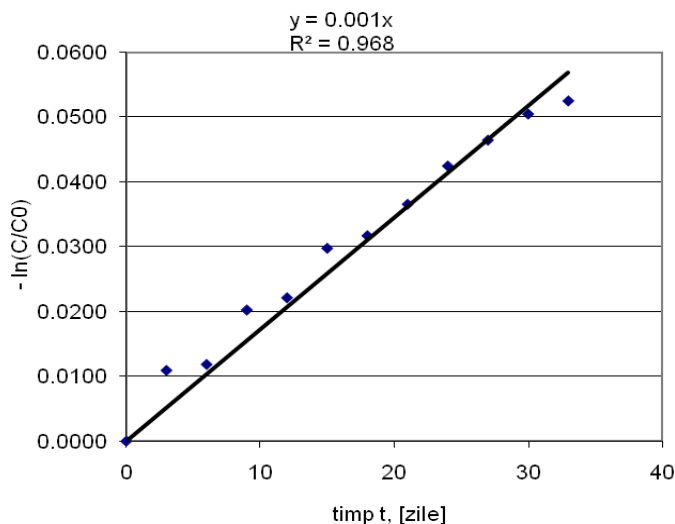


Figura 62 - Evoluția degradării streptomycinei în timp

Timpul de înjumătățire pentru procesul de degradare a streptomycinei este independent de concentrația inițială și este dat de formula:

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Valorile constantei cinetice de ordinul întâi (k) și a timpului de înjumătățire ($t_{1/2}$) a modelului sunt prezentate în tabelul 37:

Tabelul 37 - Valorile constantei k și a timpului de înjumătățire, $t_{1/2}$, valori ale degradării streptomycinei din mierea de tei păstrată la temperatura camerei, la întuneric.

Tipul de miere	Valoarea constantei k	$t_{1/2}$, [zile]	R^2
Tei	1,0	301	0,968

Valorile timpului de înjumătățire al streptomycinei arată că acest antibiotic este stabil în miere la temperatura camerei, în absența luminii.

În continuarea studiului pentru a urmări stabilitatea streptomycinei în condiții diferite de temperatură, aceeași probă de miere a fost analizată în aceeași zi, cu același chit și folosind aceeași aparatură. Proba de miere a fost fortificată la un nivel de $50\mu\text{g}/\text{kg}$. Înainte de analiza propriu-zisă realizată cu chitul Elisa R-Biopharm, această probă de miere de albine a fost păstrată în condiții diferite de temperatură, respectiv temperaturi medii: 4°C , 22°C , 28°C și temperaturi ridicate: 70°C și 100°C , timp de 30 de minute.

În urma analizării eşantioanelor de miere astfel pregătite s-au obținut următoarele rezultate experimentale redate în tabelul 38:

Tabelul 38 - Concentrația de streptomycină ($\mu\text{g}/\text{kg}$) în funcție de temperatură

Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Concentrația de streptomycină ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
4 $^{\circ}\text{C}$	48.3
22 $^{\circ}\text{C}$	48.0
28 $^{\circ}\text{C}$	47.2
70 $^{\circ}\text{C}$	0
100 $^{\circ}\text{C}$	0

Se observă că la 4 $^{\circ}$, 22 $^{\circ}$ și 28 $^{\circ}\text{C}$ apar diferențe foarte mici ale concentrației de antibiotic, cantitatea de streptomycină din mierea de albine fiind stabilă la aceste temperaturi, pe când la 70 $^{\circ}\text{C}$, respectiv 100 $^{\circ}\text{C}$, streptomycină este nedetectabilă în miere.

În figura 63 este reprezentată concentrația de streptomycină detectată în cele cinci eșantioane de miere analizate în vederea studierii stabilității tetraciclinei în funcție de diferite temperaturi:

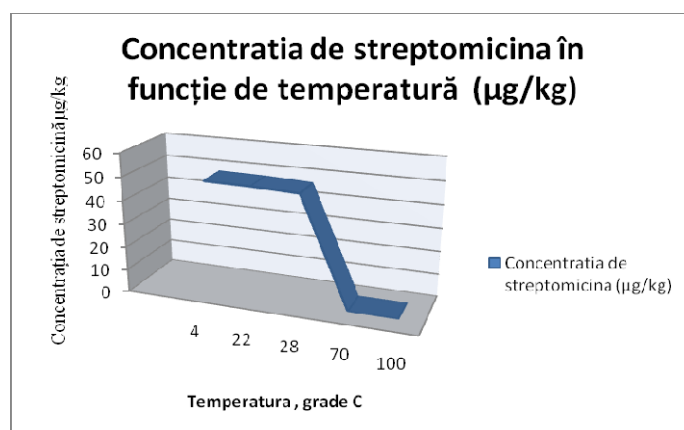


Figura 63 – Variația concentrației de streptomycină în funcție de temperatură

La 4 $^{\circ}$, 22 $^{\circ}$ și 28 $^{\circ}\text{C}$, cantitatea de streptomycină din mierea de tei luată în studiu este stabilă, pe când la 70 $^{\circ}\text{C}$, respectiv 100 $^{\circ}\text{C}$, streptomycină este nedetectabilă.

În vederea verificării exactității rezultatelor în urma determinărilor experimentale, s-a construit o diagramă de control.

Una dintre cele mai importante acțiuni care poate ajuta la menținerea calității rezultatelor chimice, este de a colecta date relevante în mod constant în timp și de a le interpreta cu grijă cu ajutorul diagramelor de control.

Proba de miere de tei luată în studiu, fortificată la un nivel de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ streptomycină, a fost analizată în vederea detectării concentrației de streptomycină. Cele 12 rezultate obținute au fost utilizate pentru a calcula valorile medii ale

concentrației de streptomycină și respectiv deviația standard (SD), în scopul obținerii limitelor de acceptabilitate în vederea construirii diagramei de control.

Din diagrama de control obținută se observă, că valorile sunt situate în limitele de acceptabilitate, demonstrându-se astfel acuratețea rezultatelor.

Pentru elaborarea diagramelor de control, pentru streptomycină, s-a calculat media concentrațiilor de streptomycină și deviația standard (SD), obținându-se următoarele valori pentru limitele de acceptabilitate:

- $M - 2 SD = 41,62$
- $M + 2 SD = 48,68$
- $M - 3 SD = 39,85$
- $M + 3 SD = 50,45$

Reprezentarea grafică a diagramei de control pentru mierea de tei este redată în figura 64:

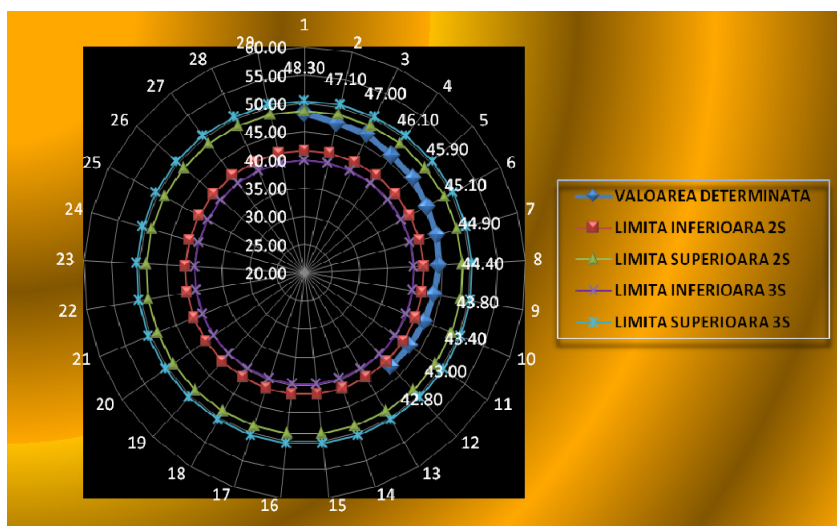


Figura 64 – Diagrama de control pentru verificarea acurateții rezultatelor în cazul detectării streptomicinei în cazul mierii de tei

Prin analiza diagramei de control prezentată în figura 64, se observă că măsurătorile experimentale s-au efectuat cu o acuratețe și o precizie ridicată. Toate valorile determinate experimental s-au încadrat în intervalul de încredere. Acest lucru demonstrează faptul că rezultatele obținute în urma analizei unor probe reale vor fi rezultate precise și valide.

Concluzii

Se poate observa o scădere continuă, dar ne semnificativă a concentrației de streptomycină, pentru proba de miere studiată. Timpul de înjumătățire pentru procesul de degradare a streptomicinei este independent de concentrația inițială.

Valorile timpului de înjumătățire al streptomicinei arată că acest antibiotic este stabil în miere la temperatura camerei în absența luminii, astfel că la 4° , 22° și

28°C apar diferențe foarte mici ale concentrației de antibiotic, cantitatea de streptomicină din mierea de albine fiind stabilă la aceste temperaturi, iar la 70 °C, respectiv 100 °C, streptomicina este nedetectabilă în miere.

Nivelul de streptomicină a scăzut cu 2,48 % după trei zile de stocare, ajungând la o scădere a nivelului de streptomicină cu 11,38 % în ultima zi de analiză.

Valoarea timpului de înjumătățire al streptomicinei în mierea de tei este egală cu 301 zile.

Se observă că, la 4 °, 22 ° și 28 ° C, cantitatea de streptomicină din mierea de tei luată în studiu este stabilă, pe când la 70°C, respectiv 100°C, streptomicina este nedetectabilă.

Analizând diagrama de control obținută prin analiza mierii de tei se observă că măsurătorile experimentale s-au efectuat cu o acuratețea și o precizie ridicată.

2.3.E Studiul comparativ al metodelor de detectare screening, respectiv de confirmare a concentrației reziduurilor de streptomicină din mierea de albine cu metoda HPLC

Mierea este un amestec unic de zaharuri, care oferă multe beneficii nutritionale și care conține multe minerale, vitamine, antioxidanți, aminoacizi și enzime [109].

Antibioticele sunt utilizate în principal în apicultură pentru tratarea bolilor bacteriene de puiet, de exemplu, Loca americană (*Paenibacillus larvae larvae subsp.*) [110].

Antibioticele sunt eficiente în apicultură, numai în infestarea stupilor cu Loca. Unii apicultori practică încă tratamente preventive cu diferite antibiotice [111].

Prezența de antibiotice în produsele alimentare este văzută de către autoritățile sanitar-veterinare foarte dăunătoare pentru consumatori. După beta-lactamice, cea mai utilizată în medicina veterinară este streptomicina (STR) [112]. În conformitate cu Regulamentul Consiliului European 2377/90 mierea ar trebui să fie lipsită de substanțe antimicrobiene [113].

În conformitate cu legislația Uniunii Europene, limitele maxime admise pentru reziduurile de antibiotice trebuie să fie stabilite cât mai jos posibil [23].

Pentru a determina conținutul de antibiotice în miere, există două abordări principale: teste screening și metode de confirmare. Testele simple permit identificarea unui singur analit obiectiv și oferă rezultatele semi - cantitative și cantitative [114].

În ultimii ani, în tot mai multe publicații este subliniată problema pe care o ridică contaminarea mierii și a celorlalte produse apicole cu reziduuri de antibiotice, substanțe cu efecte toxice acute și cronice asupra sănătății consumatorului.

Pe parcursul anilor au fost dezvoltate diferite metode de determinare a reziduurilor de streptomicină din miere [116-122].

La ora actuală testarea probelor de miere, în vederea stabilirii contaminării cu reziduuri de antibiotice se realizează cel mai adesea prin:

- Metode de screening de tipul ELISA sau Charm II, utilizate pentru indentificarea probelor de miere pozitive.
- Determinări cantitative pentru confirmarea probelor pozitive, prin tehnicile HPLC, LC-MS, LC-MS/MS și GC.

Cea mai bună tehnică cromatografică utilizată pentru analiza antibioticelor este cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC). Prin cuplarea

cromatografului de lichide cu spectrometrul de masă s-a obținut un sistem de analiză performant, capabil să separe, să identifice și să cuantifice componentii din cele mai complexe probe. Sistemele LC-MS au suferit transformări semnificative, ajungând la analize calitative și cantitative foarte exacte.

Sopul studiului îl constituie determinarea conținutului de reziduuri de antibiotice din mierea de albine folosind comparativ teste screening și metode de confirmare.

În figura 65 este prezentată schema metodelor de identificare a substanțelor antimicrobiene din mierea de albine:

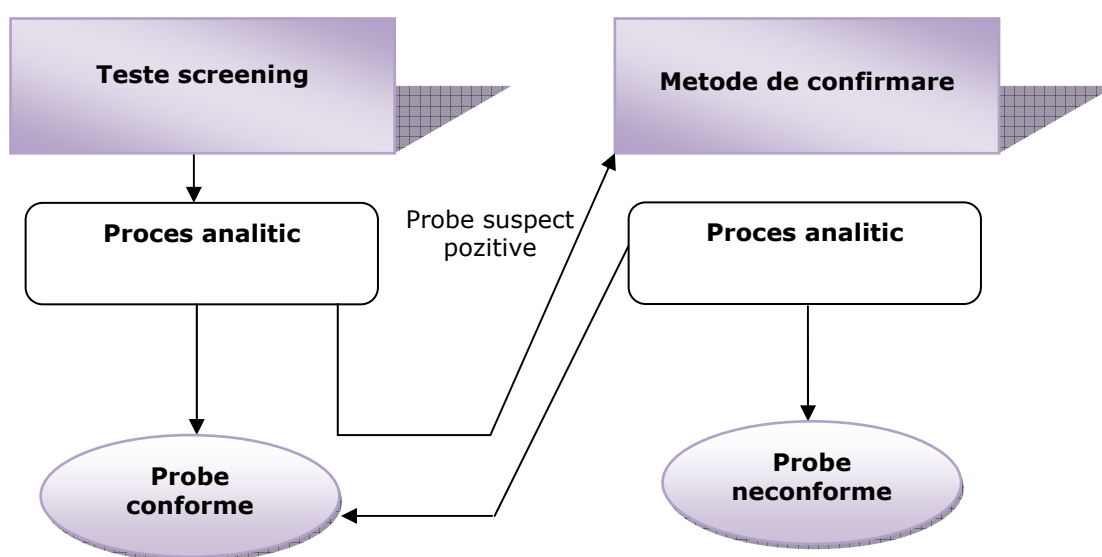


Figura 65 – Schema metodelor de determinare a antibioticelor din miere [115]

Testele simple permit determinarea unui singur analit țintă, furnizând atât rezultate semi-cantitative sau cantitative cât și calitative [115]. Testele de screening oferă o rată scăzută de probe false conforme, ușurință de utilizare, timp scurt de analiză, selectivitate bună, și preț scăzut [115].

La ora actuală cele mai utilizate metode de confirmare sunt cele bazate pe tehnici spectrofotometrice. LC-MS/MS cuplat cu ESI (Electrospray Ionization) sau în combinație cu APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization), a devenit din ce în ce mai utilizat pentru determinările cantitative de reziduuri de medicamente care pot fi prezente în alimente.

Există 6 tipuri de sisteme LC/MS: LC/MS, LC/MS/MS, LC/MS cu trapă ionică, LC/MS/MS cu trapă ionică, LC/MS TOF și LC/MS QTOF.

Gaz cromatografia este puțin utilizată la determinarea reziduurilor de antibiotice în miere, datorită volatilității scăzute și a instabilității termice a acestor medicamente.

H.P.L.C. (High Performance Liquid Chromatography) este utilizat pe scară largă pentru analizele de rutină, la identificarea antibioticelor din miere. În figura 66 este redată schema bloc pentru H.P.L.C.:

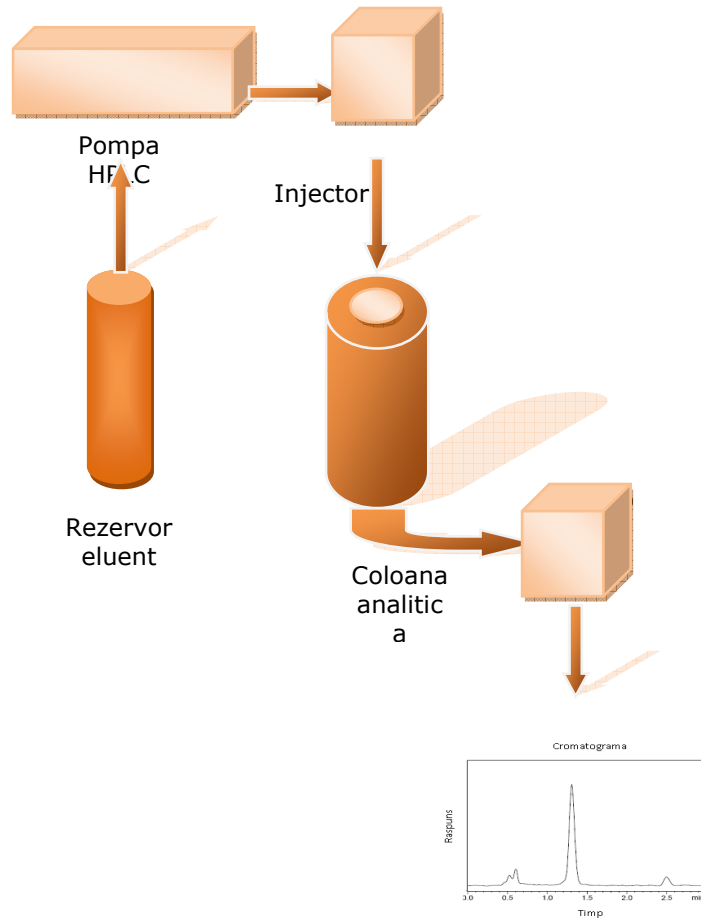


Figura 66 – Shema bloc a HPLC

În figura 67 sunt prezentate etapele de lucru ale analizei H.P.L.C.:

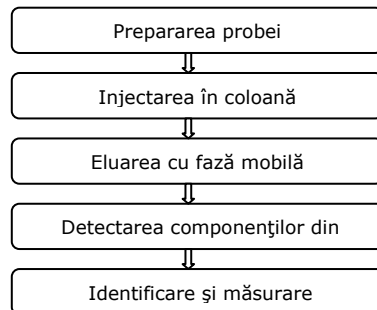


Figura 67 – Etapele de lucru ale analizei H.P.L.C.

Pentru determinarea reziduurilor de streptomycină, s-au folosit comparativ doua metode: I - una de screening (Elisa) și II - metoda de confirmare H.P.L.C. (High Performances Liquid Chromatography).

Pentru efectuarea investigațiilor s-a luat în studiu o probă de miere de albine prelevată în cantitate de 400 de grame. Aceasta s-a împărțit în 16 replicare, ce au fost apoi fortificate cu streptomycină la nivelul de 20 μg/kg. Proba globală din care s-au recoltat eșantioanele a fost analizată în prealabil și este lipsită de substanțe antimicrobiene.

Proba de miere de albine a fost prelevată în condiții standard adecvate, atât din punct de vedere fizico-chimic cât și microbiologic [123]. Condițiile de prelevare a eșantioanelor au fost următoarele:

- masa probei 400 g
- temperatura $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- umiditate $40 \pm 2\%$
- presiunea atmosferică 1001 hPa

I. La determinarea conținutului de antibiotic prin teste screening s-a utilizat chitul Elisa MaxSignal produs de firma Bioo Scientific, chit cu limită de detecție 10 μg/kg[124].

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este un test imunoenzimatic folosit la determinarea cantitativă a antibioticelor, metodă folosită în prezent doar în analizele cantitative preliminare. Acest test are la bază reacția dintre antigen și anticorp. Godeurile plăcuței existente în chit sunt căptușite cu proteină conjugat de streptomycină. După adăugarea anticorpului anti-streptomycină, streptomicina liberă și cea legată competiționează cu streptomicina anticorp (reacție competitivă imunoenzimatică). Anticorpii nelegați sunt eliminați în faza de spălare.

Pregătirea și testarea probelor cu testul imunoenzimatic Elisa s-a făcut conform protocolului de lucru prezent în chit [124].

II. Ca și metoda de confirmare s-a folosit metoda H.P.L.C. (High Performances Liquid Chromatography) - „Determinarea reziduurilor de streptomycină din miere prin HPLC cu derivatizare post-coloană - DIN 0010761/1999, DE (1999)”. Sistemul include lichid cromatografic de înaltă performanță GBC serie 8000 cu sistem de derivatizare post coloană model 655A-13 (Merck/Hitachi Atr. 18030), ansamblu reacție post coloană (Merck Atr. 18032) utilizat pentru separarea, identificarea și cuantificarea reziduurilor de streptomycină prezente în probe, coloană Hypersil BDS C-18: 100x4.6mm/3μm și precoloană ODS 20x2,1mm/10μm.

De asemenea, metoda funcționează după următorii parametri: temperatura de lucru 55 °C, volumul injectat 100 μl, gradient izocratic, reactiv soluție de NaOH 0,2 M, coloana de reacție: 10 M (volum - 0,86 ML; ID - 0,33 MM), lungimea de undă de excitație: 263 NM, lungimea de undă de emisie: 435 NM.

Prepararea probei cuprinde trei faze: extracția, purificarea și eluarea probelor.

Pentru extracția probelor s-au cântărit $10 \pm 0,02$ grame miere într-un pahar Berzelius de 100ml și s-au adăugat 25 ml soluție de acid percloric pH 2, agitându-se bine până la dizolvarea mierii. Proba s-a filtrat printr-o pânză cu vată de sticlă. Pânza de filtrare s-a spălat cu 5 ml soluție acid percloric care se trece prin cartuș.

După extracția probelor are loc purificarea pe cartușe de purificare în fază solidă SO_3H și apoi purificarea pe cartușe de purificare în fază solidă C-18.

Eluarea se face sub vid slab (cu picătura) cu 6 ml (3x2 ml) metanol într-o eprubetă conică. Eluatul este evaporat la evaporatorul rotativ și adus la sec la o temperatura de 40 °C în curent de azot. Dacă rămân urme de apă se reia cu etanol și se evaporă la sec. Reziduul se reia cu 1 ml soluție HPLC într-un eprubetă cu

capac. Înainte de măsurare eprubeta se centrifughează 10 minute la 4000 rot/minut.

Din integrarea picurilor obținute în urma injectării, prin soft-ul aparatului EZCHROM s-a detectat concentrația probelor luate în studiu. Pe baza ecuației drepte realizată pe baza curbei întocmite pentru matrice ($Y = a + bX$) se determină concentrația reală a probelor analizate.

Rezultate și discuții, metoda I

Pentru efectuarea investigațiilor s-a luat în studiu o probă de miere de albine lipsită de substanțe antimicrobiene care s-a împărțit în 16 replicare. Aceste eșantioane au fost fortificate cu streptomycină la nivelul de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Probele au fost analizate în aceleași condiții de mediu, de către același analist și folosind aceeași aparatură.

În urma testelor efectuate pentru eșantioanele de miere analizate prin metoda imunoenzimatică Elisa s-au obținut următoarele rezultate experimentale redade în tabelul 39:

Tabelul 39 - Concentrația de streptomycină detectată în $\mu\text{g}/\text{kg}$ prin testul imunoenzimatic Elisa

Numarul probei	Concentrația de streptomycină detectată ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	14.408
2	14.120
3	13.861
4	14.096
5	14.215
6	14.120
7	16.708
8	15.966
9	16.877
10	16.291
11	16.512
12	16.821
13	16.708
14	17.485
15	19.148
16	17.514

În figura 68, sunt reprezentate grafic cantitățile de streptomycină detectate în cele 16 replicare, prin metoda Elisa.

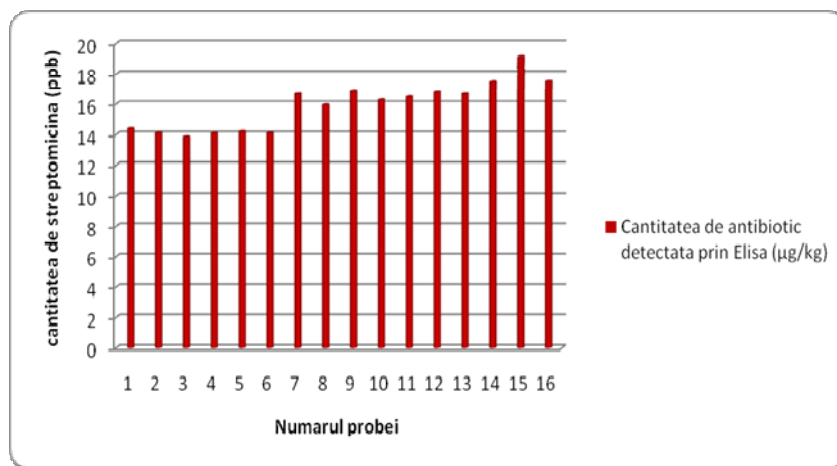


Figura 67 – Concentrația de streptomycină detectată prin metoda Elisa

Din reprezentarea grafică a concentrației de streptomycină detectată prin metoda Elisa se observă o evoluție similară a celor 16 eşantioane de miere de albine luate în analiză.

Rezultate și discuții, metoda II

În urma injectării probelor în H.P.L.C, pentru cele 16 eşantioane de miere de albine s-au obținut picuri care prin integrare cu ajutorul softului au condus la obținerea concentrațiilor probelor analizate.

Pentru efectuarea investigațiilor s-a luat în studiu o probă de miere de albine lipsită de substanțe antimicrobiene care s-a împărțit în 16 replicare. Aceste eşantioane au fost fortificate cu streptomycină la nivelul de 20 µg/kg.

Probele au fost analizate în aceleași condiții de mediu, de către același analist și folosind aceeași aparatură.

Cromatogramele obținute în urma analizei H.P.L.C. sunt redată în figurile 68-83:

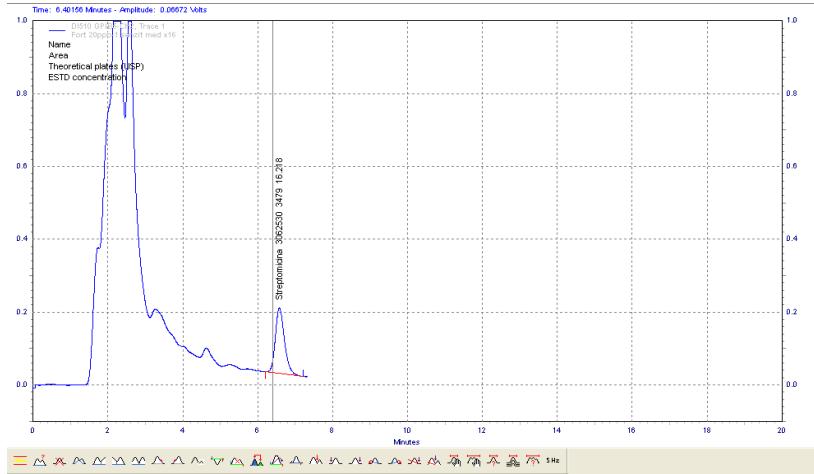


Figura 68 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 1 de miere de albine fortificată

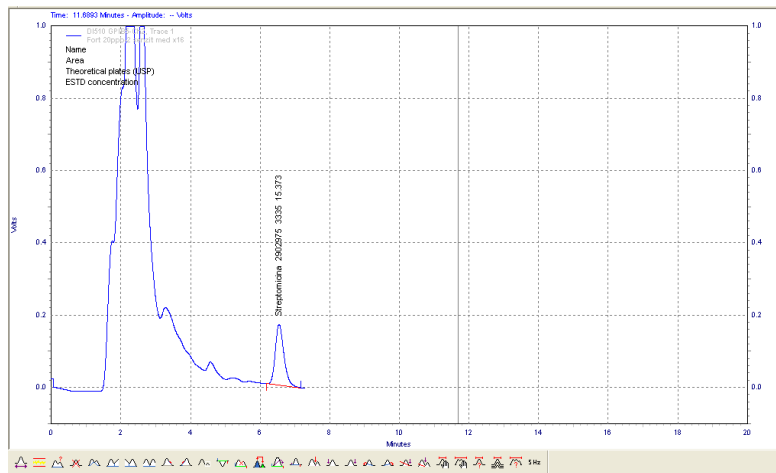


Figura 69 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 2 de miere de albine fortificată

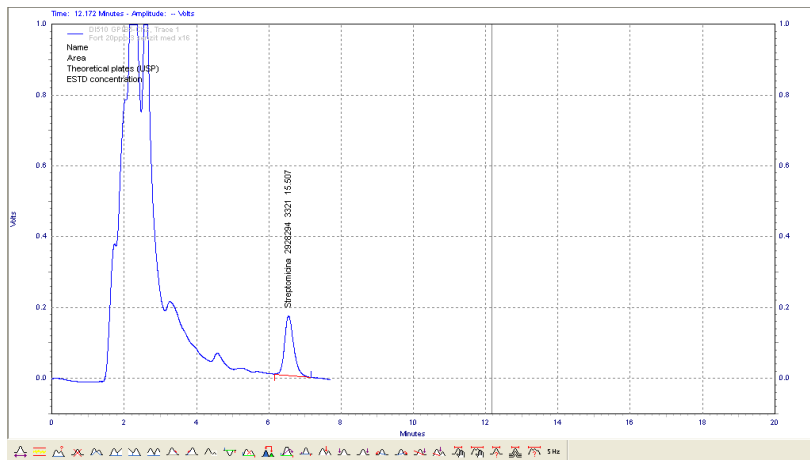


Figura 70 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 3 de miere de albine fortificată

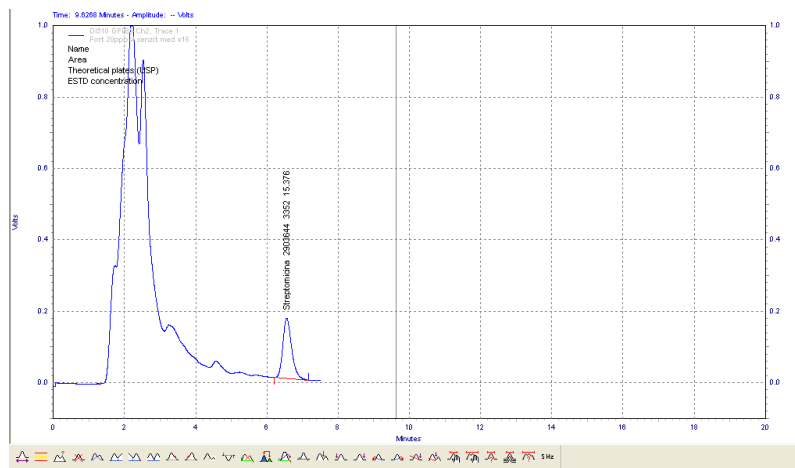


Figura 71 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 4 de miere de albine fortificată

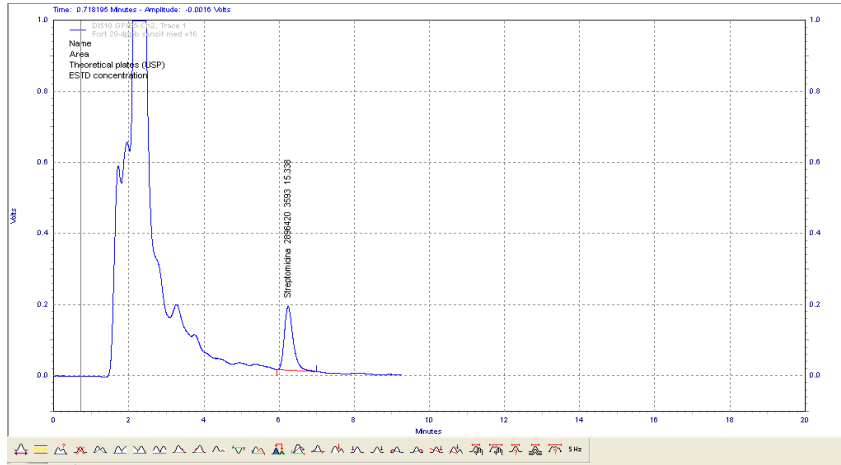


Figura 72 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 5 de miere de albine fortificată

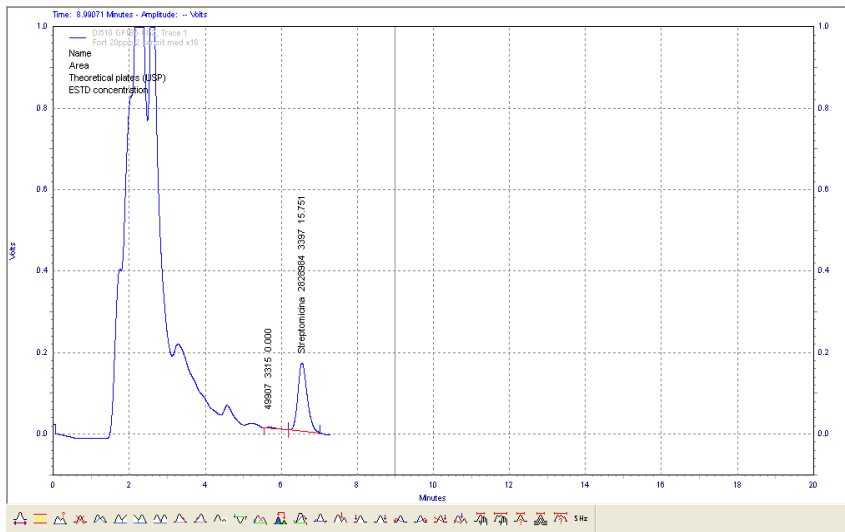


Figura 73 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 6 de miere de albine fortificată

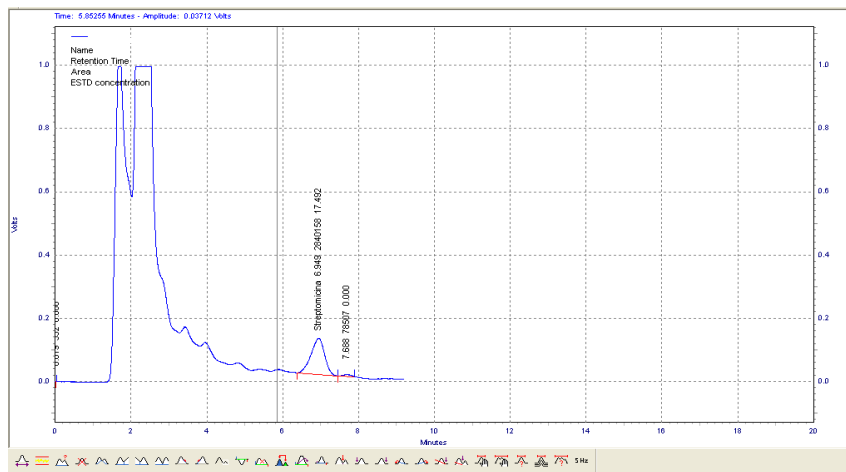


Figura 74 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 7 de miere de albine fortificată

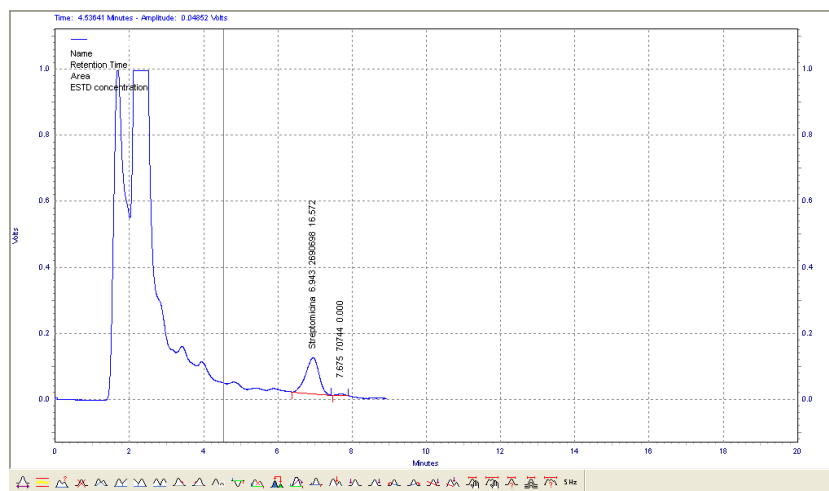


Figura 75 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 8 de miere de albine fortificată

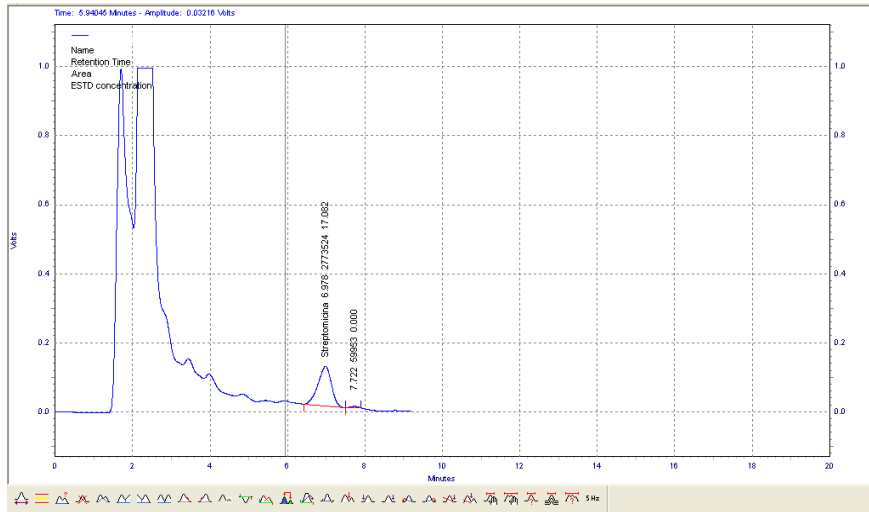


Figura 76 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 9 de miere de albine fortificată

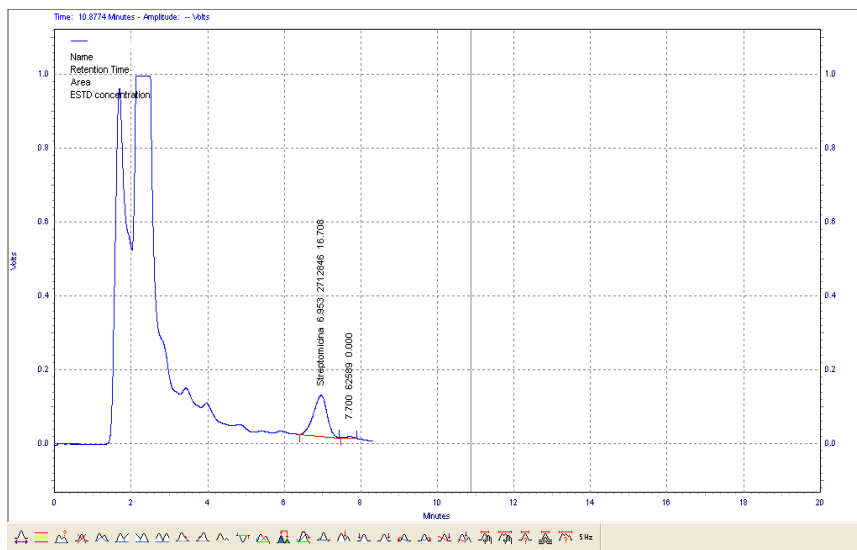


Figura 77 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 10 de miere de albine fortificată

148 Studii experimentale - 2

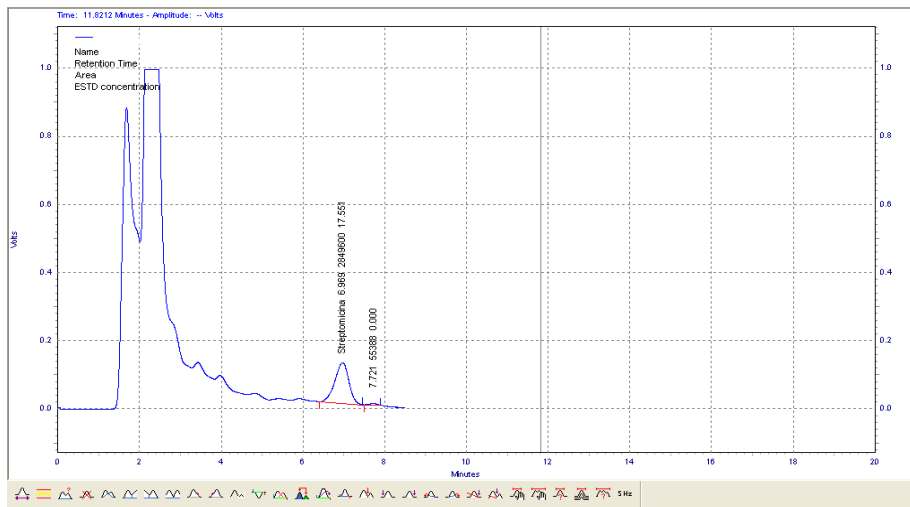


Figura 78 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 11 de miere de albine fortificată

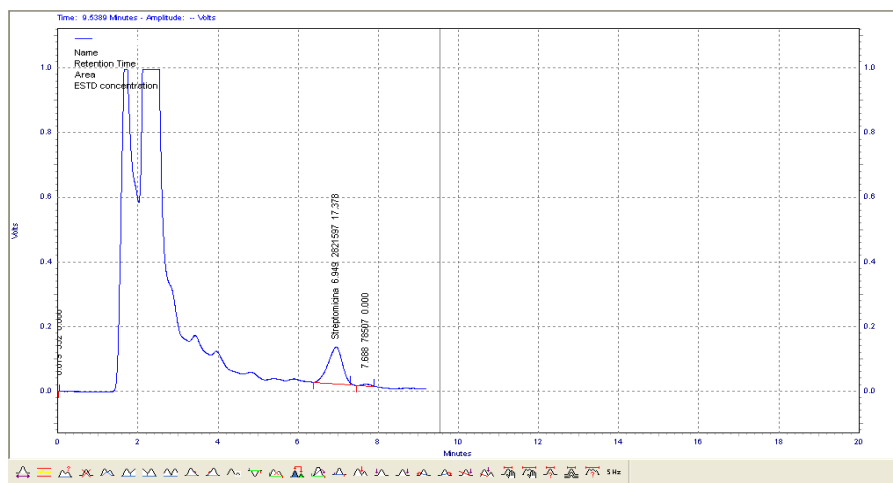


Figura 79 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 12 de miere de albine fortificată

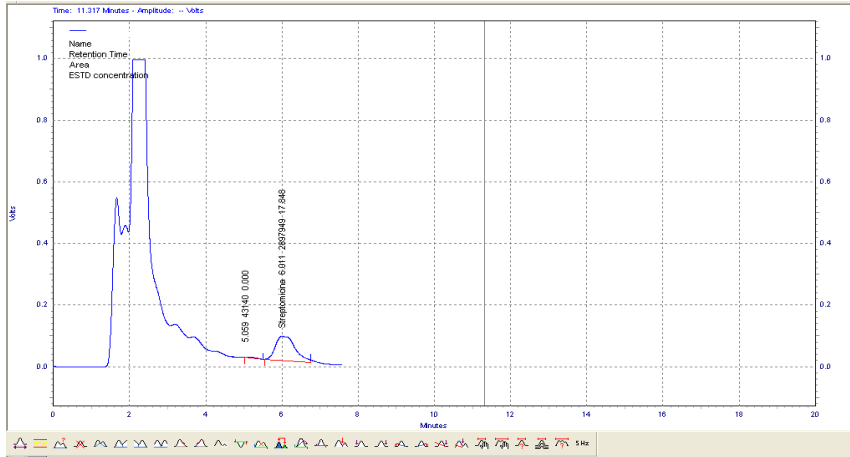


Figura 80 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 13 de miere de albine fortificată

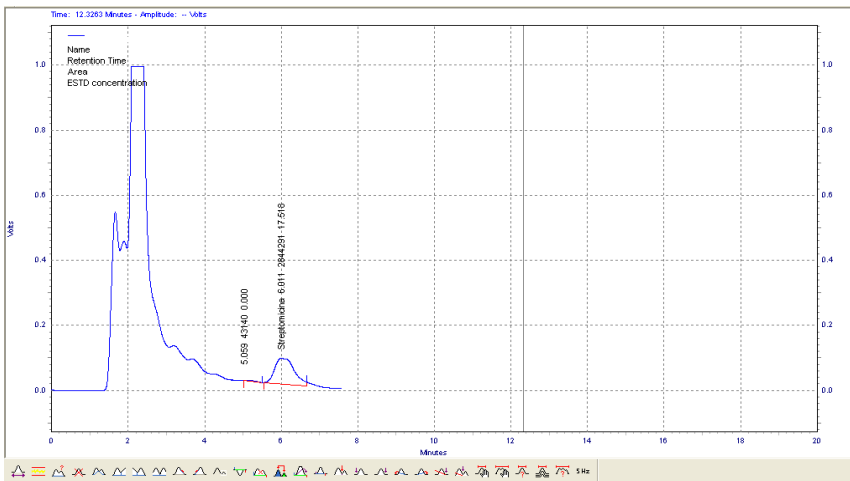


Figura 81 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 14 de miere de albine fortificată

150 Studii experimentale - 2

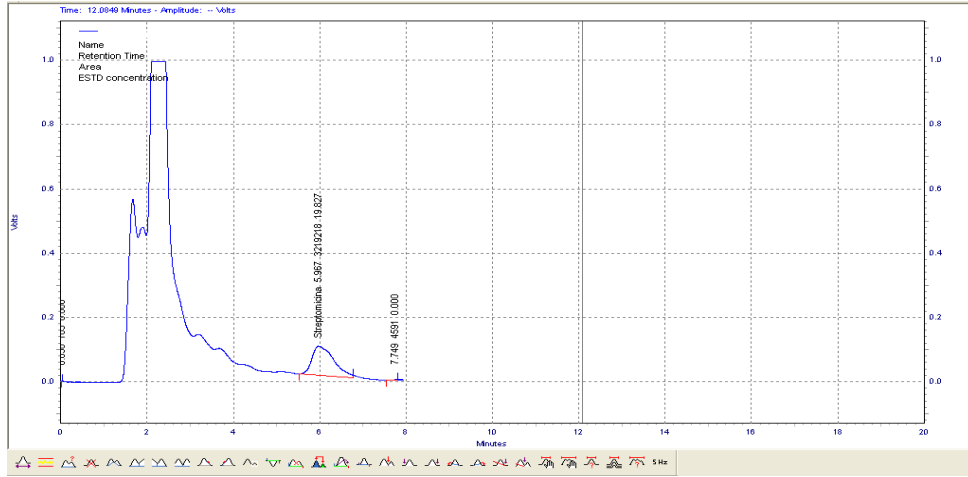


Figura 82 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 15 de miere de albine fortificată

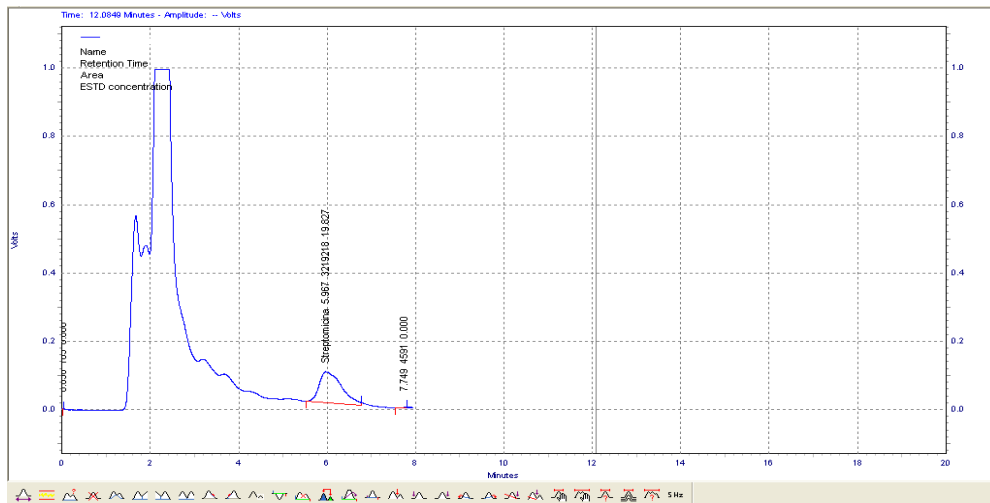


Figura 83 - Cromatograma pentru eșantionul numărul 16 de miere de albine fortificată

În tabelul 40 sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizelor de confirmare a probei de miere prelevată în condiții standard adecvate.

Tabelul 40 – Concentrația de streptomicină detectată în $\mu\text{g}/\text{kg}$ prin metoda H.P.L.C.

Numarul probei	Concentrația de streptomicină detectată	Unitate de măsură
1	16.218	$\mu\text{g}/\text{kg}$
2	15.373	$\mu\text{g}/\text{kg}$
3	15.507	$\mu\text{g}/\text{kg}$
4	15.376	$\mu\text{g}/\text{kg}$
5	15.338	$\mu\text{g}/\text{kg}$
6	15.751	$\mu\text{g}/\text{kg}$
7	17.492	$\mu\text{g}/\text{kg}$
8	16.572	$\mu\text{g}/\text{kg}$
9	17.082	$\mu\text{g}/\text{kg}$
10	16.708	$\mu\text{g}/\text{kg}$
11	17.551	$\mu\text{g}/\text{kg}$
12	17.378	$\mu\text{g}/\text{kg}$
13	17.848	$\mu\text{g}/\text{kg}$
14	17.518	$\mu\text{g}/\text{kg}$
15	19.827	$\mu\text{g}/\text{kg}$
16	19.827	$\mu\text{g}/\text{kg}$

Figura următoare (figura 84) redă grafic concentrațiile de streptomicină obținute în eșantioanele de miere analizate prin metoda de înaltă precizie, H.P.L.C.:

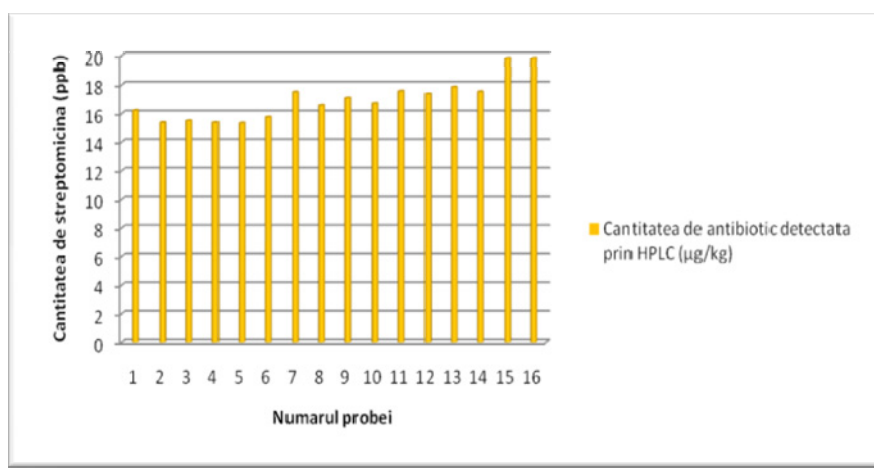


Figura 84 – Cantitatea de antibiotic detectată prin metoda H.P.L.C.

Se observă o evoluție similară pentru toate cele 16 replicare analizate prin metoda H.P.L.C.

În figura 85 sunt prezentate rezultatele obținute la măsurarea concentrației de streptomicină în aceleași probe de miere prin cele două metode descrise anterior.

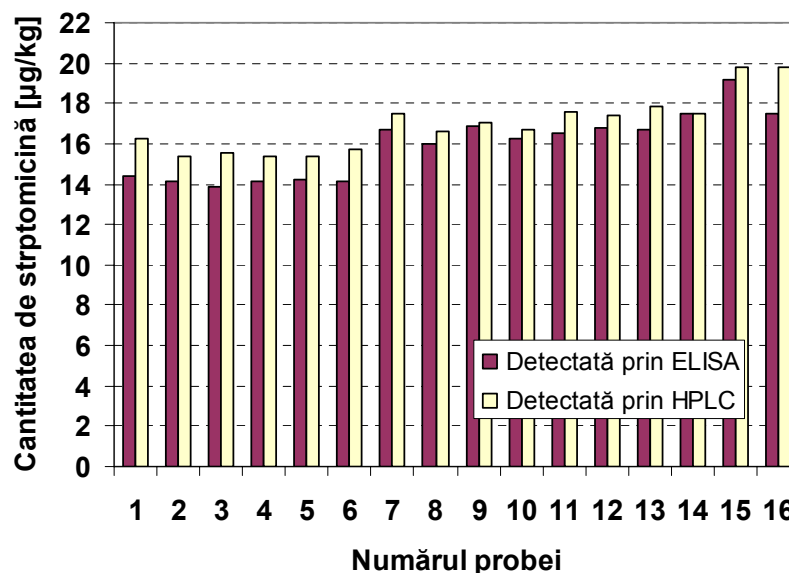


Figura 85 – Reprezentarea grafică comparativă a concentrației de streptomycină din miere detectată prin cele două metode

Din reprezentarea grafică se observă că, apar diferențe nesemnificative la detectarea antibioticului prin cele două metode de analiză, de minimum 0,030 ppb și maximum 2,313 ppb.

Toate probele analizate cu testul imunoenzimatic ELISA, au fost confirmate prin metoda cromatografică de înaltă performanță (H.P.L.C.).

Pentru a compara performanțele, precizia celor două metode, implicit influența factorilor subiectivi asupra rezultatelor obținute în laborator s-a utilizat statistica matematică. Prin testul F al lui Fischer-Snedecor [125] s-au comparat dispersiile aferente celor două serii de experiențe. Pentru metoda screening ELISA se găsește $s_1^2 = 2,3818$, iar pentru metoda HPLC $s_2^2 = 1,8973$. Am ales pragul de semnificație 0,1 și deci $\alpha/2=0,05$, cu gradele de libertate $v_1=v_2=15$.

Deoarece $2,3818 > 1,8973$, din calcul rezultă:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{2,3818}{1,8973} = 1,25536 \quad (28)$$

Pentru condițiile impuse se află $F_{0,05} (15,15) = 2,4034$ [125]. Deoarece această cifră este mai mare decât $F = 1,25536$, găsită experimental, vom admite că ambele serii de analize sunt la fel de reproductibile, indiferent de metoda de analiză, neexistând diferențe semnificative între rezultatele obținute.

Concluzii

Analizând rezultatele obținute se observă că există diferențe mici în ceea ce privește detectarea reziduurilor de streptomycină în mierea de albine prin cele două metode (ELISA versus HPLC). Astfel, în fazele preliminare de identificare a streptomicinei pot fi utilizate metodele screening, acestea fiind mai rapide, mai

ieftine și suficient de precise. Probele neconforme analizate prin testele screening implică confirmare prin HPLC.

Prin compararea dispersiilor celor două serii de analize (obținute prin ELISA, respectiv HPLC), testul F al lui Fischer-Snedecor, admite că ambele sunt la fel de reproductibile, indiferent de metoda de analiză.

Este necesar a se urmări prezența reziduurilor de antibiotice în miere, acestea având efecte nocive asupra sănătății. Astfel, se impune dezvoltarea și îmbunătățirea metodelor analitice pentru monitorizarea nivelurilor antibioticilor în miere, urmărindu-se atingerea unor limite de detecție și cuantificare cât mai scăzute.

Evoluția noilor metode de analiză și a echipamentelor de laborator de înaltă performanță, a determinat Uniunea Europeană și comisiile internaționale de specialitate ale F.A.O., O.M.S., Codex Alimentarius și Comisia pentru Alimentație, să impună noi condiții de garanție a produselor alimentare, ceea ce presupune respectarea unor cerințe foarte stricte de calitate.

Având în vedere diferențele relativ mici privind procentul de recuperare și nivelurile detectate dintre ele două metode, HPLC optimizată și ELISA, s-au comparat avantajele și dezavantajele acestora.

Avantajele metodei ELISA sunt:

- nu necesită aparatură scumpă;
- utilizarea ușoară a cititoarelor;
- probele sunt relativ ușor de prelucrat;
- rezultatele obținute sunt reproductibile;

Dintre dezavantajele metodei ELISA amintim următoarele:

- necesitatea achiziționării de kituri pentru fiecare compus în parte;
- necesită confirmarea rezultatelor probelor neconforme (ELISA fiind o metodă de analiză preliminară).

Metoda HPLC prezintă următoarele avantaje:

- probele sunt ușor de prelucrat;
- consumul redus de reactivi;
- posibilitatea determinării mai multor compuși printr-o singură analiză
- metoda poate fi utilizată atât pentru faza preliminară cât și pentru confirmarea probelor pozitive.

Principalul dezavantaj al metodei HPLC este costul ridicat al aparaturii.

Rezultatele demonstrează că metoda ELISA este comparabilă cu metoda HPLC, iar testul F al lui Fischer-Snedecor admite că ambele sunt la fel de reproductibile.

2.3. F Stabilitatea concentrației reziduurilor de tetraciclină și streptomycină în trei sorturi de miere în condiții diferite de temperatură

Variația concentrației de antibiotic în funcție de timp are o evoluție similară pentru cele trei tipuri de miere. În cazul tetraciclinei timpul de înjumătățire crește cu creșterea pH-ului. Comparând vitezele de degradare în mierea monofloră și în cea polifloră, se poate observa că, degradarea antibioticului în eșantionul de miere polifloră este mai rapidă decât în cea monofloră. Aceasta se poate datora diferențelor cantitative și calitative a compoziției mierii monoflore și poliflore, precum și datorită pH-ului. Degradarea tetraciclinei în mierea polifloră se mai poate datora și prezenței enzimelor.

Activitatea enzimelor poate fi influențată de numeroși factori, cum ar fi, temperatura optimă de activitate, influența razelor ultraviolete și prezența electroliților care pot stimula sau inhiba activitatea enzimelor. La 80 °C enzimele sunt total distruse, iar la temperatură scăzută se conservă.

Determinarea reziduurilor de antibiotice din miere a constituit în ultimii ani o preocupare generală, deoarece acești compuși pot reduce eficacitatea proprietăților benefice ale mierii, iar dacă se găsesc în cantități semnificative, pot reprezenta o amenințare gravă pentru sănătatea umană [126].

Prezența reziduurilor de tetraciclină și a produselor sale de degradare în miere pot provoca efecte nocive asupra consumatorilor, cum ar fi posibile reacții alergice, leziuni hepatice, îngălbenirea dinților și tulburări gastro-intestinale ca urmare a acțiunii selective a antibioticelor asupra florei intestinale umane [127].

În conformitate cu Regulamentul Consiliului European 470/2009 mierea ar trebui să fie lipsită de antibiotice [128]. În România pentru determinarea reziduurilor de antibiotice din miere, se utilizează, de asemenea Ghidul "CRL Guidance Paper", din decembrie 2007, recomandat de Laboratorul Comunitar de Referință pentru reziduurile de substanțe antimicrobiene din alimente, cu sediul în Franța. Conform acestui ghid, concentrația recomandată pentru streptomicină este de 40 ppb, iar pentru tetraciclină este 20 ppb.

Pentru a determina conținutul de antibiotice din miere, există două abordări principale: teste de screening și metode de confirmare. Teste simple (Biosenzor, Elisa, Charm II, etc), asigură rezultate calitative, semi-cantitative și cantitative [129]. Teste de screening oferă o rată scăzută (<5%) [130] de probe fals negative, ușurință de utilizare, timp scurt de analiză, selectivitate bună și un preț scăzut.

De-a lungul anilor au fost dezvoltate diferite metode de determinare a streptomicinei din miere [131-137].

În cadrul cercetărilor efectuate pe această direcție, pe o perioadă de 5 luni au fost analizate un număr de 3 probe de miere lipsită de substanțe antimicrobiene (polifloră, tei și salcâm) fortificate la nivelul de 200 μg/kg tetraciclină (TC), și respectiv 3 de probe de miere (polifloră, tei și salcâm) la 200 μg/kg streptomicină (STR).

Probele de miere au fost prelevate în următoarele condiții:

- masa probei 400 g
- temperatura $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- umiditate $40 \pm 2\%$
- presiunea atmosferică 998 hPa

Fiecare probă de miere testată pentru studiul stabilității tetraciclinei în funcție de timp și în funcție de tipul de miere a fost împărțită în câte 4 eșantioane, care înainte de a fi analizate au fost supuse unor condiții diferite de temperatură, respectiv 4, 22, 30 și 70 °C. Pentru studiul stabilității streptomicinei în funcție de timp și în funcție de tipul de miere, înainte de a fi analizate, eșantioanele au fost supuse unor condiții diferite de temperatură, respectiv 4, 22, 30, 40 și 70 °C.

Depozitarea probelor de miere de albine s-a făcut în condiții de temperatură normale, în flacon de sticlă, la temperatura camerei (21°C-22°C), în spațiu aerisit și în absența luminii.

Fiecare dintre aceste probe a fost analizată prin metoda Elisa, la interval de o săptămână, timp de 20 săptămâni, urmărindu-se evoluția conținutului de antibiotic.

Rezultate și discuții

În tabelul 41 sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizării probelor de miere în vederea determinării tetraciclinei. Aceste probe de miere au fost analizate săptămânal.

Tabelul 41 – Concentrația de tetraciclină în funcție de temperatură și în funcție de cele trei sorturi de miere

Timp (săpt.)	Polifloră				Tei				Salcâm			
	Concentrația de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentrația de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$				Concentrația de tetraciclină, $\mu\text{g}/\text{kg}$			
	4 ⁰ C	22 ⁰ C	30 ⁰ C	70 ⁰ C	4 ⁰ C	22 ⁰ C	30 ⁰ C	70 ⁰ C	4 ⁰ C	22 ⁰ C	30 ⁰ C	70 ⁰ C
1	198.52	195.36	195.36	185.94	198.52	195.36	192.21	182.82	195.36	192.21	179.73	176.65
2	195.01	192.74	190.48	183.80	195.01	192.74	190.48	181.61	195.01	190.48	177.28	175.14
3	191.57	189.52	185.48	181.50	193.62	191.57	189.52	179.54	189.52	187.50	175.65	171.84
4	187.69	184.93	179.45	168.80	190.48	187.69	184.93	166.20	184.93	184.93	174.07	168.80
5	184.86	180.66	166.40	162.46	189.11	184.86	170.40	156.68	182.75	180.66	168.39	142.03
6	180.84	174.06	161.03	146.84	185.44	180.84	167.46	146.84	180.82	178.56	163.15	139.29
7	175.79	169.15	156.59	131.60	182.64	178.05	164.85	136.42	178.05	175.79	160.66	127.06
8	171.19	162.42	151.21	124.25	180.19	174.17	159.56	122.12	174.17	171.19	156.73	112.29
9	168.43	160.12	146.41	118.00	174.86	170.55	152.15	115.13	170.55	168.43	150.21	109.67
10	159.02	154.19	142.78	107.84	171.71	166.54	149.50	113.53	169.11	166.54	147.22	105.20
11	152.77	150.66	138.85	103.90	168.57	161.59	144.57	108.20	168.57	163.88	144.57	103.90
12	147.10	145.44	131.71	97.95	165.27	157.67	140.62	98.73	163.33	159.53	136.04	100.34
13	140.52	138.68	128.45	90.75	161.19	152.43	135.11	91.51	161.19	154.56	131.70	92.29
14	135.48	132.08	122.68	78.14	154.53	146.50	130.44	81.23	156.63	150.45	125.68	87.50
15	129.96	127.86	116.90	70.41	149.26	142.15	124.77	71.49	151.70	144.48	120.77	81.53
16	125.21	121.12	109.17	62.94	145.41	135.77	119.54	65.81	149.49	141.46	114.94	71.43
17	120.13	116.51	100.41	52.28	142.35	130.25	111.00	54.52	145.11	139.64	107.74	56.68
18	114.39	100.55	92.92	41.41	136.71	125.89	95.59	43.01	141.36	135.57	104.34	46.01
19	110.56	99.22	86.81	36.63	131.60	120.43	91.90	37.75	138.40	129.00	102.79	39.96
20	104.09	97.06	81.11	30.45	123.68	115.37	84.13	32.98	131.58	125.23	98.73	37.69

În multe cazuri practice legătura dintre doi sau mai mulți parametri care descriu un anumit proces este suficient de strânsă astfel încât variația unui parametru poate fi controlată și exprimată pe baza variației celorlalți parametri [43]. Legăturile funcționale de acest fel se numesc legături stohastice sau probabilistice. Studiul legăturilor de acest fel a condus la dezvoltarea teoriei corelației multiple [43].

În vederea elaborării modelelor matematice statistice de predicție s-a realizat evaluarea efectului influenței a doi parametri prin realizarea unei analize de corelație multiplă între poluarea cu antibiotic (concentrația de tetraciclină) ca variabilă dependentă, respectiv temperatura și timpul, ultimele două fiind variabile independente. Rezultatele experimentale pentru cele trei tipuri de miere, păstrate la patru temperaturi diferite în timp, indică per ansamblu o scădere a conținutului de tetraciclină. Determinările experimentale pot fi folosite la evaluarea efectului comparativ al parametrilor măsoarați prin realizarea unei analize de corelare multiplă dintre conținutul de tetraciclină, ca variabilă dependentă, funcție de ceilalți parametri: temperatură, respectiv timpul de păstrare, ca variabile independente.

Pentru descrierea cât mai exactă a dependenței concentrației de tetraciclină, de temperatură și timp, s-a propus o relație polinomială. Ecuația corelației multiple liniară de ordinul unu are expresia:

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 \quad (29)$$

Coeficienții a_0 , a_1 , a_2 sunt coeficienții funcției de regresie. Aceștia s-au determinat cu ajutorul programului limbajului de programare Matlab.

În ecuația (29), a_i reprezintă coeficienții ecuației, iar variabilelor x_1 , x_2 și y le corespund următorii parametri:

y – concentrația de tetraciclină [$\mu\text{g}/\text{kg}$];
 x_1 – temperatura [$^{\circ}\text{C}$];
 x_2 – timp, [săptămâni].

Cu ajutorul limbajului de programare MATLAB s-au prelucrat și analizat datele experimentale, obținându-se o serie de modele statistice care redau concentrația de tetraciclină în funcție de timp și de temperatură.

Datele experimentale împreună cu suprafețele generate de modelele matematice statistice sunt prezentate în figurile 86, 87 și 88 :

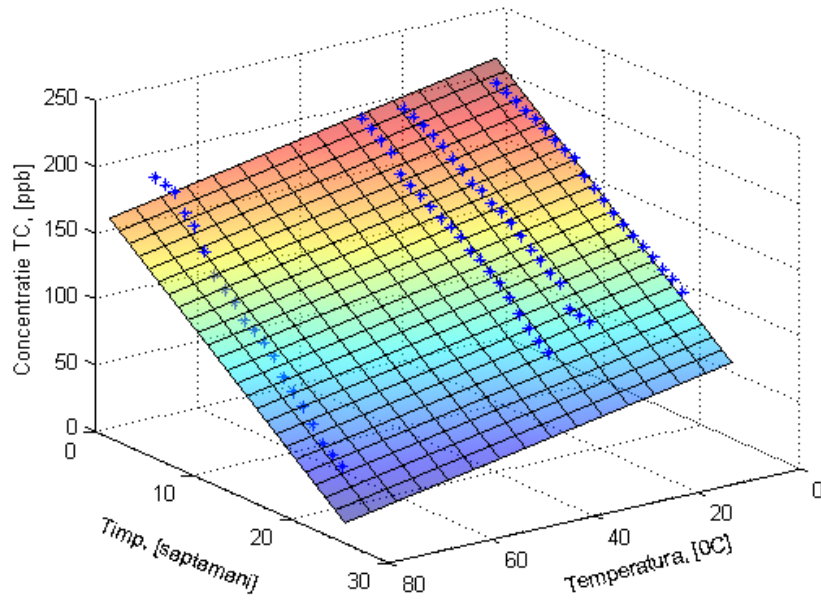


Figura 86 - Variația concentrației de tetraciclină în cazul mierii poliflore în funcție de temperatură și timp

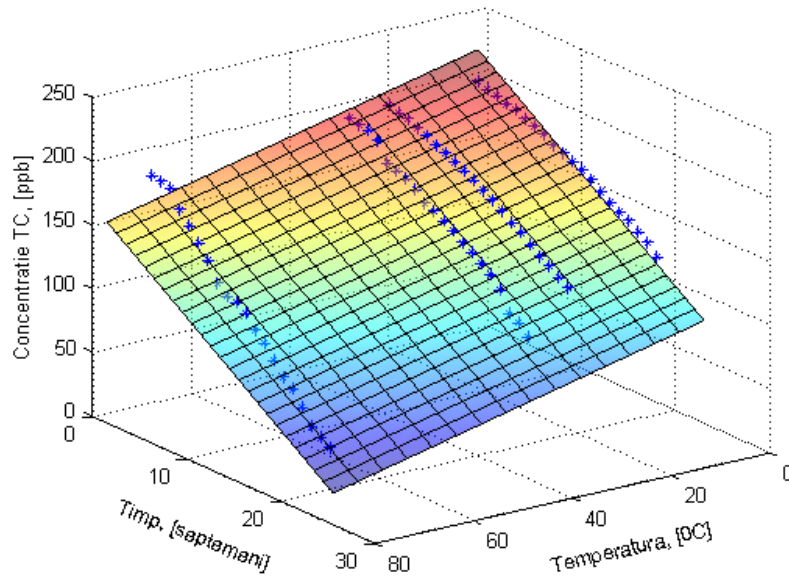


Figura 87 - Variația concentrației de tetraciclină în cazul mierii de tei în funcție de temperatură și timp

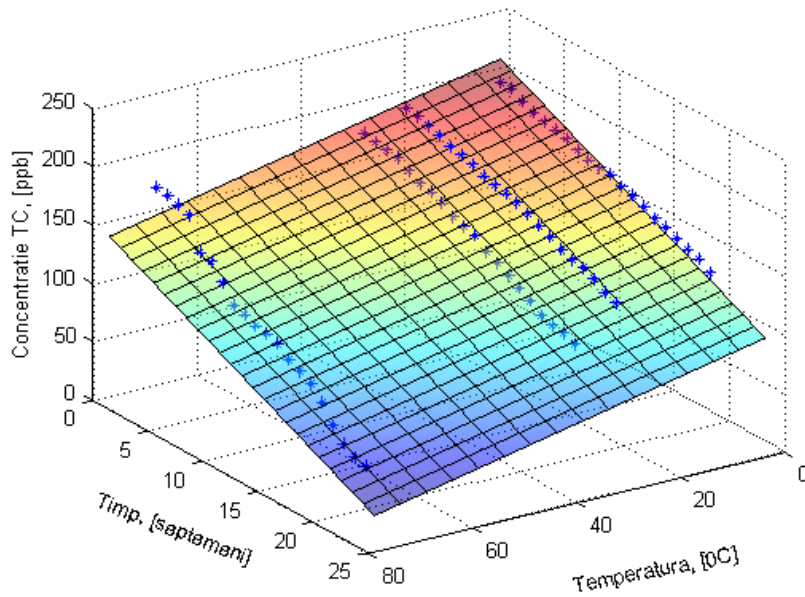


Figura 88 - Variația concentrației de tetraciclină în cazul mierii de salcâm în funcție de temperatură și timp

Ecuțiile modelelor matematice statistice obținute cu metoda regresiei multiple liniare sunt prezentate în tabelul 42. Ele sunt valabile pe domeniul de valori studiat.

Tabelul 42 - Ecuțiile modelelor statistice obținute în cazul probelor analizate

Tip de miere	Ecuțiile modelelor matematice statistice
Polifloră	$y=226,6923-0,7270*x_1-6,2593*x_2$
Tei	$y=232,1330-0,9124*x_1 - 5,5190*x_2$
Salcâm	$y=223,6585-0,9429*x_1 - 4,7181*x_2$

După calculul coeficienților modelului, este necesar să se efectueze o comparație între prezicerile modelului și datele furnizate de procesul real. Deviația standard, coeficientul de corelație R, coeficientul de precizie R^2 sunt folosiți ca și indicatori ai adecvănței modelului (tabel 43).

Tabel 43 - Indicatorii de adecvanță ai modelelor statistice determinate

Tip de miere	Deviația standard, σ	Indicatorul de precizie al modelului, R^2	Coeficientul de corelație, R
Polifloră	9,1275	0,9514	0,9754
Tei	11,3675	0,9215	0,9599
Salcâm	11,7147	0,9028	0,9501

Indicatorii de adecvanță calculați pentru modelele matematice arată corelarea între datele obținute experimental și cele obținute pe baza ecuațiilor matematice ce descriu dependențele dintre parametrii.

Pentru validarea modelelor matematice obținute se efectuează operația de testare a acestora, operație ce constă în compararea valorilor calculate cu ajutorul modelului propriu-zis cu valorile reale măsurate.

Pe baza valorilor experimentale obținute se calculează valoarea teoretică y conform modelului (tabelul 42). Aceste date se compară cu cele obținute experimental.

În tabelul 44 se prezintă comparativ valorile concentrațiilor determinate experimental cu cele calculate din modele, precum și erorile relative.

Tabelul 44 - Valorile concentrației măsurate, concentrației calculate și a erorilor relative obținute la verificarea dependenței concentrațiilor de tetraciclină în funcție de temperatură și timp a celor trei tipuri de miere studiate.

Nr. Crt.	Tipul de miere	Săptămâna	Temperatura	Concentrația de tetraciclină măsurată [ppb]	Concentrația de tetraciclină calculată [ppb]	Eroarea relativă [%]
1	Polifloră	10	30 °C	142,78	149,57	- 4,75
2	Tei	10	30 °C	149,50	148,19	0,87
3	Salcâm	10	30 °C	147,22	142,28	3,35

Din tabelul 43 se observă că, valorile coeficientului de corelație R sunt bune. Analizând indicatorii preciziei modelului se poate concluziona că modelele matematice elaborate reflectă cu o acuratețe satisfăcătoare fenomenul studiat.

Analiza corelativă arată că între conținutul de tetraciclină, temperatură, respectiv timpul de păstrare a mierii de albine există corelări apreciable.

Erorile relative au valori cuprinse între - 4,75% și +3,35%.

În continuare s-au determinat modele matematice statistice de predicție prin realizarea unei analize de corelație multiplă între concentrația de streptomycină, respectiv timp și temperatură.

Rezultate și discuții

Probele de miere au fost analizate săptămânal timp de cinci luni de zile. În tabelul 45 sunt prezentate rezultatele obținute în urma analizării probelor de miere în vederea determinării streptomicinei:

Tabelul 45 – Concentrația de streptomicină în funcție de temperatură și în funcție de cele trei sorturi de miere

Timp (săpt.)	Polifloră				Tei				Salcâm			
	4°C	22°C	30°C	40°C	4°C	22°C	30°C	40°C	4°C	22°C	30°C	40°C
	Concentrația de STR, [μg/kg]				Concentrația de STR, [μg/kg]				Concentrația de STR, [μg/kg]			
0	200.0	200.0	200.0	200	200.0	200.0	200.0	200	200.0	200.0	200.0	200
1	199.0	197.9	195.8	194.9	199.0	196.8	194.7	194.1	197.9	196.8	195.8	193.8
2	198.8	196.6	195.6	194.3	197.7	195.6	193.5	192.4	197.7	196.6	194.5	191.5
3	198.2	196.1	195.1	193.9	197.2	195.1	193.1	192.0	197.2	196.1	194.1	193.4
4	197.9	195.8	194.8	193.5	196.8	194.8	192.9	191.3	195.8	194.8	193.8	192.5
5	197.1	194.2	193.2	192.7	195.2	193.2	191.3	190.4	194.2	192.2	191.3	190.6
6	194.9	192.9	191.9	192.3	193.9	190.9	189.0	188.5	192.9	190.0	188.0	186.9
7	192.5	191.5	190.4	190.1	191.5	188.3	187.3	186.9	190.4	189.4	185.3	183.8
8	191.4	190.3	189.3	188.7	190.3	187.2	186.1	184.8	188.2	186.1	184.1	182.7
9	190.4	188.0	186.9	185.4	189.2	185.7	183.4	182.2	186.9	184.5	181.2	180.7
10	188.4	186.3	184.2	183.4	188.4	183.2	180.1	179.3	182.1	181.1	180.1	178.8
11	186.0	184.8	180.6	179.7	184.8	182.7	179.5	177.9	180.6	178.5	177.5	173.9
12	184.0	181.4	177.6	177.3	182.7	180.1	175.2	174.7	176.4	175.2	172.9	170.6
13	183.0	178.1	175.8	174.5	179.3	175.8	171.3	170.4	174.7	171.3	169.2	167.8
14	181.1	173.3	172.5	170.1	175.9	174.2	169.3	167.9	173.3	167.7	164.7	164.1
15	179.0	169.9	167.0	165.3	174.3	173.6	164.2	162.8	172.1	163.5	162.9	161.8
16	174.9	164.4	163.1	162.9	172.2	170.8	162.5	160.3	168.9	160.7	159.5	159.3
17	170.0	162.4	159.5	159.0	168.4	164.6	160.9	159.8	163.1	158.1	154.1	153.7
18	168.7	160.8	156.7	155.5	164.3	163.6	156.1	155.7	158.7	156.1	152.2	150.1
19	161.9	159.4	155.3	154.8	160.2	158.6	153.0	151.9	156.9	155.3	150.7	148.3
20	159.4	154.1	151.2	150.3	154.1	151.9	150.5	148.9	152.6	150.5	149.1	146.2

În vederea elaborării modelelor matematice statistice de predicție s-a realizat evaluarea efectului influenței a doi parametri prin realizarea unei analize de corelație multiplă între poluarea cu antibiotic (concentrația de streptomycină) ca variabilă dependentă, respectiv temperatură și timpul, ultimele două fiind variabile independente. Rezultatele experimentale pentru cele trei tipuri de miere, păstrate la cinci temperaturi diferite în timp, indică per ansamblu o scădere a conținutului de streptomycină. Concentrația de streptomycină în eșantioanele de miere scade cu creșterea temperaturii de depozitare. În cazul eșantioanelor de miere păstrate la 70°C se observă că, întreaga cantitate de streptomycină a fost degradată. Determinările experimentale pot fi folosite la evaluarea efectului comparativ al parametrilor măsurați prin realizarea unei analize de corelare multiplă dintre conținutul de streptomycină, ca variabilă dependentă, funcție de ceilalți parametri: temperatură, respectiv timpul de păstrare, ca variabile independente.

Pentru descrierea cât mai exactă a dependenței concentrației de streptomycină, de temperatură și timp, s-a propus o relație polinomială. Ecuația corelației multiple liniară de ordinul doi are expresia:

$$Y(T, t) = a_0 + a_1 \cdot T + a_2 \cdot t + a_3 \cdot T \cdot t + a_4 \cdot T^2 + a_5 \cdot t^2 \quad (29)$$

Coefficienții $a_0, a_1, a_2, a_3, a_4, a_5$ sunt coeficienții funcției de regresie. Aceștia s-au determinat cu ajutorul programului limbajului de programare Matlab 7.9. Y este conținutul de streptomycină ($\mu\text{g}/\text{kg}$), T – temperatura ($^{\circ}\text{C}$), t – timpul de păstrare (săptămâni). Prin prelucrarea datelor experimentale, s-au obținut o serie de modele statistice care indică influența cumulată a temperaturii și timpului de păstrare asupra conținutului în streptomycină [138].

Datele experimentale împreună cu suprafețele generate de modelele matematice statistice sunt prezentate în figurile 89, 90 și 91:

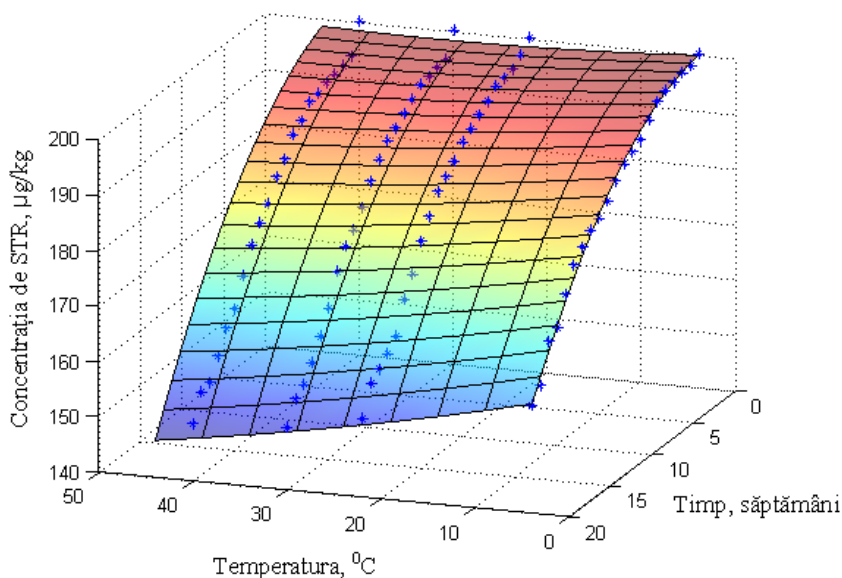


Figura 89 - Variația concentrației de streptomycină în cazul mierii poliflore în funcție de temperatură și timp

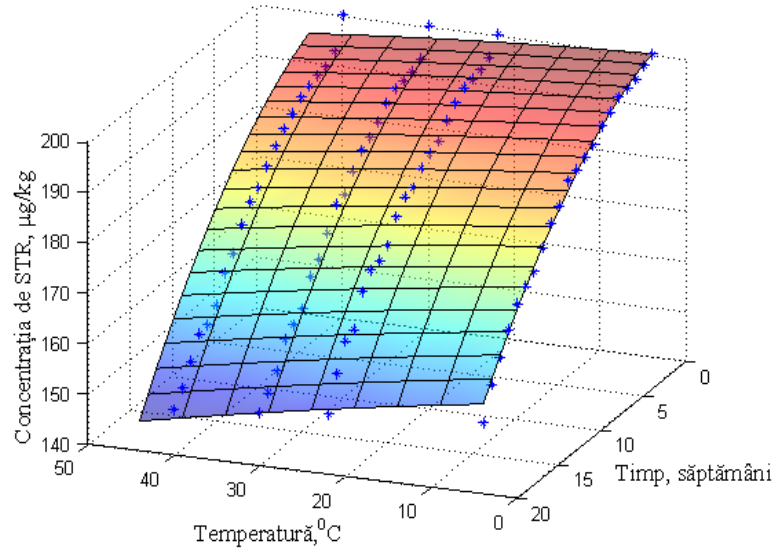


Figura 90 - Variația concentrației de streptomicină în cazul mierii de tei în funcție de temperatură și timp

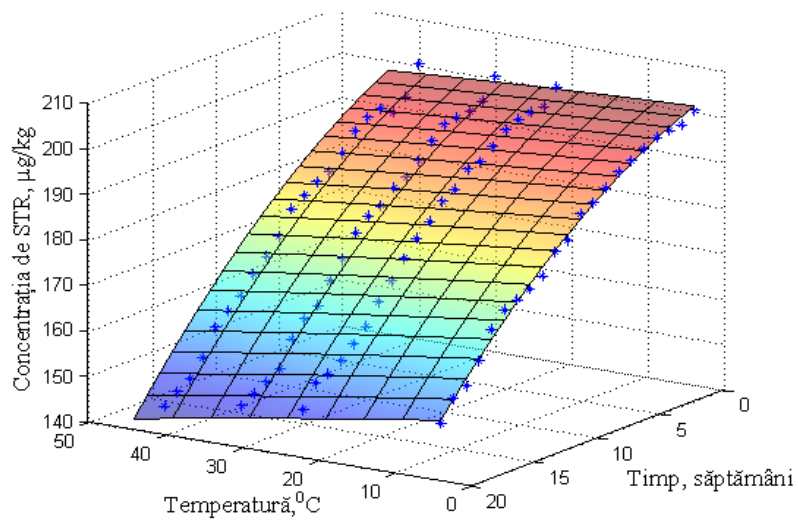


Figura 91 - Variația concentrației de streptomicină în cazul mierii de salcâm în funcție de temperatură și timp

Ecuțiile modelelor matematice statistice de ordinul doi obținute în urma regresiei multiple liniare sunt prezentate în tabelul 46. Ele sunt valabile pe domeniul de valori studiat.

Din cauza faptului că streptomicina este în întregime degradată odată cu atingerea temperaturii de 70°C, dezvoltarea unor modele de regresie pentru temperaturi mai mari de 70°C nu a fost considerată necesară.

Tabelul 46 - Ecuțiile modelelor statistice obținute în cazul probelor studiate

Tip de miere	Ecuțiile modelelor matematice statistice
Polifloră	$Y = 200.1822 - 0.1331 \cdot T - 0.0751 \cdot t - 0.0148 \cdot T \cdot t + 0.0021 \cdot T^2 - 0.0933 \cdot t^2$
Tei	$Y = 200.2249 - 0.0548 \cdot T - 0.5487 \cdot t - 0.0093 \cdot T \cdot t - 0.0012 \cdot T^2 - 0.0762 \cdot t^2$
Salcâm	$Y = 201.1308 - 0.0576 \cdot T - 1.0948 \cdot t - 0.0094 \cdot T \cdot t - 0.00005 \cdot T^2 - 0.0625 \cdot t^2$

Unde:

- Y = concentrația de streptomicină, μg/kg
- T = temperatura, °C
- t = timp, săptămâni

După calcularea coeficienților modelului, este necesar să se efectueze o comparație între prezicerile modelului și datele furnizate de procesul real. Drept indicatori ai adecvănței modelului s-au folosit deviația standard, coeficientul de corelație R, coeficientul de precizie R² (tabelul 47):

Tabel 47 - Indicatorii de adecvănță ai modelelor statistice determinate

Tip de miere	Deviația standard, σ	Indicatorul de precizie al modelului, R ²	Coeficientul de corelație, R
Polifloră	1,3540	0,9915	0,9957
Tei	1,4604	0,9899	0,9949
Salcâm	1,3940	0,9925	0,9962

Analiza corelativă arată că între conținutul de streptomicină, temperatură, respectiv timpul de păstrare a mierii de albine există corelări apreciabile.

Ecuțiile modelelor matematice statistice obținute pot fi utilizate ca și modele de predicție.

Parametrii de corelare argumentează o capacitate de predicție bună a modelelor matematice statistice. Studiul modelelor obținute a demonstrat că evoluția concentrației de streptomycină în ceea ce privește timpul de păstrare și temperatură este similară pentru toate cele trei tipuri de miere studiate.

Pentru validarea modelelor matematice obținute se efectuează operația de testare a acestora, operație ce constă în compararea valorilor calculate cu ajutorul modelului propriu-zis cu valorile reale măsurate.

Pe baza valorilor experimentale obținute se calculează valoarea teoretică Y conform modelului (tabelul 46). Aceste date se compară cu cele obținute experimental.

Pentru a realiza aceste comparații s-a utilizat următorul set de date, prezentat în tabelul 48. De asemenea, în acest tabel se regăsesc valorile erorilor relative obținute la verificarea dependenței concentrațiilor de streptomycină în funcție de temperatură și timp a celor trei tipuri de miere studiate.

Tabelul 48 - Valorile concentrației măsurate, a concentrației calculate și a erorilor relative obținute la verificarea dependenței concentrațiilor de streptomycină în funcție de temperatură și timp a celor trei tipuri de miere studiate.

Nr. Crt.	Tipul de miere	Săptămâna	Temperatura	Concentrația de streptomycină măsurată [ppb]	Concentrația de streptomycină calculată [ppb]	Eroarea relativă [%]
1	Polifloră	10	30 °C	184,2	184,23	-0,01
2	Tei	10	30 °C	180,1	181,60	-0,83
3	Salcâm	10	30 °C	180,1	179,33	0,42

Din tabelul 47 se observă că, valorile coeficientului de corelație R sunt bune. Analizând indicatorii preciziei modelului se poate concluziona că modelele matematice elaborate reflectă cu o acuratețe satisfăcătoare fenomenul studiat.

Erorile relative au valori cuprinse între - 0,01% și + 0,42%.

În tabelul 49 sunt prezentate modelele matematice ce caracterizează dependența concentrației de tetraciclină, respectiv streptomycină, de temperatură și timp, în funcție de tipul de miere:

Tabelul 49 - Ecuțiile modelelor matematice statistice

Tipul de miere	Tetraciclină (TC)	Streptomycină (STR)
Polifloră	$\text{Conc_TC} = 226,6923 - 0,7270 \cdot T - 6,2593 \cdot t$	$\text{Conc_STR} = 200,1822 - 0,1331 \cdot T - 0,0751 \cdot t - 0,0148 \cdot T \cdot t + 0,0021 \cdot T^2 - 0,0933 \cdot t^2$
Tei	$\text{Conc_TC} = 232,1330 - 0,9124 \cdot T - 5,5190 \cdot t$	$\text{Conc_STR} = 200,2249 - 0,0548 \cdot T - 0,5487 \cdot t - 0,0093 \cdot T \cdot t - 0,0012 \cdot T^2 - 0,0762 \cdot t^2$
Salcâm	$\text{Conc_TC} = 223,6585 - 0,9429 \cdot T - 4,7181 \cdot t$	$\text{Conc_STR} = 201,1308 - 0,0576 \cdot T - 1,0948 \cdot t - 0,0094 \cdot T \cdot t - 0,00005 \cdot T^2 - 0,0625 \cdot t^2$

Concluzii

Predicțiile modelelor pot constitui un criteriu în controlul aprecierii calității mierii de albine.

Pentru descrierea cât mai exactă a dependenței concentrației de tetraciclină, de temperatură și timp, s-a propus o relație polinomială, ecuația corelației multiple liniară de ordinul unu fiind de forma: $y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2$.

Analiza corelativă arată că între conținutul de tetraciclină, temperatură, respectiv timpul de păstrare a mierii de albine există corelări apreciable. Erorile relative au valori cuprinse între - 4,75% și +3,35%.

Prin prelucrarea datelor experimentale, s-au obținut o serie de modele statistice care indică influența cumulată a temperaturii și timpului de păstrare asupra conținutului în streptomycină.

În cazul streptomicinei, erorile relative au valori cuprinse între - 0,01% și + 0,42%.

Datorită faptului că streptomicina este în întregime degradată odată cu atingerea temperaturii de 70°C, dezvoltarea unor modele de regresie pentru temperaturi mai mari de 70°C nu a fost considerată necesară.

Pentru a descrie cât mai exact dependența concentrației de streptomycină, de temperatură și timp, s-a propus o relație polinomială, ecuația corelației multiple liniară fiind de ordinul doi.

Analizând tabelul cu indicatorii de adecvanță ai modelelor statistice determinate se observă că, valorile coeficientului de corelație R sunt bune.

În vederea validării modelelor matematice s-a efectuat operația de testare, această operație realizându-se prin compararea valorilor calculate cu ajutorul modelului propriu-zis cu valorile reale măsurate. În urma acestei operații se poate concluziona faptul că modelele matematice elaborate reflectă cu acuratețe satisfăcătoare fenomenul studiat.

CONCLUZII GENERALE ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

Concluzii generale

În cadrul lucrării au fost efectuate studii ce au avut ca scop prezentarea actuală a nivelului de cunoaștere din literatura de specialitate, a analizelor de laborator, cât și aducerea unor contribuții personale în vederea îmbunătățirii calității mierii de albine prin utilizarea tehnicilor moderne de modelare matematică.

În ceea ce privește industria alimentară, legislația internațională și cea din România încearcă implementarea unui sistem bazat pe siguranța alimentelor de la producție, transport, până la produsul finit ce urmează a fi comercializat [139].

Prin crearea pieței unice europene din care face parte și România, precum și prin tendințele de globalizare a economiei mondiale, este stimulată obținerea unor produse de calitate. De asemenea, pentru a garanta siguranța sănătății consumatorilor, este necesară existența laboratoarelor de analize chimice care să ofere servicii de calitate superioară, în concordanță cu legislația în vigoare. Astfel, organele în drept trebuie să efectueze teste de calitate.

În studiul efectuat s-a făcut apel la mai multe domenii cum ar fi: chimie – fizică, chimie analitică, chimie organică, matematică, statistică, informatică (Matlab, Excel) și inginerie chimică.

Cercetările teoretice efectuate în cadrul acestei lucrări, rezultatele experimentale obținute și prelucrarea acestora au urmărit obiectivele propuse care au fost atinse și rezolvate după cum urmează:

1. Realizarea unei documentări bibliografice cu privire la tehnologia de obținere a mierii

Realizarea acestui prim obiectiv s-a realizat prin studierea unui număr mare de referințe bibliografice de actualitate apărute în țară și în străinătate.

În lucrare au fost prezentate aspecte privind importanța mierii și a produselor apicole, proprietățile acestora, tehnologia de obținere și metode de control a calității mierii de albine.

2. Sinteza principalelor legi și reglementări naționale și internaționale privind domeniul apiculturii

Pentru obținerea unor produse sigure, de calitate superioară, legislația europeană impune norme tot mai stricte producătorilor. În ceea ce privește calitatea mierii de albine, România trebuie să respecte legile în vigoare, care sunt în concordanță cu legislația Uniunii Europene. Pentru atingerea și îndeplinirea acestui obiectiv a fost studiat un număr mare de standarde naționale și internaționale, realizându-se o sinteză a principalelor legi și reglementări naționale și internaționale privind domeniul apiculturii.

3. Documentare bibliografică asupra tehnicilor de modelare matematică și optimizare

Acest aspect s-a concretizat prin prezentarea noțiunilor generale legate de modelarea matematică, simularea numerică și a interdependențelor existente între acestea. În lucrare sunt definite noțiunile de sistem, model și modelare, tratate prin prisma teoriei sistemelor. De asemenea, sunt prezentate elemente caracteristice ale modelelor statistice, precum și teoria generală a modelării.

În descrierea comportării sistemelor reale a fost evidențiat rolul simulării, aceasta fiind înțeleasă ca o limitare a comportării sistemului real reprezentat prin modelul său.

4. Realizarea unei baze de date experimentale în urma monitorizării efectuate timp de șase ani asupra diferitelor tipuri de miere, din diferite regiuni ale țării

Obiectivul realizării unei baze de date experimentale a fost atins prin analizarea diferitelor tipuri de miere, din diferite regiuni, între anii 2003-2008. Pentru aceasta au fost monitorizate probe de miere de albine prin determinarea conținutului de tetraciclină și de streptomycină (**Direcțiile de cercetare A - F**).

S-au făcut determinări de antibiotice pentru următoarele județe: Timiș, Bihor, Hunedoara, Satu Mare, Cluj Napoca, Alba Iulia, Sibiu, Arad, Sălaj, Caraș – Severin, Argeș, Vâlcea, Mehedinți, Olt, Giurgiu, Dolj, Prahova, Gorj (**Direcția de cercetare A**).

Probele de miere de albine au fost prelevate în condiții standard adecvate, atât din punct de vedere fizico-chimic cât și microbiologic. Cantitatea probelor a fost de aproximativ 400 grame/probă și au fost recoltate în condiții normale de temperatură și umiditate.

De asemenea, din județul Timiș, pe o perioadă de 6 ani, au fost recoltate în vederea analizării un număr de 233 de probe pentru determinarea tetraciclinei și un număr de 186 de probe pentru detecția conținutului de streptomycină (**Direcția de cercetare B**).

5. Determinarea modelelor matematice ce caracterizează influența concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină asupra calității diferitelor sorturi de miere în condiții diferite de temperatură.

Acest obiectiv a fost îndeplinit prin prelucrarea datelor experimentale și prin obținerea modelelor matematice corespunzătoare. Astfel, modelele matematice ce caracterizează variația în timp a concentrațiilor de tetraciclină și streptomycină s-au determinat din dependențele considerate de forma $y = f(x)$.

Stabilirea modelelor matematice pe baza datelor experimentale a fost efectuată prin regresii și a asigurat stabilirea unor expresii matematice care modelează dependențele între diferitele mărimi caracteristice. Relațiile matematice obținute prin modelare conțin coeficienți variabili specifici. Cu cât coeficientul de corelație este mai mare (mai apropiat de 1,0) precizia modelării crește. Se observă că, indicatorii preciziei modelului au valori foarte bune, iar erorile relative au valori relativ scăzute (**Direcția de cercetare F**).

6. Verificarea și testarea modelelor matematice obținute, prin calculul indicatorilor de adecvanță.

Obiectivul a fost atins prin efectuarea operațiilor de testare, respectiv validare. Aceste operații constau în compararea valorilor calculate cu ajutorul modelului propriu-zis cu valorile reale măsurate.

Din numărul total de determinări experimentale, pentru testarea modelului s-a ales câte un set de date pentru fiecare sort de miere de albine luat în studiu. Pe baza datelor experimentale obținute se calculează valoarea erorii relative. Se observă că pentru fiecare set de date, acestea au valori relativ scăzute.

Drept indicatori ai adecvanței modelului se folosesc coeficientul de corelație (R), deviația standard (σ) și indicatorul de precizie al modelului (R^2).

În vederea validării modelelor matematice s-a efectuat operația de testare, această operație realizându-se prin compararea valorilor calculate cu ajutorul modelului propriu-zis cu valorile reale măsurate. În urma acestei operații se poate concluziona faptul că modelele matematice elaborate reflectă cu acuratețe satisfăcătoare fenomenul studiat (**Directia de cercetare F**).

7. Elaborarea unor tehnici strategice de îmbunătățire a indicatorilor de calitate a mierii pe baza concluziilor elaborate în urma studiilor efectuate.

Pentru a rezolva acest obiectiv a părții experimentale s-a apelat la baza materială a Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor Timiș din cadrul Direcției Sanitare Veterinare și pentru Siguranța Alimentelor Timiș.

Cercetările efectuate în perioada 2003-2008 privind evaluarea nivelului contaminării cu tetraciclină și streptomycină a mierii de albine în zona de vest a României au evidențiat:

- ✓ dinamica probelor contaminate cu tetraciclină
- ✓ dinamica probelor contaminate streptomycină
- ✓ distribuția numărului de probe de miere analizate pentru determinarea tetraciclinei
- ✓ distribuția numărului de probe de miere analizate pentru determinarea streptomisinei
- ✓ dinamica descendentă a procentului de probe contaminate cu tetraciclină
- ✓ distribuția probelor prezumtiv pozitive pentru tetraciclină în funcție de tipul de miere
- ✓ distribuția probelor prezumtiv pozitive pentru streptomycină în funcție de tipul de miere
- ✓ distribuția probelor pozitive (%) în funcție de tipul de antibiotic

De asemenea, se observă că, frecvența probelor poluate cu tetraciclină, respectiv streptomycină diferă de la un an la altul. Astfel în anul 2003 s-a înregistrat cel mai mare număr de probe poluate cu tetraciclină (51,66%), pe când cele mai multe probe pozitive pentru streptomycină au fost în anul 2004 în procent de 14,17% (**Directia de cercetare A**).

În urma analizării probelor de miere de tei, de salcâm și polifloră recoltate din județul Timiș, în studiul monitorizării conținutului de reziduuri de antibiotice s-a evidențiat distribuția probelor detectate ca fiind pozitive pentru tetraciclină și streptomycină în funcție de timp și frecvența contaminării cu tetraciclină și streptomycină a celor trei tipuri de miere între anii 2003-2008 (**Directiile de cercetare B**).

În cazul determinării gradului de contaminare al probelor de miere cu tetraciclină și a caracterizării din punct de vedere cinetic a degradării tetraciclinei în

diferite de tipuri de miere în timpul depozitării s-au luat în studiu trei tipuri de miere (tei, polifloră, șalcâm) recoltate în anul 2009 de la patru apicultori din zona de vest a României. În urma studiilor efectuate se observă că, făcând o medie a concentrațiilor obținute pe fiecare tip de miere, cea mai poluată dintre ele este cea de tei. Pe baza rezultatelor experimentale s-a constatat că pentru a descrie degradarea reziduurilor de tetraciclină în cele trei tipuri de miere analizate, s-a adoptat un model cinetic de ordinul întâi. Analizând pH-ul probelor inițiale și valorile timpului de înjumătățire a tetraciclinei în probele de miere luate în studiu, se observă că, timpul de înjumătățire crește cu creșterea pH-ului **(Direcția de cercetare C)**.

În scopul caracterizării din punct de vedere teoretic a proceselor care au loc în cadrul fenomenelor de degradare a streptomycinei în mierea de tei a fost adoptată utilizarea unui model cinetic de ordinul întâi. Timpul de înjumătățire pentru procesul de degradare a streptomycinei este independent de concentrația inițială **(Direcția de cercetare D)**.

În urma studiului comparativ al metodelor rapide de detectare (ELISA), respectiv de confirmare (HPLC) a concentrației reziduurilor de streptomycină din mierea de albine, s-a observat că, există diferențe mici în ceea ce privește identificarea cantității de antibiotic prin cele două metode. Prin compararea dispersiilor celor două serii de analize obținute (prin ELISA, respectiv HPLC), testul F a lui Fischer-Snedecor admite că ambele metode sunt la fel de reproductibile **(Direcția de cercetare E)**.

Acest obiectiv a fost realizat și prin elaborarea unor concluzii cu privire la utilizarea modelelor matematice obținute în urma studiilor privind stabilitatea concentrației reziduurilor de tetraciclină și streptomycină în trei sorturi de miere în condiții diferite de temperatură. Modelele matematice pot fi considerate modele de predicție, care pot fi folosite la stabilirea strategiilor de îmbunătățire a indicatorilor de calitate a mierii de albine **(Direcția de cercetare F)**.

Pentru a se reduce la minimum riscul contaminării mierii de albine cu antibiotice este necesară monitorizarea permanentă a acestora. În acest sens, s-a stabilit Planul anual de Supraveghere Sanitară Veterinară a acestor reziduuri.

8. Generarea și trasarea a două hărți ale României cu specific apicol pe baza studiilor efectuate în lucrare

Timp de șase ani au fost realizate analize pentru detectarea reziduurilor de antibiotice din probe de miere de albine, recoltate din partea de vest a țării. În urma studiilor se observă că, frecvența probelor poluate cu tetraciclină, respectiv streptomycină diferă de la un județ la altul.

Pe baza determinărilor experimentale s-au trasat două hărți ce ilustrează teritoriul României și care redau distribuția probelor contaminate cu tetraciclină și streptomycină a mierii de albine, din județele din care au fost recoltate probe, respectiv partea de vest a României.

Pentru buna orientare a consumatorilor spre mieri de calitate superioară, lipsite de substanțe antimicrobiene realizarea unor astfel de hărți prezintă o importanță deosebită.

De asemenea, aceste hărți au un rol important pentru organele de control în domeniu în vederea monitorizării eficiente a conținutului de antibiotic ce poate fi prezent în mierea de albine **(Direcția de cercetare A)**.

Contribuții personale

În prezenta lucrare principalele contribuții personale aduse sunt următoarele:

- **Realizarea unei documentări bibliografice privind caracteristicile mierii, tehnologia de obținere și metodele de analiză cu privire la calitatea acesteia.**
- **Prezentarea într-un mod sistemic al conceptelor de modelare matematică și simulare numerică, privite ca modalități moderne de realizare a cunoașterii.**
- **Evaluarea preciziei metodelor de analiză prin validarea diferiților parametri (repetabilitate, reproductibilitate, etc).**
- **Verificarea exactității rezultatelor cercetărilor prin utilizarea diagramelor de control.**
- **Studiul stabilității tetraciclinei în mierea de albine în funcție de timp și în funcție de tipul de miere.**
- **Studiul stabilității streptomycinei în mierea de albine în funcție de timp, de temperatură și de tipul de miere.**
- **Elaborarea unor modele cinetice de ordinul întâi, ce caracterizează din punct de vedere teoretic procesele fizico-chimice care au loc în cadrul fenomenelor de degradare a tetraciclinei și streptomycinei în diferite sorturi de miere**
- **Elaborarea și validarea unor modele matematice care descriu dependențele existente între diferiți parametri ce influențează indicatorii de calitate ai mierii de albine.**
- **Elaborarea unor modele matematice statistice de predicție cu ajutorul cărora să se poată prognoza modalitățile concrete de intervenție tehnice, tehnologice sau chimice, pentru îmbunătățirea valorilor indicatorilor de calitate ai sorturilor mierii de albine**
- **Generarea și trasarea a două hărți ale României cu specific apicol pe baza studiilor efectuate în lucrare**

Cercetările și studiile efectuate se referă la metodele și mijloacele de testare a calității mierii de albine, care joacă un rol important atât în ceea ce privește

valorificarea acesteia ca și produs propriu-zis, dar și ca materie primă în industria alimentară și farmaceutică. Îmbunătățirea calității mierii, presupune cunoașterea factorilor care o pot polua și metodele de testare pentru identificarea lor în vederea eliminării.

Având în vedere importanța limitării concentrațiilor de antibiotice în miere, în cadrul acestei lucrări s-au efectuat o serie de studii teoretice și experimentale referitoare atât la concentrațiile de antibiotic existente în produsele obținute în diferite zone ale României, cât și la posibilitățile și metodologiile tehnice de reducerea acestora.

De asemenea, s-au elaborat o serie de studii teoretice pe baza unor metode matematice care reflectă destul de concludent dependențele existente între indicatorii de calitate ai mierii și o serie de parametri fizico-chimici importanți. Pe baza aspectului acestor modele matematice se poate stabili o predicție asupra modalităților de modificare a parametrilor fizico-chimici externi, astfel încât indicatorii de calitate ai mierii să fie îmbunătățiți semnificativ.

În concordanță cu scopul acestei lucrări s-a propus realizarea unor obiective concrete în partea experimentală. În vederea atingerii acestor obiective s-au abordat șase direcții de cercetare concrete. În cadrul celor șase direcții de cercetare s-au efectuat studii, determinări experimentale, prelucrarea datelor experimentale, determinarea unor modele matematice, astfel încât toate obiectivele propuse au fost îndeplinite.

4. BIBLIOGRAFIE

1. Ștefan Lazăr, O. C. Vornicu, "Apicultura", Editura Alfa, 2007
2. Ulderica Grassone, Francesco Pannella, "Apicultura - organizare, structuri, logistică", Editura Lumea Apicolă, 2007
3. Vasile Popescu Albina, "File din istoria apiculturii banatene - de la origini până astăzi", Marineasa, 1997
4. Liviu Alexandru Mărghitaș, „Creșterea albinelor”, Editura Ceres , 1995
5. Petre Iordache, Ileana Roșca, Mihai Cismaru, "Plante melifere de foarte mare și mare pondere economico-apicolă", Editura: Editura Lumea Apicolă, 2008
6. Paul Bucata, "Pledoarie pentru creșterea albinelor", Editura Alex-Alex & Leti Press, 2001
7. Maria Eftimescu, "Influența vremii asupra producției de miere", Editura Ceres, 1982
8. S. Lazar, C. O. Vornicu, "Albinele și sănătatea lor", Editura Alfa, 2009
9. Liviu Alexandru Mărghitaș, "Albinele și produsele lor", Editura Ceres - 2005
10. Wolfgang Ritter, "Bolile albinelor", Editura MAST, 2006
11. Peter Akun, "Foloasele mierii. Secrete și utilizări ale produselor apicole. Rețete folositoare", Editura Lucman, 2003
12. M. Bura, S. Patruica, V.A. Bura, "Tehnologia apicolă", Editura Ferma, 2008
13. Colectiv Autori, "Albinele. Stupina de lângă casă", Editura Alex-Alex, 2001
14. Vasile Stănescu, "Medicină Legală Veterinară", Editia I, Editura ALL, 1994
15. Marian Nita, Laurentiu Dinu, Adriana Camelia Mitea, "Apiterapia", Editura Aius, 2010
16. Dan Bodescu, "Eficiența economică a apiculturii în România", Editura Alfa, 2007
17. V. Petru, I. Oprisan, " Apicultura și baza meliferă" Editura Agro silvica București, 1964
18. S. Lazar, M. Dolis, "Apicultura practică", Editura Alfa, 2008
19. Asociația crescătorilor de albine din România, "Manualul Apicultorului Ediția IX-a", București, 2007
20. <http://eur-lex.europa.eu/ro/index.htm>
21. http://ec.europa.eu/food/food/index_en.htm
22. Liviu Rusu, Monica Neagu, "Siguranța alimentelor. Calitatea alimentelor", Editura Spiru Haret, Iasi, 2011
23. Liviu Rusu, Simona Radulescu, Nina Patru, "Siguranța alimentelor. Legislație", București, 2010
24. Cristina Mateescu, "Apiterapia sau cum să folosim produsele stupului pentru sănătate", FIAT LUX, 2005
25. Eugen Marza , Nicolae Nicolaide, „Inițiere și practică în apicultură” , 1990
26. <http://www.apimondiafoundation.org>
27. STAS 784/3-1989
28. Bratu, Iuliana, Georgescu, Cecilia, "Aspecte privind compoziția și calitatea unor sortimente de miere din România în raport cu normele prevăzute de Codex Alimentarius", Buletin științific, Sibiu, vol.IV, p.31-36.

29. Șindilar, E.V., T. Bondoc, "Controlul sanitar veterinar și salubrității alimentare", Editura Ion Ionescu de la Brad, Iași, 2002
30. Șindilar, E.V., "Controlul igienic al produselor și subproduselor de origine animală", Vol. I, Editura INRCS, Iași, 2000
31. Bratu, Iuliana, „Studiu asupra factorilor ce influențează culoarea diferitelor sortimente de miere din România”, Buletin științific, Sibiu, vol.IV, p.27-30
32. Bulancea, "Autentificarea, expertiza și depistarea falsificărilor produselor alimentare", Editura Academică, Galați, 2002
33. Banu, "Calitatea și controlul calității produselor alimentare", Editura AGIR, București, 2002
34. Vasile Stanescu, "Igiena și controlul alimentelor. Practicum sanitary veterinar", Editura Fundatiei "România de maine", București, 1998
35. Constantin Savu, Carmen Petcu, "Igiena și controlul produselor de origine animală", Editura Semne, 2002
36. Delia Perju, T. Todincă "Automatizarea proceselor chimice", Centrul de multiplicare, vol. 2, Timisoara, 1995
37. Delia Perju, M. Geanta, M. Suta, Carmen Rusnac, "Automatizarea proceselor chimice", Mirton, vol.2, Timisoara, 1998
38. T.Todincă, M. Geantă "Modelarea și simularea proceselor chimice. Aplicații în Matlab", Politehnica, Timișoara, 1999
39. Delia Perju, M. Suta, T. Todincă, Carmen Rusnac, "Echipamente de automatizare pneumatice de joasă presiune. Aplicații", Politehnica Timișoara, 2001
40. Delia Perju, M. Geantă, M. Șuta, Carmen Rusnac, "Echipamente de automatizare pneumatice de joasă presiune.", Politehnica Timișoara, 2003
41. O. Muntean, A Woinaroschy, G. Bozga, "Aplicații la calculul reactoarelor chimice", Tehnica, București, 1984
42. A. Imre Lucaci, P.S Agachi, "Optimizarea proceselor chimice din industria chimică", București, 2002
43. Raul Ciprian Moldovan, Teză de doctorat, Universitatea „Politehnică Timișoara”, 2009
44. Savii G., Luchin M., „Modelare și simulare”, Editura Eurostampa, Timisoara, 2000
45. Busenberg S., Forte B, Kuiken H.K., „Mathematical Modelling of Industrial Processes”, Spriger-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992
46. Letia T.S., Astilean A.M., „Sisteme cu evenimente discrete: modelare, analiză, sinteză și control”, Editura Albastră, Cluj-Napoca, 1998
47. Ungureanu St., "Conducerea automată a proceselor. Teorie și aplicații în ingineria chimică", Volumul I, editura Matrix Rom, București, 2005.
48. Delia Perju, M. Suta, Dumitrel D., Tănăsie C., "The use of analogue-digital systems for measuring the specific parameters of pH control systems", Proceedings of the 4th International Conference of PHD Students, University of Miskolc, Engineering Sciences 1, p. 359, 2003
49. Delia Perju, M. Suta, Cata A., Brusturean G., „The study of Analytical and Experimental Modelling of the Heat Transfer for a Heat Exchanger Pipe Type, Proceedings of the 4th International Conference of PHD Students, University of Miskolc, p 413, 2003
50. Delia Perju, C. Rusnac, M. Șuta, G.A Brusturean, "Revista de chimie", 54 (3), 250, 2003

51. Roger G., Franks, "Modelarea și simularea în ingineria chimică", Editura Tehnică București, 1979
52. M. Tertisco, P. Stoica, „Identificarea și estimarea parametrilor sistemelor”, Editura Academiei, 1980
53. T. Todincă, Delia Perju, M. Suta, "Optimizări în industria chimică", Vol. I, Centrul de multiplicare al Universității Tehnice Timișoara, 1993
54. O. Iordache, Gh. Maria, S. Corbu, "Modelarea statistică și estimarea parametrilor proceselor chimice", Editura Academiei Române, București, 1991
55. R. Mihail, "Introducere în strategia experimentării, cu aplicații din tehnologia chimică", Editura Științifică și Pedagogică, București, 1976.
56. Andrei Glück, "Metode matematice în industria chimică", Editura Tehnică, București, 1971
57. Gh. Mihoc, V. Urseanu, E. Ursianu, " Modele de analiză statistică", Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1982
58. M. Titu, C. Oprean, E. Cicala, „Statistică tehnică și control statistic”, Univ. „Lucian Blaga” Sibiu, 2001
59. L.A. Zadeh, C. A. Desoer, „Linear system theory”, McGraw-Hill, New York, San Francisco, Toronto, 1963
60. Nasta Tanasescu, "Modelarea matematică și simularea numerică a proceselor tehnologice din industria alimentară", Editura Matrix Rom, București, 2000
61. S. Kilyeni, "Metode numerice. Algoritme. Programe de calcul. Aplicații în energetică ", Ed. Orizonturi Universitare, Editia a III-a, Timisoara, 2004
62. G. J. Borse, "Numerical Methodes with MATLAB", PWS Publishing Company, Boston, 1997
63. Anthony J. Wheeler, Ahmad R. Ganji, "Introduction to Engineering Experimentation", Prentice Hall, New Jersey, 1996
64. A. Aloman, "Statistică și probabilitate în experimentul științific", Editura Matrix Rom, București, 1998
65. Pocinog Grigorie, „Modele și metode de simulare”, Editura Eurobit, Timișoara, 1998
66. Neagu C., Ionita C., „Rețele neuronale. Teorie și aplicații în modelarea și simularea proceselor și sistemelor de producție”, Editura Matrix Rom, București, 2004
67. Delia Perju, M. Geantă, M. Șuta, Carmen Rusnac, "Automatizarea proceselor chimice", Mirton, vol.I, Timișoara, 1998
68. Dulau M., Oltean S., "Modelare și simulare. Lucrări de laborator", Universitatea "Petru Maior", Târgu Mureș, 2003
69. Ratiu Suciuc, "Modelarea și simularea proceselor economice", Editura Didactică și Pedagogică, București, 1995
70. R.C. Moldovan, D. Perju, M. Suta, M. Calisevici, S. Marinescu, "Modelling and simulation of the electrothermal gas micro-flowmeter static behaviour", Chemical Bulletin of Politehnica University of Timisoara, Series of Chemistry and Environmental Engineering, Vol. 52 (66), 1-2, 2007, p. 21-26, ISSN 1224-6018, CNCSIS cat B+
71. Nechifor Mihai, "Terapia antibacteriană , antifungică și antivirală în stomatologie", Editura Glissando, Iasi, 2002
72. Nechifor Mihai, „Farmacologie”, I.M.F. Iași, 1989
73. Valentin Stroescu, „Farmacologie, editia a-III-a revizuită și adăugită” Editura All, București 1999

74. Vlentin Stroescu, „Bazele farmacologice ale practicii medicale”, Editura Medicală, București - 1997
75. Dumitru Dobrescu, „Asocierea medicamentelor. Incompatibilități farmacodinamice”, Editura Medicală, București
76. B. Cuparencu, „Curs de farmacologie”, vol II. Litiografia I.M.F., Cluj-Napoca, 1988
77. R.T. Cristina, „Introducere în farmacologia și terapia veterinară”, Editura Solness, Timișoara, 2006
78. RT Cristina, Teusdea Valer, „Ghid de farmacie și terapeutică veterinară”, Brumar, Timișoara, 2008
79. Ecaterina Cioranescu, „Medicamente de sinteza”, Editura Tehnica, 1957
80. <http://ro.wikipedia.org>
81. Protocol de lucru Elisa determinarea reziduurilor de tetraciclină - Rbiopharm
82. Protocol de lucru Elisa determinarea reziduurilor de streptomycină - Rbiopharm
83. Popescu N., Meica S., „Produsele apicole și analiza lor chimică”, Editura Diacon Coresi, București, 1997
84. RT Cristina, Teusdea Valer, Maria Andresescu, Hutu Ioan, „Ghid legislativ European. Farmacovigilența și legislația medicamentului veterinar”, Mirton, Timișoara, 2009
85. RT Cristina, Viorica Ghiurciu, „Elemente de farmacovigilență și toxicovigilență în medicina veterinară”, Brumar Timișoara, 2010
86. Directorate general for Health & Consumers, DG Health and Consumers Management Plan 2011 and beyond, Ref. Ares(2010)989199 - 22/12/2010, 55p.
87. W. Thanasarakhan, S. Kruanetre, R. L. Deming, B. Liawruangrath, S. Wangkarna, S. Liawruangrath, *Talanta*(2011),doi:10.1016/j.talanta.2011.03.087
88. Regulation (EC) no 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council, OJ L152, 16.6.2009, p.11-22.
89. Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin L15/1, 20.01.2010, p.1-72.
90. Jiantao Li, Ligang Chen, Xiao Wang, Haiyan Jin, Lan Ding, Kun Zhang, Hanqi Zhang, Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography, *Talanta*, 2008, 75, 1245-1252.
91. Community Reference Laboratories, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. CRL Guidance Paper (December 7, 2007): 1-8.
92. Landerkin, G. B. – Katznelson, H.: Stability of antibiotics in honey and sugar syrup as affected by temperature. *Applied Microbiologie*, 5, 1957, pp. 152–154.
93. Martel, A. C.; Zeggane, S.; Drajnudel, P.; Faucon, J. P.; Aubert, M, “Tetracycline residues in honey after hive treatment, *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23 (3) 265–273”

94. Viera Čuláková, Eugen Kiss, Janka Kubincová, Stanislav Šilhár, „Kinetics of degradation of oxytetracycline and tetracycline in honey and in a glucose-fructose model mixture in various storage conditions, *Journal of Food and Nutrition Research* Vol. 47, 2008, No. 3, pp. 139–143”
95. Tayar, G., Rath, S., Guillermo, F., Reyes, R. (2010) “A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracycline residues and evaluation of their stability in honey. *Food Control* 21, 620–625”
96. Francisco Molino, Regina Lázaro, Consuelo Pérez, Susana Bayarri, Lourdes Corredera, Antonio Herrera, Effect of pasteurization and storage on tetracycline levels in honey, *Apidologie* (2011) 42:391–400.
97. Decizia uropene 2002/657/CE
98. http://en.wikipedia.org/wiki/Rate_equation
99. Cornelia Păcurariu, “Cinetică chimică”, Editura Politehnică Timișoara, 2003
- 100. Monica Cristina Cara, Gabriela-Alina Dumitreț, Mirel Glevitzky, Delia Perju, Stability of tetracycline residues in honey, *J. Serb. Chem. Soc.* 77(7), 2012, p. 879-886**
101. Does, R.J.M.M., Roes, K.C.B., „Shewart – type Charts in Nonstandard Situation *Technometrics* 37, p. 15+40, 1995”
102. Roes, K.C.B, Does, R.J.M.M., “Shewart – type Control Charts for Individuals, *Journal of Quality Technology* 25, p. 188-189, 1999”
103. Singh S.S., „Total Quality Essentials, McGraw-Hill, 1992”
104. Barkman W.E., „Process Quality Control for Manufacturing, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1989”
- 105. Gheorghita Simion, Alexandra Trif, Monica Cristina Cara, Lăcrămioara Damiescu, „Evaluation of Tetracyclines’ and Cloramphenicol’s Residues Levels in honey from Timis County between 2007-2010”, *Lucrări științifice Medicină veterinară, Volumul XLIV, 2011, Timișoara, p. 264-270***
106. Franz Lampeitl, “Albinăritul pentru începători”, Editura: M.A.S.T., 2002
- 107. Monica Cristina Cara, Gheorghita Simion, Panfiloiu Mirabela, Harieta Pirlea, „Monitorizarea reziduurilor de antibiotic din miere”, *Medicamentul veterinar, Vol. 5 (2) 2011, p. 74-78***
- 108. Monica Cristina Cara, Simion Gheorghita, Mirabela Panfiloiu, „Determinarea reziduurilor de streptomycină din mierea de albine”, *Medicamentul veterinar, Vol. 5 (1) 2011, p. 89-92***
109. M. Nita, L. Dinu, Adriana C. Mitea, “Apiterapia”, Aius Press, Craiova, 2010
110. M. Spivak, “Preventative Antibiotic Treatments for Honey Bee Colonies, *Am. Bee J.*, 140 (2000) 867-868”
111. F. Mutinelli, “Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases, *Apiacta*, 38 (2003) 149-155”
112. A. Baggio, A. Gallina, C. Benetti, F. Mutinelli, “Residues of antibacterial drugs in honey from the Italian market, *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2(1) (2009) 52-58”
113. Community Procedure for the Establishment of Maximum Residue Limits of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin, Council Regulation (EEC) No. 2377/90, European Union (1990).
114. Ž. Bargańska, J. Namieśnik, M. Ślebioda, “Determination of antibiotic residues in honey, *Trends in Analytical Chemistry*, 30(7) (2011) 1035–1041”
115. N. Moeller, E. Mueller-Seitz, O. Scholz, W. Hillen, A. Bergwerff, M. Petz, “A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a

- surface plasmon resonance biosensor, *Eur. Food Res. Technol.*, 224(3) (2007) 285-292"
116. P Edder, A Cominoli, C Corvi, "Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection, *J. Chromatogr. A.* 830(2) (1999) 345-351"
117. M. van Bruijnsvoort, S.J. Ottink, K.M. Jonker, E. de Boer, "Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1058(1-2) (2004) 137-142"
118. J.Quintana-Rizzo, S. R. Salter, J. S. Saul, "Solid Phase Extraction Procedures for Validation of CHARM II Sulfonamide, Streptomycin and Chloramphenicol positives and detection of Tzlosin in Honey, *Apiacta*, 40 (2005) 55-62"
119. H. Masakazu, S. Hiromi, N. Toshiaki, N. Junko, N. Hiroyuki, "Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Honey by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 27(5) (2005) 863-874"
120. J. R. D.Solomon, V. S.Santhi, V. Jayaraj, "Prevalence of antibiotics in nectar and honey in South Tamilnadu, India. *Integrative Biosciences*, 10 (2006)163–167"
121. R.H.M.M. Granja, A. M. Montes Niño, R.A.M. Zucchetti, R.E. Montes Niño, R. Patel, A. G. Salerno, "Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2) (2009) 64–67"
122. D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, "Confirmatory method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by LC–MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A* 29(2) (2012) 189-196"
123. Ordinul 168/16.11.2006 pentru aprobare Normei Sanitare Veterinare privind modul de prelevare al probelor destinate analizării unor contaminanți
124. Protocol de lucru Elisa Streptomicină MaxSignal
125. Gluck Andrei, „Metode Matematice în industria chimică. Elemente de optimizare”, Ed. Tehnică București, 1977
126. Adrian Waring, Claire Waring, „Manual de creștere a albinelor”, Mast,2011
127. Cristina Mateescu, "Apterapia sau cum să folosim produsele stupului pentru sănătate", FIAT LUX, 2005
128. Regulamentul (CE) Nr. 470/2009 al Parlamentului European și al Consiliului din 6 mai 2009 de stabilire a procedurilor comunitare în vederea stabilirii limitelor de reziduuri ale substanțelor farmacologic active din alimentele de origine animală
129. Ž. Bargańska, J. Namieśnik, M. Ślebioda, Determination of antibiotic residues in honey, *Trends Anal. Chem.* 30(7) (2011) 1035–1041.
130. N. Moeller, E. Mueller-Seitz, O. Scholz, W. Hillen, A. Bergwerff, M. Petz, A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor, *Eur. Food Res. Technol.* 224(3) (2007) 285-292.
131. P. Edder, A. Cominoli, C. Corvi, Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection, *J. Chromatogr. A.* 830(2) (1999) 345-351.

132. M. van Bruijnsvoort, S.J. Ottink, K.M. Jonker, E. de Boer, Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1058(1-2) (2004) 137-142.
133. J.Quintana-Rizzo, S. R. Salter, J. S. Saul, Solid Phase Extraction Procedures for Validation of CHARM II Sulfonamide, Streptomycin and Chloramphenicol positives and detection of Tzlosin in Honey, *Apiacta*, 40 (2005) 55-62.
134. H. Masakazu, S. Hiromi, N. Toshiaki, N. Junko, N. Hiroyuki, Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Honey by Liquid Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 27(5) (2005) 863-874.
135. J. R. D.Solomon, V. S. Santhi, V. Jayaraj, Prevalence of antibiotics in nectar and honey in South Tamilnadu, India. *Integrative Biosciences*, 10 (2006)163–167.
136. R.H.M.M. Granja, A. M. Montes Niño, R.A.M. Zucchetti, R.E. Montes Niño, R. Patel, A.G. Salerno, Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 637(1-2) (2009) 64–67.
137. D.A. Bohm, C.S. Stachel, P. Gowik, Confirmatory method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by LC–MS/MS, *Food Addit. Contam. Part A* 29(2) (2012) 189-196.
- 138. Monica Cristina CARA, Gabriela-Alina Dumitrel, Mirel Glevitzky, Carmen Mischie, Dana Silaghi-Perju, "Thermal Degradation of Streptomycin Residues in Honey during Storage", Food Technology and Biotechnology, Croația, 2012 (in press)**
- 139. Mirabela Panfiloiu, Monica Firczak (Cara), Delia Maria Perju, Ghiorghita Simion, "Quality control of icecream products using the HACCP method", Banat s Journal of Biotechnology, 2010, I(2), pag 61-65**