



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»**



**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΑΤΑΜΥΚΙΝΗΣ
ΣΕ ΖΥΜΩΜΕΝΑ ΓΑΛΑΤΑ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ**

**ΘΕΟΧΑΡΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΥ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.**

2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
«ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΝΑΤΑΜΥΚΙΝΗΣ
ΣΕ ΖΥΜΩΜΕΝΑ ΓΑΛΑΤΑ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

ΘΕΟΧΑΡΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΥ
ΚΤΗΝΙΑΤΡΟΣ Α.Π.Θ.

2023

Επιβλέπων: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΦΛΕΤΟΥΡΗΣ
(Καθηγητής Α.Π.Θ.)

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής: ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΗ
(Καθηγήτρια Α.Π.Θ.)

ΑΝΔΡΕΑΝΑ ΠΕΞΑΡΑ
(Αναπληρώτρια καθηγήτρια Π.Θ.)

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	V
A. Γενικό μέρος	
1. Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης	1
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση	4
2.1 Χημική δομή – Φυσικοχημικές ιδιότητες	4
2.2 Μηχανισμός δράσης	6
2.3 Ανάπτυξη αντοχής στη ναταμυκίνη	7
2.4 Θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο και στα ζώα	10
2.5 Φαρμακοκινητική (οδός χορήγησης – απορρόφηση – κατανομή – μεταβολισμός – απέκκριση)	11
2.5.1 Ζώα	11
2.5.2 Άνθρωπος	12
2.6 Τοξικότητα	12
2.6.1 Άμεση – οξεία τοξική δράση	12
2.6.2 Βραχυπρόθεσμη και υποχρόνια τοξική δράση	13
2.6.3 Μεταλλαξιγόνος δράση	14
2.6.4 Χρόνια τοξική δράση και καρκινογόνος δράση	16
2.6.5 Τοξική δράση στο αναπαραγωγικό σύστημα και στην ανάπτυξη	17
2.6.6 Τοξική δράση στον άνθρωπο	19
2.7 Εφαρμογές στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης	20
2.8 Μέθοδοι προσδιορισμού της ναταμυκίνης στα τρόφιμα	24
2.9 Νομοθεσία	24
B. Ειδικό μέρος	
3. Υλικά και μέθοδοι	26
3.1 Όργανα και αντιδραστήρια	26
3.1.1 Όργανα	26
3.1.2 Αντιδραστήρια	26
3.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ναταμυκίνης σε γιαούρτη	27
3.2.1 Εκχύλιση της ναταμυκίνης από τη γιαούρτη	27
3.2.2 Συνθήκες φασματοφωτομετρικής ανάλυσης	27
3.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης – καμπύλη αναφοράς	28
3.2.4 Επικύρωση της μεθόδου	28
3.3 Πειραματισμοί με πρότυπα διαλύματα ναταμυκίνης	28
3.3.1 Επίδραση των συνθηκών συντήρησης των διαλυμάτων στη σταθερότητα της ναταμυκίνης	28

3.4	Πειραματισμοί με ζυμωμένα γάλατα	29
3.4.1	Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης στο εκχύλισμα της γιαούρτης	29
3.4.2	Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης κατά τη συντήρηση ζυμωμένων γαλάτων στο ψυγείο	29
3.5	Πειραματισμοί με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα	30
3.6	Διερεύνηση της παρουσίας της ναταμικίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά	30
3.7	Στατιστική ανάλυση	30
4.	Αποτελέσματα και συζήτηση	30
4.1	Εκχύλιση της ναταμικίνης από τη γιαούρτη	30
4.2	Καμπύλη αναφοράς – φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3ης παραγώγου πρότυπων διαλυμάτων	32
4.3	Φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3ης παραγώγου γιαούρτης	33
4.4	Επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού ναταμικίνης σε γιαούρτη	34
4.4.1	Προσδιορισμός της ναταμικίνης σε γιαούρτη	34
4.4.2	Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικού προσδιορισμού	35
4.4.3	Ακρίβεια της μεθόδου	35
4.4.4	Επαναληψιμότητα της μεθόδου	36
4.5	Πειραματισμοί με πρότυπα διαλύματα ναταμικίνης	38
4.5.1	Επίδραση του pH και των συνθηκών συντήρησης στη σταθερότητα πρότυπων διαλυμάτων ναταμικίνης	38
4.6	Πειραματισμοί με ζυμωμένα γάλατα	40
4.6.1	Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης στο εκχύλισμα της γιαούρτης	40
4.6.2	Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης κατά τη συντήρηση ζυμωμένων γαλάτων στο ψυγείο	42
4.7	Πειραματισμοί με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα	43
4.8	Διερεύνηση της παρουσίας της ναταμικίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά	47
5.	Συμπεράσματα	53
	Περίληψη	55
	Summary	56
	Βιβλιογραφία	57
	Παράρτημα	65

Ευχαριστίες

Το πρώτο ευχαριστώ δικαιωματικά το οφείλω στον κ. Δημήτριο Φλετούρη, καθηγητή του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, για την αμέριστη στήριξη και την πολύπλευρη συμπαράστασή του, καθώς και για τη διαρκή επιστημονική καθοδήγηση σε κάθε στάδιο αυτού του εγχειρήματος. Οι υψηλές απαιτήσεις του και οι καίριες παρατηρήσεις του, στο πλαίσιο των πειραματικών συναντήσεων μας στο Εργαστήριο Ασφάλειας και Ποιότητας του Γάλακτος και των Προϊόντων του, στον Τομέα Υγιεινής και Τεχνολογίας Τροφίμων Ζωικής Προελεύσεως, του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Α.Π.Θ, αποτέλεσαν σημαντικό κίνητρο για την αύξηση της ακαδημαϊκής απόδοσης και τη βελτίωση του τρόπου συγγραφής της παρούσας διατριβής. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεργασία που είχαμε, τόσο σε επίπεδο επιστημονικό όσο και σε επίπεδο ανθρώπινων σχέσεων. Αποτελεί για μένα υπόδειγμα Ανθρώπου και Επιστήμονα.

Επιθυμώ να εκφράσω θερμές και ειλικρινείς ευχαριστίες και στην συνεπιβλέπουσα καθηγήτρια του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης κα Μαρία Παπαγιάννη, η συμβολή της οποίας υπήρξε καθοριστική για την ποιοτική αναβάθμιση και ολοκλήρωση της διατριβής. Την ευχαριστώ για την επιστημονική στήριξη που αφειδώς μου παρείχε, για τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσε και για τη σχολαστικότητα και την επιμέλεια με την οποία έσκυψε πάνω από την ερευνητική μου εργασία.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω το έτερο μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, αναπληρώτρια καθηγήτρια του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κα Ανδρέα Πεξαρά, για την πρόθυμη συμβολή και βοήθεια της στην προσπάθεια ολοκλήρωσης αυτού του εγχειρήματος.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου διατριβής, βεβαίως, θα ήταν κυριολεκτικά αδύνατη χωρίς την υλική, ηθική και έμπρακτη συμπαράσταση της οικογένειάς μου, στην οποία και αφιερώνεται η παρούσα διατριβή. Θα ήθελα να εκφράσω τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου στους γονείς μου, Νίκο και Τζένη, οι οποίοι δέχτηκαν με μεγάλη χαρά και στήριξαν την επιθυμία μου για συνέχιση των σπουδών μου. Για τη σημαντική επιρροή που άσκησε πάνω μου, ευχαριστώ τον αδερφό μου Κωνσταντίνο, καθώς και για την αδιαπραγμάτευτη αγάπη του και τη βαθιά πίστη του σε μένα.

Τέλος, οφείλω βαθιά ευγνωμοσύνη στους αγαπημένους κοντινούς μου ανθρώπους, Ελένη, Βάϊο και Κώστα που έκαναν το ταξίδι μου πιο εύκολο, και που τους παρέσυρα μαζί μου σε αυτή την ευχάριστη περιπέτεια.

A. Γενικό μέρος

1. Εισαγωγή – Σκοπός της μελέτης

Η ναταμυκίνη, γνωστή και ως πιμαρικήνη, είναι ένα αμφοτερικό πολυενικό μακρολιδικό αντιμυκητιακό που παράγεται από ζύμωση στελεχών ακτινομυκήτων, όπως του *Streptomyces natalensis*, *S. chattanogenesis* και από άλλα είδη του γένους *Streptomyces* (Davidson and Doan 2020). Η ναταμυκίνη δεν παρουσιάζει δράση έναντι των βακτηρίων ή ιών, αλλά ελέγχει αποτελεσματικά την ανάπτυξη σχεδόν όλων των μυκήτων, όπως *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp. και *Penicillium* spp (Raab et al. 1972, He et al. 2019). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση θεωρείται φυσικό συντηρητικό και φέρει ετικέτα με τον αριθμό E235 (EFSA 2009). Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (ΚΤΠ 2011) και σε εναρμόνιση με τον Κανονισμό 1333/2008/EK (Council Regulation 2008), η ναταμυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την επιφανειακή επεξεργασία σκληρών, ημισκληρών και ημιμαλακών τυριών καθώς και των αποξηραμένων, ωριμασμένων αλλαντικών, σε μέγιστο επίπεδο 1 mg/dm² επιφάνειας, με την προϋπόθεση να μην ανιχνεύεται σε βάθος 5 mm.

Λόγω της εκλεκτικής της δράσης, χρησιμοποιείται ως βιοσυντηρητικό σε τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση από βακτήρια, καθώς δεν παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση, αλλά έχει θετική αντιμυκητιακή δράση έναντι επιμολύνσεων από ζύμες και μυκηλιακούς μύκητες (Delves-Broughton and Weber 2011). Η ναταμυκίνη είναι, επιπλέον, αποτελεσματική σε χαμηλές συγκεντρώσεις, έχει ευρέως φάσματος αντιμυκητιακή δράση, δεν έχει πρόβλημα ανάπτυξης αντοχής, δεν έχει αρνητική επίδραση στην ποιότητα των προϊόντων και έχει παρατεταμένο χρόνο δράσης (Stark 2003, Jay et al. 2005). Η ναταμυκίνη, λόγω του αμφοτερικού της χαρακτήρα, έχει χαμηλή διαλυτότητα στους περισσότερους διαλύτες. Σε ακραίες τιμές pH, υψηλές ή χαμηλές, η ναταμυκίνη γίνεται πλήρως διαλυτή. Αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βελτιστοποίηση ή τον έλεγχο της διαθεσιμότητας της δραστικής ναταμυκίνης. Ένα τέτοιο διάλυμα θα μπορούσε να φανεί χρήσιμο σε περιπτώσεις ακραίας επιμόλυνσης, αλλά υπό κανονικές συνθήκες υγιεινής, αυτή η προσέγγιση δεν είναι εφαρμόσιμη ούτε έχει κάποια πρακτική αξία (Lule et al. 2016).

Για τους παραπάνω λόγους οι βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιούν τη ναταμυκίνη, σύννομα ή όχι, για τη συντηρητική της δράση σε τρόφιμα όπως τυρί,

λουκάνικα, γιαούρτια, χυμούς και κρασιά και γενικώς σε προϊόντα ζύμωσης. Συνήθως, προτιμάται έναντι των άλλων συντηρητικών, καθώς δεν έχει οσμή ή χρώμα και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων για περισσότερα από 50 χρόνια (Dalhoff and Levy 2015, Davidson and Doan 2020).

Τα εμπορικά παρασκευάσματα παράγονται με ζύμωση του *S. natalensis* ή του *S. gilvosporus* σε ένα μέσο που περιέχει μία πηγή άνθρακα (συνήθως άμυλο ή μελάσα) και μια πηγή ζυμώσιμου αζώτου (συνήθως υγρό αραβοσίτου, καζείνη, ή σόγια). Η ζύμωση είναι αερόβια. Η μηχανική ανάδευση και οι αντιαφριστικοί παράγοντες μπορούν να ενισχύσουν τη διαδικασία. Το εύρος θερμοκρασίας είναι 26–30°C και το εύρος pH είναι 6–8. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητας, η ναταμικίνη θα συσσωρευτεί κυρίως με τη μορφή κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι μπορούν, στη συνέχεια, να εξαχθούν μετά από διαχωρισμό της βιομάζας με εκχύλιση με διαλύτη και ακολουθεί ξήρανση. Ο *S. natalensis* απουσιάζει από το τελικό προϊόν. Αυτό συμβαίνει επειδή κατά τη διαδικασία εκχύλισης η ναταμικίνη διαλύεται και διηθείται μέσω μιας μεμβράνης που δεν είναι διαπερατή στον μικροοργανισμό και η συγκέντρωση του διαλύτη είναι αρκετά υψηλή ώστε να τον σκοτώσει. Το τελικό προϊόν είναι μια λευκή έως υποκίτρινη, άοσμη και άγευστη κρυσταλλική σκόνη (Struyk et al. 1958, Farid et al. 2000, Delves-Broughton and Weber 2011). Τα περισσότερα σκευάσματα διατίθενται στην αγορά σε τέσσερις τύπους: καθαρή ναταμικίνη και 50% σκευάσματα ναταμικίνης με έκδοχα λακτόζη, γλυκόζη ή αλάτι. Τα πιο γνωστά εμπορικά διαθέσιμα παρασκευάσματα είναι Natamax® (Danisco, Δανία), Delvacid® (DSM, Ολλανδία), Natacyn® (εμπορικές ονομασίες ΗΠΑ και Καναδά), Miconacina (μεξικανική επωνυμία) και Silver Elephant Natamycin (Zhe Silverjiang Elephant Bioengineering Co., Ltd., Κίνα) (Lule et al. 2016). Η Royal Netherlands Fermentation Industries, Ltd., ιδρύθηκε ως τμήμα των εργαστηρίων Gist-brocades, όπου ανακαλύφθηκε η ναταμικίνη και κατέχει την πρώτη και τη δεύτερη πατέντα από την American Cyanamid Corporation. Και οι δύο πατέντες περιγράφουν παρόμοια μέθοδο (Εικόνα 1) για την παραγωγή ναταμικίνης. Και στις δύο περιπτώσεις, η βουτανόλη χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση της ναταμικίνης από τον ζωμό καλλιέργειας, μετά από οξίνιση σε pH 3,0 ακολουθούμενη από διαφορετικά στάδια, δηλαδή καθίζηση, εκχυλίσεις και ξήρανση με ψεκασμό για να ληφθεί το τελικό προϊόν (Meena et al. 2021).

Η ναταμικίνη ανακαλύφθηκε από τον Struyk το 1955 που χαρακτηριστικά γράφει ότι «ένα νέο κρυσταλλικό αντιβιοτικό απομονώθηκε από τον ζωμό ζύμωσης της καλλιέργειας των ειδών *Streptomyces*, από δείγμα εδάφους που ελήφθη κοντά στο Pietermaritzburg, στην Πολιτεία Νατάλ, της Νοτιο-Αφρικανικής Ένωσης. Ο οργανισμός

που το φτιάχνει ονομάστηκε *S. natalensis*». Αρχικά ονομάστηκε πιμαρική για να τιμήσει το Pietermaritzburg. Μετονομάστηκε, μετά από εντολή του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, σύμφωνα με τον οποίο τα αντιβιοτικά που παράγονται από *Streptomyces* θα καταλήγουν σε -μυκίνη και το όνομα ναταμυκίνη προέκυψε αναφορικά με το όνομα του είδους *natalensis* (Struyk et al. 1958). Άλλες ονομασίες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν είναι πιμαρισίνη, τεννεκίνη, A-5283 και άλλες εμπορικές ονομασίες (Thomas and Delves-Broughton 2003). Το 1959 απομονώθηκε, επίσης, ένα αντιβιοτικό από καλλιέργεια ενός στελέχους *Streptomyces*. Αυτό το στέλεχος προερχόταν από δείγμα εδάφους στο Chattanooga, Tennessee. Ως αποτέλεσμα, το στέλεχος και το αντιβιοτικό ονομάστηκαν *S. chattanoogensis* και τεννεκίνη. Μετά από αναλυτικές μελέτες και βιολογική ανάλυση της ουσίας, αναφέρθηκε ότι η τεννεκίνη ήταν παρόμοια με την προηγουμένως γνωστή ναταμυκίνη (Raab 1972). Επομένως, το όνομα τεννεκίνη αντικαταστάθηκε από ναταμυκίνη.



Εικόνα 1. Διάγραμμα ροής της παραγωγής ναταμυκίνης.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να υποδειχθεί μια απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε ζυμωμένα γάλατα (γιαούρτη, κεφίρ, ξινόγαλα) και μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (ρυζόγαλο, κρέμα), και η διερεύνηση, στη συνέχεια, της παρουσίας της σε γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται και κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά.

Έχοντας υπόψη τις δυνατότητες που μπορεί να προσφέρει η διαφορική φασματοφωτομετρία στον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε τυριά, θα αναπτύξουμε μια νέα μεθοδολογία η οποία θα επιτρέπει σε σύντομο χρονικό διάστημα και με απλούς χειρισμούς την εκχύλιση της ναταμυκίνης από τα γαλακτοκομικά προϊόντα και τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

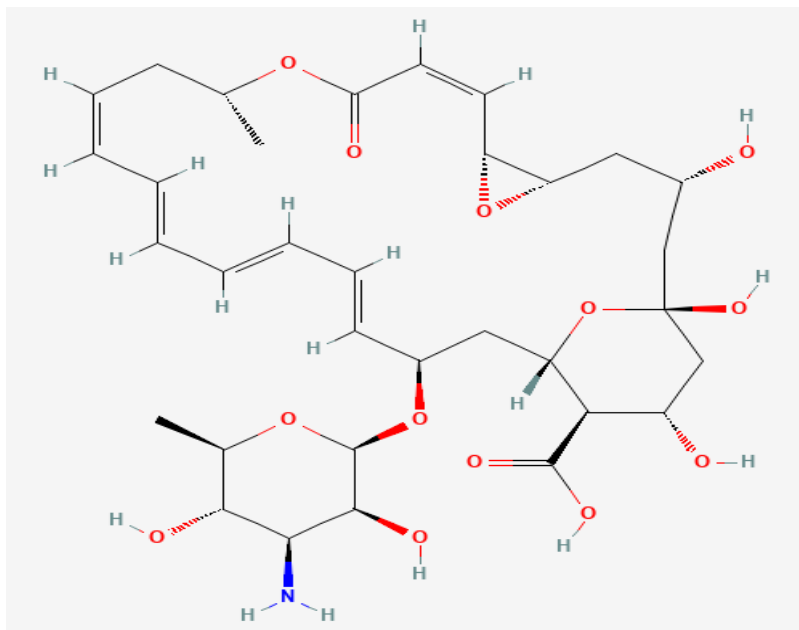
2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση

2.1 Χημική δομή – Φυσικοχημικές ιδιότητες

Δομικά, η ναταμυκίνη, ως πολυενικό αντιμυκητιακό, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενός μακροκυκλικού δακτυλίου λακτόνης που περιέχει μια σειρά συζυγών διπλών δεσμών στη μία πλευρά του μορίου και έναν αριθμό υδροξυλομάδων στην αντίθετη πλευρά (Εικόνα 2). Ο δακτύλιος λακτόνης αποτελείται από 25 άτομα άνθρακα. Έτσι η ναταμυκίνη ταξινομείται ως μακρολιδικό αντιβιοτικό συνδεδεμένο με ένα τμήμα μυκοζαμίνης (3-αμινο-3,6-διδεοξυ-d-μαννόζη) μέσω ενός δεσμού αιθέρα (EFSA 2009). Το τμήμα μυκοζαμίνης είναι ένας εξαμελής δακτύλιος πυρανόζης που υπάρχει στη θέση C15. Η ναταμυκίνη ταξινομείται επίσης ως αντιβιοτικό τετραενίου επειδή αποτελείται από 4 συζυγείς διπλούς δεσμούς. Η ομάδα μυκοζαμίνης και η ομάδα καρβοξυλίου, καθορίζουν τις αμφοτερικές ιδιότητες της ναταμυκίνης (Hamilton-Miller 1973) Το μοριακό βάρος της ναταμυκίνης είναι 665,75 με εμπειρικό τύπο $C_{33}H_{47}NO_{13}$. Ο αριθμός μητρώου CAS είναι 7681-93-8. Το ισοηλεκτρικό σημείο της ναταμυκίνης είναι 6,5 (Brik 1981).

Η διαλυτότητα της ναταμυκίνης είναι πολύ χαμηλή σε νερό, 20-50 mg/L, αλλά είναι διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες (Davidson and Doan 2020). Η σταθερότητα της ναταμυκίνης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, η θερμοκρασία, η πίεση, το pH, το φως (UV και φθορίζον φως), η θερμοκρασία, η οξείδωση, τα βαρέα μέταλλα κ.λπ. (Meena et al. 2021). Η ναταμυκίνη έδειξε την υψηλότερη διαλυτότητα σε 75% υδατικό διάλυμα μεθανόλης σε pH 2,0, θερμοκρασία 30°C και πίεση 1 atm (Zeng et al. 2019). Οι Luo et al. (2008) αναφέρουν ότι η θέρμανση αυξάνει άμεσα τη διαλυτότητα της ναταμυκίνης στην ισοπροπανόλη και τη μεθανόλη. Η διαλυτότητά της στο νερό και η σταθερότητά της μπορούν να βελτιωθούν αποτελεσματικά με την ενθυλάκωση της ναταμυκίνης σε ένα σύμπλοκο μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνης, χωρίς να διακυβεύεται το αντιμυκητιακό της δυναμικό (Fang et al. 2019). Η ναταμυκίνη ή το εναιώρημά της παραμένει σταθερό μετά από θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία, ακόμη και μετά από συνεχή θέρμανση στους 100°C για αρκετές ώρες, με

μικρή μόνο υποβάθμιση της αντιμυκητιακής της δράσης. Πλήρης αδρανοποίηση της αντιμυκητιακής της δράσης παρατηρήθηκε μετά από θέρμανση στους 121°C για 30 λεπτά (Gao et al. 2010).



Εικόνα 2. Δυσδιάστατη απεικόνιση ναταμυκίνης- National Center for Biotechnology Information (2023).

Η ναταμυκίνη αποσταθεροποιείται σε χαμηλές τιμές pH και σχηματίζει μυκοζαμίνη λόγω της υδρόλυσης του γλυκοσιδικού δεσμού (Brick 1976). Ο λακτονικός δακτύλιος της ναταμυκίνης σαπωνοποιείται σε υψηλό pH, με αποτέλεσμα το σχηματισμό βιολογικά ανενεργού ναταμυκοϊκού οξέος (Brik 1981). Η αντιμυκητιακή δράση του διαλύματος ναταμυκίνης (50 ppm) θα μπορούσε να υποβαθμιστεί με έκθεση σε οξύ (8,62%), αλκάλια (9,18%) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (24,13%) για 4 ώρες (Chaudhari and Chhabra 2014). Ένα υδατικό διάλυμα ναταμυκίνης (20 mg/L) αποσταθεροποιήθηκε πλήρως με έκθεση σε φωτισμό φθορισμού 1000 lux για 24 ώρες στους 4°C. Από την άλλη πλευρά, ένα υδατικό διάλυμα ναταμυκίνης (20 mg/L) ήταν σταθερό έως και 14 ημέρες όταν αποθηκεύτηκε σε σκοτεινές συνθήκες στους 4°C (Koontz et al. 2003). Επιπλέον, η επίδραση του υπεριώδους φωτός και των ακτινοβολιών γάμμα προκαλεί διάσπαση της ναταμυκίνης, με αποτέλεσμα την απώλεια της δομής του τετραενίου. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία για 99 λεπτά και στο φως φθορισμού για 10 ημέρες μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή και την αδρανοποίηση της ναταμυκίνης (Gao et al. 2010). Η ναταμυκίνη είναι επίσης ευαίσθητη στην ακτινοβολία γάμμα (Meena et al. 2021). Από τη διάσπαση της ναταμυκίνης με τους παραπάνω τρόπους παράγονται, μεταξύ άλλων, μυκοζαμίνη ως κύριο προϊόν,

αποναταμυκίνη και διναταμυκινολιδοδιόλη ως προϊόντα διάσπασης. Η οξεία τοξικότητα αυτών των προϊόντων διερευνήθηκε και είναι σε ακόμη υψηλότερη δόση (με βάση τις τιμές LD₅₀) από την ίδια τη ναταμυκίνη (βλ. τοξικότητα). Η ναταμυκίνη αδρανοποιείται από χλώριο, θειώδη, υπεροξειδία, αντιοξειδωτικά και σουλφοξυλική φορμαλδεΐδη νατρίου, τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως καθαριστικά (Lule et al. 2016).

Όσον αφορά τη χρήση της στα τρόφιμα, λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της στο νερό, η ναταμυκίνη κατά την επιφανειακή επεξεργασία του τροφίμου (π.χ. τυριού) δεν μεταναστεύει στο εσωτερικό του, παραμένει στην επιφάνεια και έτσι διατηρεί τη συντηρητική της δράση. Ωστόσο, η ευαισθησία της ναταμυκίνης μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τον τρόπο συντήρησης του τροφίμου. Γενικά, αν το προϊόν εκτίθεται στο φως κατά τη λιανική πώληση και τη μεταφορά, προκαλείται διάσπαση της ναταμυκίνης, με αποτέλεσμα τη μείωση της συντηρητικής της δράσης (Thoma and Kubler 1998). Η ναταμυκίνη δρα σε μεγάλο εύρος pH (3-9). Καθώς τα περισσότερα τρόφιμα έχουν τιμή pH μεταξύ 4 και 7, αυτό καθιστά τη ναταμυκίνη ένα πολύ ευπροσάρμοστο συντηρητικό τροφίμων (Thomas and Delver-Broughton 2003, Stark 2004).

2.2 Μηχανισμός δράσης

Η ναταμυκίνη αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική έναντι των ζυμομυκήτων, και των νηματοειδών μυκητιακών παθογόνων, αλλά ανενεργή έναντι βακτηρίων και ιών (Hsiao et al. 2014). Η ελάχιστη δόση που απαιτείται για την αναστολή της ανάπτυξης των παθογόνων, ορίζεται ως ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC). Στην περίπτωση της ναταμυκίνης, συγκεντρώσεις 0,5–6,0 µg/mL και 1,0–5,0 µg/mL είναι επαρκείς για την αναστολή της ανάπτυξης των ζυμών και μυκηλιακών μυκήτων, αντίστοιχα (Branen et al. 2005).

Η δράση της ναταμυκίνης έναντι των μυκήτων εξαρτάται από την ύπαρξη εργοστερόλης στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η εργοστερόλη παίζει κρίσιμο ρόλο στην παροχή επιλεκτικών θέσεων δέσμευσης για τη ναταμυκίνη, καθώς είναι η κύρια στερόλη στις μεμβράνες των μυκήτων. Λόγω της υψηλής συγγένειας με την εργοστερόλη, η ναταμυκίνη συνδέεται αμετάκλητα μαζί της στην κυτταρική μεμβράνη του μύκητα και σχηματίζει ένα σύμπλεγμα πολυενίου-στερόλης. Αυτό το σύμπλεγμα μεταβάλλει τη διαπερατότητα της μεμβράνης, προκαλώντας ταχεία διαρροή βασικών ιόντων και μικρών πεπτιδίων, με αποτέλεσμα τη διακοπή της ανάπτυξης του μύκητα (Munn et al. 1999). Γενικά, οι ζύμες είναι πιο ευαίσθητες από τους υπόλοιπους μύκητες (Te Welscher et al. 2012). Η ναταμυκίνη έχει ένα μεγάλο δακτύλιο λακτόνης με μια άκαμπτη λιπόφιλη

αλυσίδα, που περιέχει συζυγείς διπλούς δεσμούς, και ένα εύκαμπτο υδρόφιλο τμήμα που φέρει πολλές υδροξυλομάδες. Η υδρόφοβη περιοχή συνδέεται με την εργοστερόλη στη μεμβράνη σχηματίζοντας έναν πολικό πόρο μέσω του οποίου μικρά ιόντα όπως K^+ , H^+ , αμινοξέα και άλλοι μεταβολίτες μπορούν να περάσουν ελεύθερα, διαταράσσοντας τον ιοντικό έλεγχο του κυττάρου και σκοτώνοντας το κύτταρο (Hamilton-Miller 1973, Deacon 1997). Είναι μοναδική η δράση της σε σχέση με άλλα αντιμυκητιακά επειδή δεν προκαλεί άμεσα διαπερατότητα της μεμβράνης (Te Welscher et al. 2008, Van Leeuwen et al. 2009).

Τα βακτήρια δεν είναι ευαίσθητα σε αυτά τα αντιβιοτικά επειδή οι μεμβράνες τους στερούνται στερολών και επομένως είναι φυσικά ανθεκτικά στη ναταμυκίνη. Οι αναφερόμενες ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MIC) της ναταμυκίνης για βακτήρια είναι υψηλότερες από 250 mg/L. Οι μεμβράνες των ζωικών κυττάρων έχουν τη χοληστερόλη ως κύρια στερόλη, για την οποία η ναταμυκίνη έχει πολύ χαμηλότερη ειδικότητα σε σχέση με την εργοστερόλη (Athar and Winner 1971, EFSA 2009).

2.3 Ανάπτυξη ανοχής στη ναταμυκίνη

Σχετικά με την πιθανή ανάπτυξη ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών από τη χρήση ναταμυκίνης ως πρόσθετο τροφίμων, η EFSA (2009) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σχετικός κίνδυνος. Αφενός τα βακτήρια της γαστρεντερικής χλωρίδας του ανθρώπου δεν επηρεάζονται από τη δράση των υπολειμμάτων ναταμυκίνης της τροφής, αφετέρου οι μύκητες αποτελούν πολύ μικρό ποσοστό της συνολικής χλωρίδας (μόλις 0,001%) για να θεωρηθεί σημαντική η συνέπεια της έκθεσής τους.

Η παρατεταμένη χρήση αντιμικροβιακών ουσιών ενέχει τον κίνδυνο προσαρμογής των μικροοργανισμών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις των ουσιών αυτών. Στην περίπτωση της ναταμυκίνης, είναι γνωστό ότι ορισμένα είδη και ορισμένα στελέχη έχουν χαμηλή φυσική ευαισθησία, όπως φαίνεται για παράδειγμα για το γένος *Aspergillus* (Lalitha et al. 2011). Αυτό πιθανότατα συμβαίνει επειδή δεν επιτυγχάνονται υψηλές συγκεντρώσεις ή και λόγω περιορισμένης πρόσβασης των ενώσεων στον πρωτεύοντα στόχο της κυτταρική μεμβράνης, την εργοστερόλη (Te Welscher et al. 2008, Van Leeuwen et al. 2009). Επιπλέον, η ευαισθησία των μυκητιακών κυττάρων στα φάρμακα εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της στερόλης στην κυτταρική τους μεμβράνη (Littman et al. 1958, Molzahn and Woods 1972, Subden et al. 1977). Οι Athar and Winner (1971) αναφέρουν ότι η πρόκληση ανθεκτικότητας στη ναταμυκίνη σε μύκητες είναι δύσκολη. Παρατήρησαν ότι οι μύκητες στους οποίους κατάφεραν να προκαλέσουν

ανθεκτικότητα εμφανίζουν πάντα μειωμένους ρυθμούς μεταβολισμού και ανάπτυξης *in vitro*. Ωστόσο, σε απουσία πολυενίων επανέρχονται εύκολα στον κανονικό τους μεταβολισμό, ανάπτυξη και ευαισθησία στη ναταμυκίνη. Επιπλέον, η αντοχή που παρουσίαζαν οι μύκητες, φάνηκε να οφείλεται στη φυσική επιλογή πιο ανθεκτικών στελεχών και όχι σε προσαρμογή τους.

Οι ανθεκτικές καλλιέργειες είχαν μειωμένη παθογένεια (Ziogas et al. 1983). Όσον αφορά στην ανθεκτικότητα στα πολυενικά αντιμυκητιακά, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Candida* που είναι ανθεκτικά στη νυστατίνη περιέχουν λιγότερη εργοστερόλη από τα ευαίσθητα (Athar and Winner 1971, Safe et al. 1977).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι υπάρχει πιθανός κίνδυνος ανάπτυξης αντοχής στη μυκητιακή χλωρίδα του ανθρώπου ως συνέπεια της παρατεταμένης, επαναλαμβανόμενης εφαρμογής της ναταμυκίνης. Ωστόσο, σχετικές μελέτες δείχνουν ότι το επίπεδο αντίστασης θα ήταν χαμηλό. Για να προκληθεί αντοχή του *C. albicans* στη ναταμυκίνη, χρειάστηκαν 25 περάσματα από Sabouraud Maltose άγαρ με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναταμυκίνης. Αυτή η ανθεκτικότητα αναπτύχθηκε σταδιακά και το MIC αυξήθηκε από 2,5-12 σε 12-50 mg/L (Hejzlar and Výmola 1970).

Το Delvocid, ένα παρασκεύασμα που περιέχει 50% ναταμυκίνης, χρησιμοποιήθηκε για περισσότερα από 20 χρόνια για τη συντήρηση τυριού και λουκάνικων (Jay 1996). Έρευνες σε αποθήκες τυριού και σε εργοστάσια ξηρών αλλαντικών, όπου το Delvocid είχε χρησιμοποιηθεί για 9 χρόνια, δεν έδειξαν καμία αλλαγή στη σύνθεση ή την ευαισθησία της μυκητιακής χλωρίδας (de Boer et al. 1979, Hoekstra and Van der Horst 1998). Οι de Boer and Stolk-Horsthuis (1977) απομόνωσαν ζύμες και μύκητες από διάφορες αποθήκες τυριών στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η ναταμυκίνη. Σε όλους τους μύκητες που απομονώθηκαν, εκτός από έναν, προκλήθηκε αναστολή της ανάπτυξης με χαμηλές συγκεντρώσεις ναταμυκίνης (0,5-8,0 μg/mL). Σε εργαστηριακά πειράματα που προορίζονται να προκαλέσουν αντοχή στη ναταμυκίνη σε στελέχη που απομονώθηκαν από αποθήκες τυριού, προέκυψε ότι μετά από 25-30 διόδους σε μέσα που περιέχουν αυξανόμενες συγκεντρώσεις ναταμυκίνης κανένα από τα στελέχη δεν είχε γίνει λιγότερο ευαίσθητο στη ναταμυκίνη, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 1 (de Boer and Stolk-Horsthuis 1977).

Η χρήση της ναταμυκίνης ως αντιμυκητιακό συντηρητικό στα τρόφιμα μπορεί να οδηγήσει σε ίχνη αντιμικροβιακών καταλοίπων που αλληλεπιδρούν με την ενδογενή μικροχλωρίδα. Η εντερική μικροχλωρίδα κυριαρχείται από βακτηριακά είδη, ενώ τα είδη ζυμών και μυκήτων αποτελούν μόνο το 0,001% της συνολικής χλωρίδας (Bernhardt

1998, Cerniglia and Kotarski 1999). Καθώς τα βακτήρια δεν επηρεάζονται από τα πολυένια και οι μύκητες εντοπίζονται σε μικρές ποσότητες στον εντερικό σωλήνα, οι συνέπειες της έκθεσης σε ίχνη ναταμυκίνης, που έχουν καταναλωθεί με την τροφή, μπορούν να θεωρηθούν ελάχιστες.

Πίνακας 1. Αντοχή στη ναταμυκίνη στελεχών που απομονώθηκαν από αποθήκες τυριών

Στέλεχος	Αριθμός διόδων	MIC Ναταμυκίνης ($\mu\text{g/mL}$)	
		Αρχικά	Μετά τη δίοδο
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	30	8	10
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	30	8	10
<i>Penicillium chrysogenum</i> Westling	31	2	2
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	25	4	1
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	30	8	12
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vr.	30	2	2
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	25	4	2
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling)	31	2	2
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	25	2	1
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	29	6	10
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling)	31	2	2
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling)	31	2	2
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vr.	27	2	6
<i>Penicillium citreo-viride</i> Biourge	28	4	4
<i>Penicillium verrucosum</i> Dierckx var. <i>cyclopium</i> (Westling)	25	4	2
<i>Penicillium brevi-compactum</i> Dierckx	30	4	2
<i>Beauveria alba</i> (Limber) Saccas	23	8	4
<i>Penicillium roseo-purpureum</i> Dierckx	29	8	10
<i>Scopulariopsis asperula</i>	25	8	4
<i>Penicillium cf. lividum</i> Westling	25	4	2
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	25	4	2
<i>Acremomium sclerotigenum</i>	23	8	8
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	30	8	10
<i>Penicillium viridicatum</i> Westling	29	8	12
<i>Penicillium nigricans</i> (Bain.) Thom	30	4	2
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	25	2	2

Πηγή: JECFA (2002).

Συνοψίζοντας, ακόμη και μετά από δεκαετίες συνεχούς χρήσης της ναταμυκίνης ως συντηρητικού, δεν αναφέρθηκε ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε μύκητες, κάτι που είναι αρκετά αξιοσημείωτο σε σύγκριση με άλλα συντηρητικά. Γενικά, οι ζύμες είναι λιγότερο ανθεκτικές (MIC κάτω από 5 ppm) σε σχέση με τους μυκηλιακούς μύκητες (MIC πάνω από 10 ppm). Η πιθανότητα ανθεκτικότητας στη ναταμυκίνη μπορεί να προκύψει σε μεταλλαγμένους μύκητες με μικρή ποσότητα εργοστερόλης ή χωρίς εργοστερόλη, που είναι απίθανο να επιβιώσουν ελεύθεροι στη φύση. Οι προσπάθειες πρόκλησης ανοχής στη ναταμυκίνη σε μύκητες δεν ήταν επιτυχημένες. Μέχρι σήμερα, η μέγιστη ανοχή στη ναταμυκίνη παρατηρείται στο *P. discolor* (Frisvad et al. 1997, Stark 2003). Αν και έχει αποδειχθεί ότι η ναταμυκίνη δεν έχει τοξικές επιδράσεις ακόμη και σε υψηλά επίπεδα πρόσληψης, η εφαρμογή της ως πρόσθετο τροφίμων είναι περιορισμένη, λόγω του πιθανού κινδύνου πρόκλησης ανθεκτικότητας (Lule et al. 2016). Εξάλλου, η ομάδα της EFSA για τα πρόσθετα τροφίμων καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η ναταμυκίνη απορροφάται ελάχιστα και επομένως δεν αποτελεί τοξικό κίνδυνο για τον καταναλωτή (EFSA 2009).

2.4 Θεραπευτικές εφαρμογές στον άνθρωπο και στα ζώα

Αν και τα φάρμακα που περιέχουν ναταμυκίνη χρησιμοποιήθηκαν αρχικά σε πολλές χώρες για τη θεραπεία από κοινές μυκητιακές λοιμώξεις, έχουν καταστεί πλέον σχεδόν παρωχημένα. Σε ορισμένες χώρες, η ναταμυκίνη εξακολουθεί να χρησιμοποιείται. Ωστόσο, οι παγκόσμιες πωλήσεις ναταμυκίνης για φαρμακευτική χρήση, όπως καταγράφηκε από το IMS Health (MIDAS), παρουσίασαν μείωση 39% μεταξύ των ετών 1997 και 2000 (JECFA 2002). Η εγκυκλοπαίδεια φαρμάκων Martindale δεν παρουσιάζει νέες προσθήκες στην ενότητα χρήσεων της ναταμυκίνης από το 1972 έως το 2002 (Martindale 1972, 1977, 1989, 2002). Η μόνη σημαντική εναπομείνασα ανθρώπινη θεραπευτική χρήση της περιορίζεται στην τοπική θεραπεία μυκητιακών λοιμώξεων του κερατοειδούς και στην πρόληψη τέτοιων λοιμώξεων κυρίως σε χρήστες φακών επαφής, ενώ στην κτηνιατρική χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενειών όπως η δερματοφυτίαση σε άλογα και βοοειδή (EMA 1998). Ωστόσο, η εφαρμογή της ναταμυκίνης είναι ευρέως γνωστή και στη βιομηχανία ζωοτροφών πουλερικών για τον έλεγχο της ασθένειας που προκαλείται από τον *Aspergillus* χωρίς να παρεμβαίνει στην απόδοση ανάπτυξης των κρεοπαραγωγών ορνίθων (Meena et al. 2021).

2.5 Φαρμακοκινητική (οδός χορήγησης – απορρόφηση – κατανομή – μεταβολισμός – απέκκριση)

2.5.1 Ζώα

Διερευνήθηκε η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός, η απέκκριση και τα κατάλοιπα σε ιστούς της επισημασμένης με C-14 ναταμυκίνης σε επίμυες και σε μικρότερο βαθμό σε σκύλους, με τη μέθοδο της αυτοραδιογραφίας (EFSA 2009).

Στους επίμυες το πιο χρήσιμο εύρημα ήταν ότι λιγότερο από 5-7% της συνολικής ραδιενεργού δόσης απορροφήθηκε μετά τη χορήγηση από το στόμα της C-14 ναταμυκίνης και περίπου το 90% της χορηγούμενης δόσης διήλθε από τον γαστρεντερικό σωλήνα χωρίς να απορροφηθεί και αποβλήθηκε με τα κόπρανα. Κατά την πρώτη ώρα χορήγησης, η C-14 ναταμυκίνη συγκεντρώθηκε αποκλειστικά στον οισοφάγο, το στομάχι και το λεπτό έντερο. Την 2^η ώρα υπήρχε κάποια ποσότητα και στο τυφλό έντερο και στις 4 ώρες έφτασε στο κόλον. Στις 8 ώρες, συγκεντρώθηκε στο έντερο, αλλά το στομάχι εξακολουθούσε να περιέχει ραδιενεργό υλικό. Στις 24 ώρες, η ραδιενέργεια στο γαστρεντερικό σωλήνα βρέθηκε να έχει μειωθεί σημαντικά και η μεγαλύτερη συγκέντρωση σημειώθηκε στο τυφλό έντερο και το κόλον. Ραδιενέργεια εξακολουθούσε να ανιχνεύεται στο στομάχι και όχι στο λεπτό έντερο. Μετά τη χορήγηση από το στόμα, το μεγαλύτερο μέρος της C-14 ναταμυκίνης αποβλήθηκε με τα κόπρανα εντός 24 ωρών. Ίχνη ραδιενέργειας στο ήπαρ, τα νεφρά και τον λιπώδη ιστό ήταν ορατά μόνο μετά από εξαιρετικά μακροχρόνιες εκθέσεις (150 ημέρες), γεγονός που ήταν ενδεικτικό μιας εξαιρετικά χαμηλής απορρόφησης ναταμυκίνης από το γαστρεντερικό σωλήνα (EFSA 2009).

Αντίστοιχα, στους σκύλους χορηγήθηκαν τρεις διαφορετικές μορφές επισημασμένης ναταμυκίνης. Μετά τη χορήγηση από το στόμα, το μεγαλύτερο μέρος της ραδιενεργής ναταμυκίνης αποβλήθηκε με τα κόπρανα εντός 24 ωρών, ενώ λιγότερο από το 4% της συνολικής δόσης αποβλήθηκε με τα ούρα. Στους σκύλους, μετά την από του στόματος χορήγηση C-14 ναταμυκίνης, η ραδιενέργεια εντοπίστηκε κυρίως στα κόπρανα. Πολύ μικρά ποσοστά της χορηγούμενης δόσης ανιχνεύτηκαν στα ούρα. Δεν εμφανίστηκαν ουσιαστικές διαφορές είτε η C-14 ναταμυκίνη χορηγήθηκε μέσω κάψουλας, ως εναιώρημα ή μέσω τυριού. Εάν η παρουσία της ραδιενέργειας στα ούρα είναι αποτέλεσμα απορρόφησης, τότε αυτή μπορεί να θεωρηθεί πολύ χαμηλή. Οι συγγραφείς, ωστόσο, θεώρησαν ότι το χαμηλό επίπεδο ραδιενέργειας που βρέθηκε στα ούρα θα μπορούσε να προκληθεί, εν μέρει ή συνολικά, λόγω επιμόλυνσης από τη ραδιενέργεια που αποβάλλεται μέσω των κοπράνων (JECFA 2002). Μετά από

ενδοφλέβια χορήγηση C-14 ναταμυκίνης στον σκύλο, η ραδιενέργεια απεκκρίθηκε κυρίως μέσω της χολής. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι απορροφήθηκε το πολύ 5% της ραδιενέργειας.

2.5.2 Άνθρωπος

Στους ανθρώπους λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την απορρόφηση, κατανομή, απέκκριση ή μεταβολισμό της ναταμυκίνης. Δεν ανιχνεύθηκε ναταμυκίνη (<1 μg/mL) στο αίμα μετά από κατάποση 500 mg από ανθρώπους - εθελοντές (EFSA 2009). Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει τη δήλωση ότι η ναταμυκίνη δεν απορροφάται από το έντερο σε ανθρώπους (Raab 1972).

2.6 Τοξικότητα

Όσον αφορά στην ασφάλεια και τοξικότητα της ναταμυκίνης ως πρόσθετου τροφίμων, η EFSA (2009) δηλώνει ότι τα δεδομένα των μελετών ως τώρα δεν προκαλούν ανησυχία, αλλά ότι περισσότερα δεδομένα απαιτούνται για την αντικειμενικότερη αξιολόγηση του κινδύνου.

2.6.1 Άμεση – οξεία τοξική δράση

Οι τιμές LD₅₀ της ναταμυκίνης, μετά από χορήγηση από το στόμα, αναφέρεται ότι είναι μεγαλύτερες από 1400 mg/kg σωματικού βάρους για τα ποντίκια, 2700 και 4700 mg/kg σωματικού βάρους για αρσενικούς και θηλυκούς επίμους, αντίστοιχα, και 1400 mg/kg σωματικού βάρους για το κουνέλι. Η LD₅₀ για τα θηλυκά ινδικά χοιρίδια αναφέρεται ότι είναι 450 mg/kg σωματικού βάρους (EFSA 2009).

Στα κουνέλια, δόσεις ναταμυκίνης ίσες με 500 mg/kg σωματικού βάρους προκάλεσαν διάρροια και τα ζώα που πέθαναν είχαν αιμορραγικό γαστρικό βλεννογόνο. Η συμπλοκοποίηση της ναταμυκίνης με έναν τροποποιημένο πολυσακχαρίτη αύξησε την τοξικότητά της έξι φορές και όταν χορηγήθηκε σε επίμους ανιχνεύθηκε ναταμυκίνη στο αίμα τους. Οι αρσενικοί επίμους φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι από τους θηλυκούς όταν η ναταμυκίνη χορηγείται από το στόμα. Ωστόσο, οι θηλυκοί επίμους φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι στην ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση σε σχέση με τους αρσενικούς (EFSA 2009).

Η οξεία τοξικότητα της ναταμυκίνης προσδιορίστηκε σε επίμους μετά από χορήγηση διά του στόματος, δερματική χορήγηση και χορήγηση με εισπνοή. Οι τιμές που προέκυψαν είναι LD₅₀ > 2000 mg/kg σωματικού βάρους, LD₅₀ > 5050 mg/kg

σωματικού βάρους και $LC_{50} > 2,39$ mg/L, αντίστοιχα. LD σημαίνει "Lethal Dose" ή Θανάσιμη Δόση, ενώ LC σημαίνει "Lethal Concentration" ή Θανατηφόρα Συγκέντρωση.

2.6.2 Βραχυπρόθεσμη και υποχρόνια τοξική δράση

Έχουν διεξαχθεί τρεις μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας με από του στόματος χορήγηση ναταμυκίνης. Δύο μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε επίμυες και μία μελέτη σε σκύλους. Και στα δύο είδη επηρεάστηκαν κυρίως το σωματικό βάρος και η πρόσληψη τροφής, ενώ παρατηρήθηκε και διάρροια στους σκύλους.

Στην πρώτη μελέτη που διεξήχθη σε επίμυες δεν παρατηρήθηκε απόκλιση στους αιματολογικούς, βιολογικούς παράγοντες και το βάρος των οργάνων. Αναλυτικότερα, σε ομάδες 15 αρσενικών και 15 θηλυκών επίμυων δόθηκε δίαιτα που περιείχε 500 mg/kg ναταμυκίνης ή 5% διαλύματος ναταμυκίνης για 98 ημέρες. Κανένα ζώο δεν πέθανε και η αύξηση του βάρους τους δεν επηρεάστηκε από τη θεραπεία. Δεν παρατηρήθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες στις αιματολογικές εξετάσεις ή στα απόλυτα βάρη του ήπατος και των νεφρών. Μικρές διαφορές στα σχετικά βάρη οργάνων θεωρήθηκαν συμπτωματικές, ενώ η μικροσκοπική εξέταση των οργάνων δεν έδειξε αλλοιώσεις λόγω χορήγησης της ναταμυκίνης (EFSA 2009).

Στη δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε επίμυες, αναφέρθηκε μείωση του μέσου σωματικού βάρους και της μέσης πρόσληψης τροφής. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη διεξήχθη χορηγώντας ναταμυκίνη σε δόσεις 0, 125, 500, 2000 ή 8000 mg/kg τροφής (ισοδύναμο με 0, 10, 45, 190 και 750 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για 94 έως 96 ημέρες) σε 20 αρσενικούς και 20 θηλυκούς επίμυες. Τα αιματολογικά ευρήματα και το βάρος των οργάνων ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων και δεν βρέθηκαν αδρές ή μικροσκοπικές αλλοιώσεις που θα μπορούσαν να αποδοθούν στη ναταμυκίνη. Μετά από 3 μήνες, η κατανάλωση τροφής των αρσενικών και των θηλυκών της ομάδας της υψηλότερης χορήγησης ήταν περίπου 23% και 17% μικρότερη, αντίστοιχα, από εκείνη των μαρτύρων, ενώ σε επίπεδο χορήγησης 190 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, η μέση πρόσληψη τροφής μειώθηκε περίπου 5% και για τα δύο φύλα. Στο υψηλότερο επίπεδο χορήγησης (750 mg/kg/bw/ημέρα), οι αρσενικοί και οι θηλυκοί επίμυες είχαν μέσο σωματικό βάρος κατά μέσο όρο 54% και 67% μικρότερο σε σχέση με εκείνο των αντίστοιχων μαρτύρων. Στο επίπεδο χορήγησης των 190 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, τα ζώα είχαν κατά μέσο όρο περίπου το 85% του μέσου σωματικού βάρους των ζώων-μαρτύρων (Levinskas et al. 1966).

Στη μελέτη με σκύλους Beagle (2 αρσενικά και 2 θηλυκά ανά ομάδα), χορηγήθηκε ναταμυκίνη σε δόσεις των 0, 12 και 25 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για 3 μήνες. Τα κλινικά ευρήματα που αναφέρθηκαν κυρίως στην ομάδα υψηλής δόσης ήταν παροδική διάρροια και μια ελαφριά απώλεια σωματικού βάρους. Η διάρροια θεωρήθηκε από τους συγγραφείς της μελέτης ως αποτέλεσμα τοπικού ερεθισμού του εντέρου. Το NOAEL (no-observed-adverse-effect level) της μελέτης ήταν 45 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα για 3 μήνες (EFSA 2009).

2.6.3 Μεταλλαξιγόνος δράση

In vitro

Πραγματοποιήθηκαν διάφορες μελέτες για την αξιολόγηση του μεταλλαξιγόνου δυναμικού της ναταμυκίνης, των προϊόντων διάσπασής της (δηλαδή αποναταμυκίνη, ναταμυκινολιδοδιόλη και υδροχλωρική μυκοζαμίνη) και Delvocid (ένα εναιώρημα ναταμυκίνης 50% σε νερό) σε *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* και *Escherichia coli*. Δεν παρατηρήθηκαν θετικές αποκρίσεις στις δειγματοληπτικές δοκιμές σε κανένα από τα τρία συστήματα δοκιμών. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το Delvocid δεν προκάλεσε αντίστροφη μετάλλαξη όταν δοκιμάστηκε μόνο του ή με νιτρώδη σε οποιοδήποτε από τα στελέχη της *S. typhimurium* ή της *E. coli*. Οι συγγραφείς σχολίασαν την ελαφρά θετική απόκριση με τα νιτρώδη σε περίπου 0,2 mol/L και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το Delvocid δεν ενίσχυε τη μεταλλαξιγόνο δράση των νιτρωδών αλάτων (EFSA 2009).

Η Επιτροπή της EFSA, ωστόσο, σημείωσε ότι οι παραπάνω μελέτες είχαν περιορισμούς που εμπόδισαν την επαλήθευση των συμπερασμάτων των συγγραφέων. Για παράδειγμα, τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν δεν αναλύθηκαν για τους κατάλληλους φαινοτυπικούς δείκτες ή πλασμίδια, δεν αναφέρθηκαν τα κριτήρια για θετική απόκριση, δεν αναφέρθηκαν συνοπτικά και μεμονωμένα δεδομένα για τη δοκιμή κηλίδας και δεν πραγματοποιήθηκαν στατιστικές αναλύσεις. Δεν παρασχέθηκαν επαρκείς πληροφορίες που να υποδεικνύουν ότι οι μελέτες ήταν επαρκώς ευαίσθητες για την ανίχνευση θετικών αντιδράσεων σε όλα τα στελέχη που δοκιμάστηκαν. Επιπλέον, οι αναλύσεις διεξήχθησαν σε μία μόνο δοκιμή, με μία πλάκα ανά δόση. Η χρησιμότητα αυτών των μελετών είναι επομένως περιορισμένη (EFSA 2009).

Δεν παρατηρήθηκε μεταλλαξιγόνος δράση σε *B. subtilis* όταν η ναταμυκίνη μελετήθηκε σε συγκέντρωση 1% και τα γνωστά προϊόντα διάσπασής της (αποναταμυκίνη, διναταμυκινολιδοδιόλη και μυκοζαμίνη) σε συγκέντρωση 0,5%, και σε

συνθήκες pH και νιτρωδών αλάτων παρόμοιες με εκείνες σε διατηρημένα τρόφιμα, όπως το τυρί και τα λουκάνικα. Δεν παρουσιάστηκαν πραγματικά δεδομένα για την επαλήθευση αυτής της δήλωσης (EFSA 2009).

In vivo

Σε μια μελέτη τριών γενεών αναπαραγωγικής τοξικότητας, σε ομάδες 10 αρσενικών επίμυων χορηγήθηκε δίαιτα ελέγχου μέχρι να ωριμάσουν σεξουαλικά. Στη συνέχεια, στους επίμυες χορηγήθηκε με γαστρικό καθετήρα ναταμυκίνη σε δόση 0, 5, 15, 50 ή 100 mg/kg σωματικού βάρους ημερησίως, για 7 ημέρες. Κάθε επίμυς ζευγαρώθηκε ανά εβδομάδα, για 8 διαδοχικές εβδομάδες, με δύο θηλυκά που δεν είχαν λάβει ναταμυκίνη. Κάθε θηλυκό θανατώθηκε και εξετάστηκε 13 ημέρες μετά το ζευγάρωμα. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ζώων μαρτύρων και των πειραματόζων σε ό,τι αφορά τον αριθμό των θέσεων εμφύτευσης ή ζωντανών ή νεκρών εμβρύων ή τον μεταλλαξιογόνο δείκτη (EFSA 2009).

Στην ίδια μελέτη τριών γενεών επιλέχθηκαν τυχαία πέντε αρσενικοί και πέντε θηλυκοί επίμυες από τις πέντε γέννες που προέκυψαν. Στα ζώα χορηγήθηκε κολχικίνη 3-4 ώρες πριν θανατωθούν και ετοιμάστηκε παρασκευάσμα μυελού των οστών για εξέταση για ανώμαλο υλικό χρωματίνης. Ο αριθμός των ανωμαλιών στα χρωμοσωμικά παρασκευάσματα μετάφασης των δοκιμαστικών ομάδων δεν διέφερε σημαντικά από αυτόν στους μάρτυρες που έλαβαν ψευδή θεραπεία (EFSA 2009).

Σύμφωνα με έκθεση του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Αξιολόγηση των Φαρμακευτικών Προϊόντων (EMA 1998), η μεταλλαξιγένεση της ναταμυκίνης έχει μελετηθεί σε ένα σύνολο GLP μελετών. Σε κανένα από τα πειράματα δεν παρατηρήθηκε κάποια ένδειξη ότι η ναταμυκίνη είχε μεταλλαξιογόνο δυναμικό.

Το 2009, οι Rencüzoğullari et al., ερεύνησαν τις επιδράσεις της ναταμυκίνης στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες (CAs), στις αδελφικές χρωματιδικές ανταλλαγές (SCEs) και στο σχηματισμό μικροπυρήνων (MN) στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Τα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 13, 18, 23 και 28 µg/mL ναταμυκίνης για 24 και 48 ώρες. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, η ναταμυκίνη αύξησε τη συχνότητα χρωματιδικών αλλαγών στην υψηλότερη συγκέντρωση μόνο για 48 ώρες. Ωστόσο, αύξησε τη δομική συχνότητα χρωμοσωμικών αλλαγών και εμφάνισης μικροπυρήνων σε όλες τις συγκεντρώσεις, εκτός από τη χαμηλότερη συγκέντρωση (13 µg/mL). Η ναταμυκίνη έδειξε κυτταροτοξική δράση κυρίως στις υψηλότερες συγκεντρώσεις για δύο περιόδους θεραπείας, όπως υποδεικνύεται από τη μείωση του δείκτη αντιγραφής, του

μιτωτικού δείκτη και του δείκτη πυρηνικής διαίρεσης (NDI). Η ομάδα θεώρησε τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις SCE και MN αρνητικά, καθώς τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν ήταν πολύ ασθενή. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης CA ήταν περιορισμένης συνάφειας, καθώς αυτές οι επιδράσεις συνοδεύονταν από κυτταροτοξικότητα (Rencüzoğulları et al. 2009).

Μία πιο πρόσφατη μελέτη για τις κυτταροτοξικές και γενετοξικές επιδράσεις της ναταμυκίνης πραγματοποιήθηκε σε μυελό των οστών μυών. Σε αυτή τη μελέτη, διαφορετικές δόσεις ναταμυκίνης (20, 400 και 800 mg/kg) χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά στα μύες, για διαφορετικές χρονικές περιόδους (6, 12, 24, 48 και 72 ώρες). Η χρωμοσωμική ανάλυση επιβεβαίωσε ότι η ναταμυκίνη δεν ήταν μεταλλαξιγόνος παράγοντας και δεν αύξησε τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η θεραπεία με ναταμυκίνη (400 και 800 mg/kg) προκάλεσε το σχηματισμό μικροπυρήνων (MN) (σε 24 και 48 ώρες) τόσο σε αρσενικούς όσο και σε θηλυκούς μύες. Μείωση του μιτωτικού δείκτη και της αναλογίας [πολυχρωματόφιλα ερυθροκύτταρα] / [νορμοχρωματικά ερυθροκύτταρα] αναφέρθηκαν σε όλες τις συγκεντρώσεις ναταμυκίνης, αντανακλώντας την κυτταροτοξική επίδραση της ουσίας στον μυελό των οστών μυών (Rasgele and Kaymak 2013b). Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η ναταμυκίνη (400 και 800 mg/kg) μπορεί να αλλάξει τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων, αλκαλική αμινοτρανσφεράση, γαλακτική αφυδρογονάση και αλκαλική φωσφατάση, στον ορό του αίματος και να προκαλέσει εκφυλιστικές διαταραχές στο ήπαρ μυών (Rasgele and Kaymak 2013a).

2.6.4 Χρόνια τοξική δράση και καρκινογόνος δράση

Σε μια διετή μελέτη χρόνιας τοξικότητας που πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιήθηκαν επίμυες και σκύλοι. Για 2 χρόνια δόθηκε τροφή σε επίμυες με συγκεντρώσεις ναταμυκίνης 0, 125, 500 ή 1000 mg/kg. Συνυπολογίζοντας τη διασπορά της ουσίας στη ζωοτροφή, η πρόσληψη ήταν 10-30% χαμηλότερη. Παρατηρήθηκε μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και της πρόσληψης τροφής, μόνο όμως στην ομάδα της υψηλότερης χορήγησης (1000 mg/kg ναταμυκίνη). Το NOAEL αναφέρθηκε ότι ήταν 22,4 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα. Η ίδια μελέτη κατέληξε επίσης στο συμπέρασμα ότι δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων που έλαβαν ναταμυκίνη και των αντίστοιχων μαρτύρων όσον αφορά τον αριθμό και τους τύπους των όγκων που αναπτύχθηκαν (EFSA 2009).

Στους σκύλους, παρατηρήθηκε παχυσαρκία στην ομάδα με την υψηλότερη συγκέντρωση ναταμυκίνης στην τροφή (500 mg/kg). Στην ομάδα με δόση ναταμυκίνης

6,25 mg/kg/ημέρα ή χαμηλότερη, δεν επηρεάστηκε το σωματικό βάρος και ως εκ τούτου θεωρείται ως NOAEL του (EFSA 2009).

Σε μια άλλη μελέτη μια ομάδα 10 ασθενών με συστηματικές μυκητιάσεις έλαβε από του στόματος δόσεις 50–1000 mg/ημέρα για 13–180 ημέρες. Ναυτία, έμετος και διάρροια εμφανίστηκαν σε όσους λάμβαναν 600–1000 mg/ημέρα (Newcomer et al. 1960). Δεν εμφανίστηκε αλλεργική ευαισθητοποίηση μεταξύ 111 ασθενών που έλαβαν ναταμυκίνη για μια ποικιλία καταστάσεων. Δεν βρέθηκε ιστορικό αλλεργικών αντιδράσεων σε 73 εργαζόμενους που ασχολήθηκαν κατά μέσο όρο για 5 χρόνια στην παρασκευή ναταμυκίνης (JECFA 1976).

2.6.5 Τοξική δράση στο αναπαραγωγικό σύστημα και στην ανάπτυξη

Μελέτες αναπαραγωγικής τοξικότητας

Πραγματοποιήθηκε μελέτη αναπαραγωγικής τοξικότητας σε επίμυες, που έλαβαν διαίτα με ναταμυκίνη σε συγκέντρωση 0 ή 1000 mg/kg. Οι δείκτες γονιμότητας, κύησης, γαλουχίας και βιωσιμότητας ήταν παρόμοιοι ή καλύτεροι από αυτούς των μαρτύρων. Τα νεογνά των ζώων που έλαβαν ναταμυκίνη είχαν χαμηλότερο μέσο σωματικό βάρος κατά τον απογαλακτισμό από τα νεογνά ελέγχου. Σε αυτή τη μελέτη υπήρξε χαμηλή συχνότητα εμφάνισης ανωμαλιών μεταξύ των νεογνών, αλλά καμία δεν θεωρήθηκε σχετική με τη χορήγηση ναταμυκίνης από τους συγγραφείς. Η ομάδα EFSA κατέληξε στο συμπέρασμα ότι αυτή η μελέτη είναι πολύ περιορισμένη για να προσδιοριστεί το NOAEL (EFSA 2009).

Μία άλλη αναπαραγωγική μελέτη με ναταμυκίνη πραγματοποιήθηκε σε τρεις γενιές επίμυων. Σε ομάδες 10 αρσενικών και 20 θηλυκών επίμυων δόθηκε διαίτα ναταμυκίνης σε δόσεις 0 (δύο ομάδες), 5, 15, 50 ή 100 mg/kg σωματικού βάρους την ημέρα για 11 εβδομάδες. Αυτά σχημάτισαν τη γενιά F0. Δύο γέννες προέκυπταν από κάθε γενιά. Τα ζώα στη δόση των 100 mg/kg είχαν αυξημένο αριθμό εμβρύων που γεννήθηκαν νεκρά, μειωμένο αριθμό νεογνών που γεννήθηκαν ζωντανά και μειωμένο αριθμό νεαρών ζώων που επέζησαν έως τις 21 ημέρες. Το βάρος των νεογνών μειώθηκε στις δεύτερες γέννες των γενεών F0 και F1 και στις δύο γέννες της γενιάς F2. Ωστόσο, οι δείκτες γονιμότητας, κύησης, βιωσιμότητας και γαλουχίας ήταν εντός φυσιολογικών ορίων και για τις δύο γέννες και των τριών γενεών. Οι δόσεις των 5, 15 και 50 mg/kg δεν είχαν ανιχνεύσιμο αποτέλεσμα στην ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή. Το NOAEL αυτής της μελέτης θεωρήθηκε ότι ανέρχεται σε 50 mg/kg /ημέρα (EFSA 2009).

Μελέτες αναπτυξιακής τοξικότητας

Ομάδες 20 θηλυκών επιμυων από τη δεύτερη γέννα της γενιάς F1, της μελέτης τριών γενεών για την αναπαραγωγική τοξικότητα, εκτράφηκαν μέχρι να ωριμάσουν σεξουαλικά με δίαιτα ελέγχου και ζευγαρώθηκαν με αρσενικά που δεν είχαν λάβει ναταμυκίνη. Στα θηλυκά, κατά τη διάρκεια των 6-15 ημερών της κύησης, χορηγήθηκε η ίδια δόση ναταμυκίνης με τους γονείς τους (0, 5, 15, 50 ή 100 mg/kg/ημέρα) με γαστρικό καθετήρα. Τα θηλυκά θανατώθηκαν και εξετάστηκαν την 20η ημέρα. Δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των μαρτύρων και των πειραματόζωων σε σχέση με τον αριθμό των κυήσεων, του εμβρυϊκού θανάτου, των θέσεων εμφύτευσης, των θέσεων απορρόφησης, των ζωντανών και των νεκρών εμβρύων ή των ανωμαλιών του σκελετού και των μαλακών ιστών. Το NOAEL αυτής της μελέτης ορίστηκε στα 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (EFSA 2009).

Σε μια άλλη αναπτυξιακή μελέτη με κουνέλια, χορηγήθηκε εναιώρημα Delvocid (50% ναταμυκίνη) με καθετήρα, σε ζευγαρωμένα θηλυκά κουνέλια (0, 5, 15 ή 50 mg/kg/ημέρα) από την 6^η ημέρα έως την 18^η ημέρα της κύησης. Τα ποσοστά μητρικής θνησιμότητας ήταν 0% (0/20), 5% (1/20), 9% (2/22) και 19% (5/26) στις 4 ομάδες, αντίστοιχα. Η αιτία θανάτου δεν αναφέρθηκε στην έκθεση. Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην εγκυμοσύνη, την εμφύτευση, τον αριθμό των ζωντανών εμβρύων, τον αριθμό των νεκρών εμβρύων ή τον αριθμό των απορρόφησης μεταξύ οποιασδήποτε ομάδας δοκιμής και των μαρτύρων. Τα έμβρυα αξιολογήθηκαν για σκελετικές ανωμαλίες. Οι ανωμαλίες που σημειώθηκαν σε έμβρυα των οποίων οι μητέρες έλαβαν ναταμυκίνη σε δόση 5, 15 και 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα ήταν κυρίως σκελετικές ανωμαλίες, που γενικά θεωρούνταν ως αυθόρμητες. Σημαντική αύξηση στον αριθμό των επιπλέον πλευρών παρατηρήθηκε σε ομάδες που έλαβαν θεραπεία με 15 και 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα (EFSA 2009).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ήταν δύσκολο να ερμηνευτούν λόγω της μητρικής θνησιμότητας, των προβλημάτων που σχετίζονται με την καθετηρίαση των κουνελιών και επειδή το πεπτικό σύστημα των κουνελιών είναι ευαίσθητο στα αντιβιοτικά. Η ομάδα της EFSA έκρινε ότι τα επιπλέον στέρνα είναι μια κοινή παραλλαγή σε μελέτες αναπτυξιακής τοξικότητας, ιδιαίτερα παρουσία μητρικής τοξικότητας, όπως σε αυτή τη μελέτη, και δεν θεωρείται ότι είναι ενδεικτική τερατογένεσης της ναταμυκίνης, καθώς δεν υπήρχαν άλλες σημαντικές σκελετικές επιδράσεις που θα μπορούσαν να αποδοθούν στη χορήγηση ναταμυκίνης (EFSA 2009). Η ομάδα έκρινε ακόμη, ότι η επίπτωση της θνησιμότητας στα επίπεδα των 5 και 15 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα

θα μπορούσε να αναμένεται σε μια φυσιολογική αποικία κουνελιών και, ως εκ τούτου, θεώρησε ότι μόνο το επίπεδο δόσης των 50 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα παρείχε πειστικές ενδείξεις τοξικότητας. Το NOAEL καθορίστηκε στα 15 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα με βάση τη μητρική τοξικότητα (EFSA 2009).

2.6.6 Τοξική δράση στον άνθρωπο

Ναυτία, έμετος και διάρροια έχουν παρατηρηθεί περιστασιακά μετά από του στόματος δόση 300–400 mg ναταμυκίνης ημερησίως. Δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα κύτταρα του περιφερικού αίματος (EFSA 2009). Μια ομάδα 10 ασθενών με συστηματικές μυκητιάσεις έλαβε από του στόματος δόσεις 50–1000 mg/ημέρα για 13–180 ημέρες. Ναυτία, έμετος και διάρροια εμφανίστηκαν σε όσους λάμβαναν 600–1000 mg/ημέρα (Newcomer et al. 1960). Πιο συγκεκριμένα στη συγκεκριμένη μελέτη, χορηγήθηκε από του στόματος ναταμυκίνη σε 10 ασθενείς που έπασχαν από μυκητίαση. Οι δόσεις που χορηγήθηκαν στους ασθενείς κυμαίνονταν από 25 έως 1000 mg/άτομο/ημέρα για 20 έως 180 ημέρες. Η θεραπεία προκάλεσε ανορεξία, ναυτία και έμετο όταν η δόση ήταν ίση ή μεγαλύτερη των 200 mg/άτομο/ημέρα. Στη δόση των 50 mg/άτομο/ημέρα περιγράφηκε μετεωρισμός. Μόνο ένας από τους 10 ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν μεμονωμένα 25-75 mg/άτομο/ημέρα κατά τη διάρκεια 70 ημερών, δεν ανέφερε καμία ανεπιθύμητη ενέργεια της θεραπείας. Σε τρεις περιπτώσεις, η θεραπεία διακόπηκε λόγω τοξικότητας. Ένας ασθενής ανέχτηκε ένα επίπεδο 400 mg/ημέρα χωρίς γαστρεντερικά προβλήματα. Σύμφωνα με τους συγγραφείς, ένας ασθενής ανέφερε ανορεξία, ναυτία και έμετο στη δόση των 50 mg/ημέρα (Newcomer et al. 1960).

Η JECFA έκρινε ότι η μελέτη των Newcomer et al. (1960) είναι πολύ περιορισμένη για να καθοριστεί ένα NOAEL και κατέθεσε την ADI των 0,3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα, θεωρώντας ότι το επίπεδο που δεν προκαλεί τοξικολογικές επιπτώσεις στον άνθρωπο ήταν 200 mg/ημέρα, ισοδύναμο με 3 mg/kg σωματικού βάρους/ημέρα.

Η ναταμυκίνη έχει χρησιμοποιηθεί για περισσότερα από 40 χρόνια για τη θεραπεία της κολπικής καντιντίασης, συμπεριλαμβανομένης της πρώιμης εγκυμοσύνης. Μια πρώιμη μελέτη δεν βρήκε καμία επίδραση της θεραπείας σε συγγενείς ανωμαλίες (EFSA 2009). Μια μεγάλη μελέτη περιπτώσεων ελέγχου στην Ουγγαρία που κάλυπτε γεννήσεις από το 1980-1996 (Czeizel et al. 2003) περιελάμβανε 22843 εγκυμοσύνες που οδήγησαν σε συγγενή ανωμαλία και 38151 εγκυμοσύνες με φυσιολογική έκβαση. Μεταξύ αυτών, υπήρχαν 62 περιπτώσεις και 98 μάρτυρες που είχαν λάβει θεραπεία με ναταμυκίνη, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, με ενδοκολπικό δισκίο 25 mg/ημέρα, μία

ή δύο φορές την ημέρα, για τουλάχιστον 2 ημέρες. Δεν υπήρξε αύξηση στις εμβρυϊκές ανωμαλίες μετά από τη μητρική θεραπεία με ναταμυκίνη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Η EFSA σημειώνει ότι αυτά τα δεδομένα δεν εγείρουν ανησυχίες, αλλά ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση κινδύνου της ναταμυκίνης ως πρόσθετου τροφίμων (Czeizel et al 2003, EFSA 2009).

2.7 Εφαρμογές στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης

Γαλακτοκομικά προϊόντα

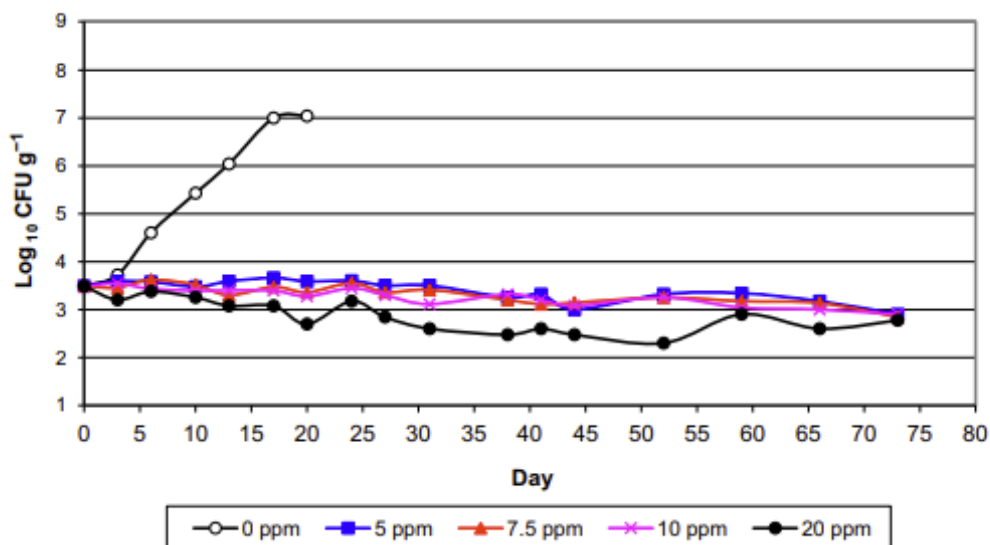
Τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στη μικροβιακή αλλοίωση, εξαιτίας της σύνθεσής τους. Η υψηλή ενεργότητα νερού (a_w), το μέτριο pH, οι πρωτεΐνες και τα άλατα αποτελούν ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αρκετοί μύκητες που υπάρχουν στο περιβάλλον μπορούν να καταστρέψουν τα γαλακτοκομικά προϊόντα λόγω επιμόλυνσης του τροφίμου (Delavenne et al. 2013). Ως εκ τούτου, τα συντηρητικά και τα πρόσθετα τροφίμων διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ποιότητας και στην αύξηση της διάρκειας ζωής των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η ναταμυκίνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε γαλακτοκομικά προϊόντα παγκοσμίως. Λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς της, εφαρμόζεται στις επιφάνειες των τροφίμων με σκοπό την αύξηση της διάρκειας ζωής τους. Ένα πλεονέκτημα της ναταμυκίνης έναντι της χρήσης σορβικών είναι η περιορισμένη μετανάστευσή της στο εσωτερικό των τροφίμων (Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen 2013). Το τυρί είναι το κύριο γαλακτοκομικό προϊόν όπου η εφαρμογή της ναταμυκίνης παίζει σημαντικό ρόλο για αρκετά χρόνια. Φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική εάν εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε επαρκή συγκέντρωση (0,6-1mg/g) (Delves-Broughton and Weber 2011). Τα τυριά είναι ευαίσθητα προϊόντα στην ανάπτυξη μυκήτων λόγω της μεγάλης εξωτερικής τους επιφάνειας κατά την έκθεσή τους στο περιβάλλον. Άλλοι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη μυκήτων είναι ο επιπλέον χειρισμός κατά την κοπή του τυριού, η μολυσμένη καλλιέργεια εκκίνησης και οι βρώμικες μηχανές επεξεργασίας (Kure et al. 2004). Η μόλυνση από μύκητες έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μεταβολιτών που θα μπορούσαν να προκαλέσουν ανεπιθύμητες γεύσεις και άρωμα σε τυρί. Η παραγωγή καρκινογόνου μυκοτοξίνης από μύκητες είναι η μεγαλύτερη απειλή για τους τυροκόμους (Dalie et al. 2010). Η μεγαλύτερη ανησυχία στα μαλακά τυριά είναι η ανάπτυξη μυκήτων κατά την αποθήκευσή τους. Ερευνητές μελέτησαν την ανασταλτική δράση της ναταμυκίνης σε αιγυπτιακό φρέσκο μαλακό τυρί (τυρί Tallaga) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5–20 ppm). Η ναταμυκίνη έδειξε την

καλύτερη ανασταλτική δράση στα 20 ppm με αύξηση της διάρκειας ζωής του τυριού έως και 4 εβδομάδες (Ombarak and Shelaby 2017). Ο συνδυασμός συντηρητικών είναι μια εξαιρετική προσέγγιση για την αύξηση της διάρκειας ζωής των τροφίμων. Η ναταμυκίνη και η νισίνη έδρασαν συνεργικά και αύξησαν τη διάρκεια ζωής του τυριού Γαλοτύρι (παραδοσιακό ελληνικό τυρί) για περισσότερες από 28 ημέρες, αναστέλλοντας την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων (Kallinteri et al. 2013).

Η εφαρμογή της ναταμυκίνης στο τυρί μπορεί να γίνει με ψεκασμό, εμβάπτιση, γαλακτώματα επικάλυψης ή απευθείας προσθήκη (Elsser-Gravesen and Elsser-Gravesen 2013). Η επιφανειακή επεξεργασία του μπλε τυριού με ναταμυκίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αποτρέψει την υπερβολική ανάπτυξη *Penicillium roqueforti* στην επιφάνειά του. Η ναταμυκίνη μπορεί να εφαρμοστεί πριν ή μετά τη διάτρηση του τυριού. Τα επεξεργασμένα μπλε τυριά έχουν αποδειχθεί ότι έχουν καλύτερη εσωτερική ανάπτυξη μυκήτων σε σύγκριση με τα μη επεξεργασμένα τυριά, όπου η ανεπιθύμητη ανάπτυξη μυκήτων στην επιφάνεια μπορεί να περιορίσει τη διαθεσιμότητα οξυγόνου στα σημεία διάτρησης (Laurindo et al. 2019). Για τα μπλοκ τυριού, ο καλύτερος τρόπος επεξεργασίας τους είναι με χρήση εξοπλισμού ψεκασμού, με τέτοιο τρόπο ώστε ένα πολύ λεπτό ομοιόμορφο σπρέι να εφαρμόζεται και στις έξι επιφάνειες του τυριού. Η προσθήκη 8-10% αλατιού συνιστάται σε τέτοια χρήση για την πρόληψη της ανάπτυξης βακτηρίων κατά τη διάρκεια παρατεταμένων χρόνων λειτουργίας. Ένας ακόμη τρόπος επεξεργασίας με ναταμυκίνη για τα μπλοκ τυριού, είναι απλή βύθιση σε εναιωρήματα ναταμυκίνης για λίγα δευτερόλεπτα (Lule et al. 2016). Διάφορα τυριά τύπου φέτας συχνά εμποτίζονται ή αποθηκεύονται σε άλμη (8–20% αλάτι). Οι ζύμες και οι μύκητες που αντέχουν στο αλάτι (αλόφιλα) αποτελούν ένα πιθανό πρόβλημα αλλοίωσης, η προσθήκη όμως ναταμυκίνης στην άλμη σε συγκέντρωση 10–20 mg/mL, θα αποτρέψει ή θα καθυστερήσει την ανάπτυξή τους (Hameed 2016).

Η ναταμυκίνη είναι ένα συντηρητικό που δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στη βιωσιμότητα και την απόδοση ζύμωσης των βακτηριακών καλλιιεργειών εκκίνησης που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή γιαουρτιού, αλλά παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι ζυμών και μυκήτων. Η επιλεκτική αντιμικροβιακή δράση της ναταμυκίνης αποδεικνύεται αποτελεσματική τόσο στη στερεά γιαούρτη όσο και στα ροφήματα γιαούρτης. Η ναταμυκίνη μπορεί να προστεθεί στο γάλα πριν ή μετά την παστερίωση, ταυτόχρονα με τον ενοφθαλμισμό των αρχικών καλλιιεργειών. Η επίδραση της

ναταμυκίνης σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0 έως 20 mg/mL έναντι μιας ενοφθαλισμένης ζύμης φαίνεται στο σχήμα 1 (Lule et al. 2016).



Σχήμα 1. Επίδραση της ναταμυκίνης στην ανάπτυξη του *Saccharomyces cerevisiae* H78 σε γιαούρτη στους 8°C (Lule et al. 2016).

Μελέτες έδειξαν ότι η γιαούρτη που υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ναταμυκίνη (10 ppm) είχε διάρκεια ζωής έως και 40 ημέρες καθώς η ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων μειώθηκε ($3,36 \pm 0,66 \log_{10} \text{cfu/g}$) (Sara et al. 2014). Η ναταμυκίνη σε συκέντρωση 8-10 ppm αποδείχθηκε ότι μειώνει τον αριθμό των ζυμομυκήτων έως και 65,99% σε γιαούρτη με γεύση βανίλιας που αποθηκεύεται στους $5 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, χωρίς να αλλοιώνει τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (Dzigbordi et al. 2013). Η ανάπτυξη των *Mucor circinelloides* (που εμπλέκονται στο φούσκωμα του δοχείου) στη γιαούρτη αναστέλλεται με την προσθήκη 8 ppm ναταμυκίνης (ψυγμένο στους $15 \text{ }^\circ\text{C}$) και αυτό οδηγεί σε αύξηση της διάρκειας ζωής έως και 30 ημέρες χωρίς να διακυβεύονται οι οργανοληπτικές του ιδιότητες (Bakar 2011).

Κρέας και προϊόντα κρέατος

Η κύρια εφαρμογή της ναταμυκίνης είναι η επιφανειακή επεξεργασία αλλαντικών που έχουν υποστεί ζύμωση. Τα αλλαντικά που πρόκειται να υποστούν ζύμωση παρασκευάζονται γεμίζοντας τα περιβλήματα με κιμά και λίπος και ενοφθαλμίζοντας βακτήρια εκκινήτες ή επιτρέποντας την ανάπτυξη φυσικών ζυμωτικών μικροοργανισμών. Η διαδικασία ζύμωσης μπορεί να διαρκέσει από 1 ημέρα έως 1 μήνα στους $15\text{-}25^\circ\text{C}$ ανάλογα με το μέγεθος και τον τύπο του αλλαντικού. Τα αλλαντικά που έχουν υποστεί

ζύμωση είναι επιρρεπής σε αλλοίωση από την ανάπτυξη ζυμών και μυκήτων, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αντιαισθητικά μυκήλια ή αποικίες στην επιφάνειά τους. Κατά την ωρίμανση, το pH μειώνεται με συνέπεια τη μείωση της ικανότητας συγκράτησης νερού του κρέατος και επακόλουθο την αύξηση της επιφανειακής υγρασίας, που αποτελεί ιδανική συνθήκη για την επιφανειακή ανάπτυξη μυκήτων. Στη συνέχεια, κατά τη διανομή ή την αποθήκευση, υπάρχει περαιτέρω πιθανότητα για ανεπιθύμητη ανάπτυξη μυκήτων. Μια μεγάλη ποικιλία μυκήτων μπορεί να εμπλέκεται στην αποθήκευση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* spp. Οι συνιστώμενες δόσεις για εμβάπτιση ή ψεκάσμο αλλαντικών είναι 2500–4000 mg/mL σε νερό. Απαιτείται σχολαστική ανάδευση για να διατηρηθεί η ναταμυκίνη σε εναιώρηση και ο ψεκάσμος των αλλαντικών πρέπει να είναι ομοιόμορφος και πλήρης. Μια περαιτέρω μέθοδος επεξεργασίας των αλλαντικών είναι η προεπεξεργασία των περιβλημάτων πριν από τη γέμιση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί καλύτερα με την εμβάπτιση του περιβλήματος σε ένα εναιώρημα ναταμυκίνης 500–1000 mg/ml. Είναι πιο αποτελεσματικό, όμως, η επεξεργασία στα αλλαντικά πρέπει να γίνεται μετά το γέμισμα. Ειδικά στην περίπτωση των αλλαντικών που έχουν υποστεί ζύμωση και κάπνιση δρουν και διάφορες πτητικές ενώσεις, όπως καρβονύλιο, καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες και φαινόλες. Αυτές οι πτητικές ενώσεις που σχηματίζονται κατά το κάπνισμα, όχι μόνο προσδίδουν άρωμα και γεύση στο αλλαντικό, αλλά δρουν και ως αντιμυκητιακός παράγοντας (Ledesma et al. 2016).

Τα αλλαντικά επεξεργάζονται επίσης με διαφορετικά συντηρητικά όπως σορβικό οξύ, σορβικό κάλιο ή/και ναταμυκίνη ώστε να παραταθεί η διάρκεια ζωής τους και να ελαχιστοποιηθούν οι απώλειες από την ανάπτυξη μυκήτων. Ωστόσο, η ναταμυκίνη έδειξε καλύτερη αντιμυκητιακή δράση σε αλλαντικά που υποβλήθηκαν σε θερμική επεξεργασία και ζύμωση σε σχέση με τα σορβικά (Pirsek et al. 2010). Ένας συνδυασμός ναταμυκίνης, γαλακτικού νατρίου και νισίνης χρησιμοποιήθηκε για την καταστολή της ανάπτυξης μυκήτων σε λουκάνικα τύπου γαλακτώματος και την παράταση της διάρκειας ζωής τους (Jingwei and Yunxia 2009). Μια δόση 300 ppm ναταμυκίνης μείωσε τις πιθανότητες μόλυνσης από *Aspergillus niger* κατά 44,80% στον κιμά βοείου κρέατος και διατήρησε το προϊόν σε αποδεκτά επίπεδα για 8 ημέρες (Salem et al. 2016). Οι El-Matary et al. (2017) μελέτησαν την επίδραση της ακτινοβόλησης και της επεξεργασίας με ναταμυκίνη στους πληθυσμούς ζυμών και μυκήτων σε 60 δείγματα φρέσκου κιμά. Διαπίστωσαν ότι τα δείγματα που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 0,1% ναταμυκίνη έδειξαν σημαντική

μείωση στον πληθυσμό ζυμών και μυκήτων μετά από 0, 5, 10 και 15 ημέρες αποθήκευσης στους 4°C.

2.8 Μέθοδοι προσδιορισμού της ναταμυκίνης στα τρόφιμα

Στις αναλυτικές μεθόδους που αναπτύχθηκαν για το προσδιορισμό της ναταμυκίνης στα τρόφιμα περιλαμβάνονται μικροβιολογικές (Grove and Randall 1955), ανοσοχημικές (Martlbauer et al. 1990), φασματοφωτομετρικές (de Ruig et al. 1987), διαφορικής φασματοφωτομετρίας (Fletouris et al. 1995) και υδροχρωματογραφικές (Tuinstra and Traag 1982, de Ruig et al. 1987, Rybinska et al. 1997, Guarino et al. 2011, Fuselli et al. 2012, Paseiro-Cerrato et al. 2013, Vierikova et al. 2013, Bilgic Alkaya and Karalomlu 2016, Molognoni et al. 2018, Detry et al. 2022). Από τις παραπάνω μεθόδους η συντριπτική πλειοψηφία αφορά στον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε τυριά και μόνο οι μέθοδοι των Bilgic Alkaya and Karalomlu (2016) και Detry et al. (2022) αφορούν στον προσδιορισμό της εν λόγω ουσίας σε γιαούρτη.

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι μειονεκτούν για το γεγονός ότι δεν είναι κατάλληλες για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ναταμυκίνης, ενώ οι ανοσοχημικές δεν είναι κατάλληλες για τον ποιοτικό έλεγχο επειδή περιορισμένος αριθμός εργαστηρίων έχουν την απαραίτητη εξειδίκευση να παράγουν τους δικούς τους αντιορούς. Από τις υπόλοιπες μεθόδους, οι φασματοφωτομετρικές και κυρίως οι υδροχρωματογραφικές προσφέρουν μεγάλη ευαισθησία και εκλεκτικότητα, αλλά μειονεκτούν γιατί οι περισσότερες χρησιμοποιούν χρονοβόρες εκχυλίσεις ή/και διαδικασίες καθίζησης των εκχυλιζόμενων ουσιών που παρεμβάλουν στη μέτρηση, ενώ μερικές μέθοδοι χρησιμοποιούν την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) για τον περαιτέρω καθαρισμό των εκχυλισμάτων.

Η μέθοδος που βασίζεται στη διαφορική φασματοφωτομετρία (Fletouris et al. 1995) και αφορά στον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε τυρί, εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία σε σύγκριση με τις περισσότερες υδροχρωματογραφικές μεθόδους, αλλά πλεονεκτεί γιατί είναι απλή, γρήγορη και χαμηλού κόστους.

2.9 Νομοθεσία

Η ναταμυκίνη επιτρέπεται σε πολλές χώρες ως πρόσθετο τροφίμων και ως φυσικό συντηρητικό σε διάφορα τρόφιμα (Πίνακας 2). Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (ΚΤΠ 2011) και σε εναρμόνιση με τον Κανονισμό 1333/2008/EK (Council Regulation 2008), η ναταμυκίνη (E235) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την επιφανειακή επεξεργασία σκληρών, ημίσκληρων και ημιμαλακών τυριών καθώς και των αποξηραμένων,

ωριμασμένων αλλαντικών, σε μέγιστο επίπεδο 1 mg/dm² επιφάνειας, με την προϋπόθεση να μην ανιχνεύεται σε βάθος 5 mm.

Η Επιτροπή Εμπειρογνομόνων του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας για τα Πρόσθετα των Τροφίμων (JECFA 2002) επικύρωσε την προηγούμενα καθορισθείσα αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) της ναταμυκίνης στα 0-0,3 mg/kg σωματικού βάρους, η οποία βασίστηκε στην παρατήρηση γαστρεντερικών επιδράσεων σε ανθρώπους. Επειδή η ναταμυκίνη επιτρέπεται να χρησιμοποιείται μόνο για την επιφανειακή επεξεργασία τυριών και ζυμωμένων αλλαντικών, η μέση ημερήσια πρόσληψη δεν μπορεί να υπερβαίνει την ADI, ακόμη και με την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων επεξεργασμένων προϊόντων. Στον πίνακα 2 καταγράφονται τα ανώτατα επιτρεπόμενα όρια για τη ναταμυκίνη σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σύμφωνα με τη νομοθεσία διαφόρων κρατών. Οι λεπτομέρειες διαφέρουν από χώρα σε χώρα και συνιστάται να ελέγχεται το καθεστώς που ισχύει σε κάθε χώρα ξεχωριστά.

Πίνακας 2. Ανώτατα επιτρεπόμενα όρια για τη ναταμυκίνη σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σύμφωνα με τη νομοθεσία διαφόρων κρατών

Χώρα	Ανώτατο επιτρεπόμενο όριο	Εφαρμογή
Ευρωπαϊκή Ένωση	Επιφάνεια: 1 mg/dm ² Απουσία σε βάθος 5 mm	Επιφανειακή επεξεργασία σκληρών, ημίσκληρων και ημιμαλακών τυριών και αποξηραμένων, ωριμασμένων αλλαντικών
ΗΠΑ	≤ 20 mg/kg	Τυριά
Καναδάς	≤ 20 mg/kg ≤ 10 mg/kg	Τυριά Τριμμένο τυρί
Αυστραλία	≤ 15 mg/kg	Τυριά και τυροκομικά προϊόντα

Πηγή: Stark (2003).

Οι επιτρεπόμενες χρήσεις της ναταμυκίνης διαφέρουν από χώρα σε χώρα. Στις περισσότερες μη ευρωπαϊκές χώρες, η ναταμυκίνη επιτρέπεται για την επιφανειακή επεξεργασία τυριών ή/και αλλαντικών ή άλλων προϊόντων κρέατος. Δεδομένου ότι οι κανονισμοί ενδέχεται να αλλάξουν, ο κανονισμός σε μια χώρα πρέπει να ελεγχθεί πριν από την εφαρμογή της ναταμυκίνης σε προϊόντα διατροφής.

B. Ειδικό μέρος

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Όργανα και αντιδραστήρια

3.1.1 Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (τύπος UV-160A) του οίκου Shimadzu (Tokyo, Japan).
- Φυγόκεντρος (τύπος KUBOTA-7780) του οίκου KUBOTA Corporation (Tokyo, Japan).
- Πεχάμετρο (τύπος Consort C830) του οίκου Montreal-Biotech, Inc. (Canada).
- Αναλυτικός ζυγός ευαισθησίας 0,00001 g του οίκου Sartorius (Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ευαισθησίας 0,001 g του οίκου OHAUS (USA).
- Μηχανικός αναδευτήρας, vortex (τύπος G-560E) του οίκου Scientific Industries (NY, USA).
- Κυψελίδες χαλαζία με μήκος διαδρομής 10 mm.
- Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου (τύπος PIPETMAN P200 και P1000) του οίκου Gilson (Middleton, USA).
- Πλαστικοί βαθμολογημένοι φυγοκεντρικοί σωλήνες των 15 ml.
- Γυάλινο υλικό εργαστηρίου, όπως σιφώνια, φυγοκεντρικοί σωλήνες, ογκομετρικές φιάλες, φιαλίδια, ποτήρια ζέσεως, ογκομετρικοί κύλινδροι κ.ά.

3.1.2 Αντιδραστήρια

- Natamycin (Pimaricin) $\geq 95\%$ του οίκου Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Germany).
- Ακετονιτρίλιο και μεθανόλη (HPLC grade) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- Φωσφορικό οξύ 86% του οίκου Merck (Darmstadt, Germany), αναλυτικής καθαρότητας.
- Διάλυμα εκχύλισης. Ανάμιξη δέκα (10) όγκων ακετονιτριλίου με ένα (1) όγκο φωσφορικού οξέος 1M.

3.2 Μέθοδος προσδιορισμού της ναταμυκίνης σε γιαούρτη

Για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης στη γιαούρτη χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος προσδιορισμού της ναταμυκίνης σε τυρί, των Fletouris et al. (1995), μετά από τις απαραίτητες τροποποιήσεις. Οι τροποποιήσεις αφορούσαν την κατεργασία του δείγματος και αποσκοπούσαν στην επίτευξη καθαρότερων εκχυλισμάτων, στη μείωση του όγκου των χρησιμοποιούμενων διαλυτών, στην αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου και στη μείωση του χρόνου ανάλυσης του δείγματος.

3.2.1 Εκχύλιση της ναταμυκίνης από τη γιαούρτη

Για την εκχύλιση της ναταμυκίνης, δείγμα γιαούρτης, βάρους περίπου 3 g, ζυγιζόταν με ακρίβεια μέσα σε βαθμολογημένο φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 mL και ακολουθούσε προσθήκη διαλύματος εκχύλισης (μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1) μέχρι τελικού όγκου 10 ml. Στη συνέχεια, το περιεχόμενο του σωλήνα υποβαλλόταν επί ένα min, αρχικά σε έντονη ανατάραξη με μηχανικό αναδευτήρα και ακολούθως σε φυγοκέντρηση σε 2000g.

Μετά τη φυγοκέντρηση μέρος του υπερκείμενου υγρού μεταφερόταν σε κυψελίδα χαλαζία και καταγραφόταν το φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος του δείγματος, το οποίο στη συνέχεια υποβαλλόταν σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου. Στην περίπτωση που το καταγραφόμενο αναλυτικό σήμα ήταν εκτός της περιοχής που καλυπτόταν από την καμπύλη αναφοράς, ήταν απαραίτητο το εκχύλισμα του δείγματος να αραιωθεί με το διάλυμα εκχύλισης.

3.2.2 Συνθήκες φασματοφωτομετρικής ανάλυσης

Η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης γινόταν στην περιοχή 290-380 nm, ρυθμίζοντας το φασματοφωτόμετρο ώστε η σάρωση να γίνει με μέτρια ταχύτητα (περίπου 1500 nm/min). Το φάσμα απορρόφησης υποβαλλόταν, στη συνέχεια, σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, επιλέγοντας στον υπολογιστή του φασματοφωτομέτρου τη διαφοροποίηση τρίτης τάξης και τη διαφορά μήκους κύματος ($\Delta\lambda$) των 6,3 nm, για περιοχή σάρωσης ≤ 100 nm (N=9). Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ναταμυκίνη εμφάνιζε χαρακτηριστική κοιλάδα στα 322,6 nm, το βάθος της οποίας, όπως αυτό καταγραφόταν σε αυθαίρετες μονάδες, ήταν ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας.

3.2.3 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης – καμπύλη αναφοράς

Παρασκευαζόταν *μητρικό* διάλυμα ναταμυκίνης σε ογκομετρική φιάλη των 25 ml, διαλύοντας περίπου 10 mg της ουσίας με μεθανόλη μέχρι τελικού όγκου. Το μητρικό διάλυμα συντηρούνταν επί 3 μήνες στους -20°C.

Από το μητρικό διάλυμα παρασκευαζόταν *ενδιάμεσο* διάλυμα ναταμυκίνης μεταφέροντας 0,5 mL μητρικού διαλύματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL και αραιώνοντας μέχρι τελικού όγκου με διάλυμα εκχύλισης.

Το ενδιάμεσο διάλυμα αραιωνόταν με διάλυμα εκχύλισης, σε ογκομετρικές φιάλες των 10 ml, για την παρασκευή *πρότυπων* διαλυμάτων με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 20 ng/mL και 2000 ng/mL. Τα πρότυπα διαλύματα διατηρούνταν στο ψυγείο (5°C) επί 1 εβδομάδα.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων στην περιοχή 290-380 nm και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε διαφορετική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, όπως περιγράφεται παραπάνω. Ως δείγμα αναφοράς (τυφλό δείγμα) χρησιμοποιούταν διάλυμα εκχύλισης. Ακολούθως, σχεδιάζονταν η καμπύλη αναφοράς συσχετίζοντας το βάθος της κοιλάδας στα 322,6 nm, όπως αυτό καταγραφόταν σε αυθαίρετες μονάδες, με τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων της ναταμυκίνης.

3.2.4 Επικύρωση της μεθόδου

Η επικύρωση της μεθόδου έγινε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Commission Decision 2002) χρησιμοποιώντας γιαούρτη που παρασκευάσαμε στο Εργαστήριο με αγελαδινό γάλα. Η μέθοδος αξιολογήθηκε με κριτήρια την ειδικότητα, τη γραμμικότητα, την ευαισθησία, την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη δυνατότητα εφαρμογής σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Επίσης, διερευνήθηκε η σταθερότητα διαλυμάτων της ναταμυκίνης σε όξινο περιβάλλον και σε διαφορετικές συνθήκες συντήρησης, καθώς και η σταθερότητα της ναταμυκίνης σε εκχύλισμα γιαούρτης που συντηρήθηκε στο περιβάλλον (παρουσία ή όχι φωτός), στο ψυγείο (5°C) και στην κατάψυξη (-20°C).

3.3 Πειραματισμοί με πρότυπα διαλύματα ναταμυκίνης

3.3.1 Επίδραση των συνθηκών συντήρησης των διαλυμάτων στη σταθερότητα της ναταμυκίνης

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα ναταμυκίνης συγκέντρωσης 1377 ng/mL σε ογκομετρικές φιάλες των 500 ml. Ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου / 1M

φωσφορικού οξέος σε αναλογία όγκων 10/1 και 10/2. Κάθε ένα από τα παραπάνω διαλύματα διαμοιράστηκε, ανά 25 ml, σε 20 γυάλινους βιδωτούς σωλήνες των 50 ml. Από τους 20 σωλήνες του κάθε διαλύματος, 5 συντηρήθηκαν στους $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ παρουσία φωτός (περιβάλλον εργαστηρίου), 5 συντηρήθηκαν στους $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ απουσία φωτός (σκοτεινός θάλαμος), 5 συντηρήθηκαν στους 5°C (ψυγείο) απουσία φωτός, και 5 συντηρήθηκαν στους -20°C (καταψύκτης) απουσία φωτός. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα αναλύθηκε φασματοφωτομετρικά τη στιγμή της παρασκευής του και στη συνέχεια μετά από 2, 4, 6, 8 και 10 ώρες, και 1, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75 και 90 ημέρες, υποβάλλοντας το φάσμα απορρόφησης σε διαφορική επεξεργασία 3^{ns} παραγώγου, όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.2).

3.4 Πειραματισμοί με ζυμωμένα γάλατα

3.4.1 Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης στο εκχύλισμα της γιαούρτης

Για την παρασκευή του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις (4) συσκευασίες, της ίδιας παρτίδας, παραδοσιακής γιαούρτης εμπορίου από κατσικίσιο γάλα, που περιείχαν ναταμικίνη σε συγκέντρωση $3430,7 \text{ ng/g}$. Ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος σε αναλογία όγκων 10/1 και 10/2. Παρασκευάστηκαν περίπου 500 mL εκχυλίσματος με κάθε έναν από τους δύο διαλύτες εκχύλισης, εφαρμόζοντας την κατεργασία που περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1). Κάθε ένα από τα εκχυλίσματα διαμοιράστηκε, ανά 25 ml περίπου, σε 20 γυάλινους βιδωτούς σωλήνες των 50 ml. Από τους σωλήνες αυτούς, 5 συντηρήθηκαν στους $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ παρουσία φωτός (περιβάλλον εργαστηρίου), 5 συντηρήθηκαν στους $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ απουσία φωτός, 5 συντηρήθηκαν στους 5°C (ψυγείο) απουσία φωτός, και 5 συντηρήθηκαν στους -20°C (καταψύκτης) απουσία φωτός. Το περιεχόμενο κάθε σωλήνα αναλύθηκε φασματοφωτομετρικά τη στιγμή της παρασκευής του και στη συνέχεια μετά από 2, 4, 6, 8 και 10 ώρες, και 1, 3, 7, 15, 30, 45, 60, 75 και 90 ημέρες, υποβάλλοντας το φάσμα απορρόφησης σε διαφορική επεξεργασία 3^{ns} παραγώγου, όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.2).

3.4.2 Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμικίνης κατά τη συντήρηση ζυμωμένων γαλάτων στο ψυγείο

Για τον έλεγχο της σταθερότητας χρησιμοποιήθηκαν ζυμωμένα γάλατα εμπορίου και συγκεκριμένα, παραδοσιακή γιαούρτη από κατσικίσιο γάλα, κεφίρ και ξινόγαλα που περιείχαν ναταμικίνη σε συγκέντρωση $2302,5 \text{ ng/g}$, $2411,7 \text{ ng/g}$ και $1095,0 \text{ ng/g}$, αντίστοιχα. Κάθε ένα από τα παραπάνω προϊόντα χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή 25 δειγμάτων

μεταφέροντας 3 g, περίπου, προϊόντος σε 25 βαθμολογημένους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 15 mL (από την παραδοσιακή γιαούρτη αφαιρούνταν πρώτα η «πέτσα»). Από τα 25 δείγματα κάθε προϊόντος, 5 αναλύθηκαν την ημέρα παρασκευής τους (ημέρα 0), ενώ τα υπόλοιπα 20 συντηρήθηκαν στους 5°C (ψυγείο) απουσία φωτός και αναλύθηκαν, ανά 5, μετά από 10, 20, 30 και 40 ημέρες. Η ναταμυκίνη εκχυλιζόταν και το εκχύλισμα αναλυόταν φασματοφωτομετρικά υποβάλλοντας το φάσμα απορρόφησης σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1 και 3.2.2).

3.5 Πειραματισμοί με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα

Διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου σε μια ποικιλία ζυμωμένων (κεφίρ, ξινόγαλα) και μη ζυμωμένων (ρυζόγαλο, κρέμα) γαλακτοκομικών προϊόντων.

3.6 Διερεύνηση της παρουσίας της ναταμυκίνης σε προϊόντα που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της παρουσίας της ναταμυκίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που παρασκευάζονται στην Ελλάδα και κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά, αναλύθηκαν 283 δείγματα ζυμωμένων και μη ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων εφαρμόζοντας τη μέθοδο όπως αυτή περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1 και 3.2.2).

Η δειγματοληψία αφορούσε ολόκληρη τη συσκευασία του προϊόντος και γινόταν σε καταστήματα πώλησης τροφίμων κατά το χρονικό διάστημα μεταξύ Οκτωβρίου 2022 και Ιανουαρίου 2023. Τα δείγματα μεταφέρονταν, κάτω από συνθήκες ψύξης, στο Εργαστήριο Ασφάλειας και Ποιότητας του Γάλακτος και των Προϊόντων του, του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, και υποβάλλονταν την ίδια ημέρα σε χημική ανάλυση. Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν αφορούσαν διαφορετικές παρτίδες του προϊόντος.

3.7 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, 99 IL). Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία της ανάλυσης των διακυμάνσεων (Anova) με ή χωρίς μετασχηματισμό των στοιχείων. Η ομοιογένεια των διακυμάνσεων ελέγχθηκε με το Levene's test.

4. Αποτελέσματα και συζήτηση

4.1 Εκχύλιση της ναταμυκίνης από τη γιαούρτη

Για την εκχύλιση της ναταμυκίνης από τη γιαούρτη διερευνήθηκε η εκχυλιστική ικανότητα της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου. Κατά τη διενέργεια προκαταρκτικών πειραματισμών με μεθανόλη και μίγμα μεθανόλης / 1M φωσφορικού οξέος σε αναλογία όγκων 10/1 και 10/2, διαπιστώθηκε ότι και τα τρία εκχυλιστικά μέσα εκχύλιζαν ποσοτικά την ναταμυκίνη από δείγματα γιαούρτης. Η καθαρή μεθανόλη, όμως, είναι πολύ πτητική για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, ενώ τόσο αυτή όσο και τα μίγματά της με 1M φωσφορικό οξύ έδιναν, συνήθως, θολά εκχυλίσματα. Για την εξουδετέρωση του προβλήματος ορισμένοι ερευνητές, πειραματιζόμενοι σε τυριά (de Ruig et al. 1987, Rybińska et al. 1997, Paseiro-Cerrato et al. 2013, Vierikova et al. 2013) ή γιαούρτη (Bilgic Alkaya and Karalomlu 2016, Li et al. 2020), εφάρμοσαν χρονοβόρες εκχυλίσεις και καθίζηση των ουσιών, που παρεμβάλουν στη μέτρηση, με κατάψυξη του εκχυλίσματος στους -20°C επί 60 λεπτά.

Στη δική μας έρευνα, τα μειονεκτήματα της μεθανόλης περιορίστηκαν σημαντικά όταν αυτή αντικαταστάθηκε από το ακετονιτρίλιο. Το τελευταίο, όμως, στην καθαρή του μορφή, δεν μπορούσε να εκχυλίσει περισσότερο από 85% της περιεχόμενης ναταμυκίνης στη γιαούρτη, ενώ με τη μορφή των μιγμάτων του με 1M φωσφορικό οξύ σε αναλογία όγκων 10/1 και 10/2, αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματικό εκχυλιστικό μέσο, με την προϋπόθεση τα δείγματα να είχαν οξινιστεί σε pH < 3,75 και να είχαν ομογενοποιηθεί με μηχανικό αναδευτήρα για 1 min, τουλάχιστον. Από τα δύο διαλύματα εκχύλισης επιλέχθηκε το μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος 10/1 γιατί έδινε διαυδέστερα εκχυλίσματα και η ναταμυκίνη εμφάνιζε μεγαλύτερη σταθερότητα (Πίνακες 3 και 4). Με την προσθήκη του εν λόγω διαλύματος εκχύλισης το pH του δείγματος γιαούρτης ρυθμιζόταν στην τιμή 2,8.

Πίνακας 3. Μεταβολή της συγκέντρωσης πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης (1377 ng/ml) σε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα Α) και 10/2 (διάλυμα Β), κατά τη συντήρηση σε συνθήκες περιβάλλοντος

Χρόνος (ώρες)	Μεταβολή συγκέντρωσης % (μέση τιμή) ± SD*			
	Διάλυμα Α		Διάλυμα Β	
	Φως, 20°C	Σκοτάδι, 20°C	Φως, 20°C	Σκοτάδι, 20°C
0	0,00	0,00	0,00	0,00
2	-0,90 ± 2,11 ^{aAB}	0,30 ± 0,90 ^{aA}	-3,29 ± 1,94 ^{aB}	-1,20 ± 0,90 ^{aAB}
4	-2,10 ± 1,31 ^{aAC}	-0,10 ± 0,3γ1 ^{aB}	-4,53 ± 1,99 ^{aC}	-1,70 ± 0,60 ^{abA}
6	-2,56 ± 1,32 ^{aAC}	-0,25 ± 0,31 ^{aB}	-4,95 ± 2,02 ^{aC}	-2,03 ± 0,67 ^{abA}
8	-2,94 ± 1,40 ^{aAC}	-0,50 ± 0,46 ^{aB}	-5,55 ± 1,99 ^{aC}	-2,45 ± 0,80 ^{abA}
10	-3,27 ± 1,51 ^{aAC}	-0,85 ± 0,53 ^{aB}	-5,91 ± 1,85 ^{aC}	-2,96 ± 0,69 ^{abA}

* 5 επαναλήψεις.

a,b Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0,05).

A,B,C Μέσοι όροι στην ίδια σειρά με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0,05).

Πίνακας 4. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης σε εκχυλίσματα γιαούρτης εμπορίου, που περιείχε 3430,7 ng ναταμυκίνης/g, κατά τη συντήρηση σε συνθήκες περιβάλλοντος. Ως διάλυμα εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα Α) και 10/2 (διάλυμα Β)

Χρόνος (ώρες)	Μεταβολή συγκέντρωσης % (μέση τιμή) ± SD*			
	Διάλυμα Α		Διάλυμα Β	
	Φως, 20°C	Σκοτάδι, 20°C	Φως, 20°C	Σκοτάδι, 20°C
0	0,00	0,00	0,00	0,00
2	-1,39 ± 1,28 ^{aA}	0,14 ± 1,69 ^{aA}	-1,10 ± 1,04 ^{aA}	-1,38 ± 1,67 ^{aA}
4	-3,21 ± 1,05 ^{abA}	-0,56 ± 1,74 ^{aA}	-3,31 ± 1,24 ^{abA}	-1,93 ± 1,04 ^{aA}
6	-4,74 ± 1,18 ^{bcA}	0,14 ± 0,24 ^{aB}	-5,61 ± 1,25 ^{bcA}	-0,42 ± 1,10 ^{aB}
8	-6,00 ± 1,10 ^{cdA}	-0,42 ± 1,26 ^{aB}	-7,98 ± 1,70 ^{cdA}	-0,00 ± 1,09 ^{aB}
10	-7,74 ± 1,16 ^{dA}	0,14 ± 0,87 ^{aB}	-10,38 ± 1,27 ^{dC}	-0,68 ± 2,28 ^{aB}

* 5 επαναλήψεις.

a,b,c,d Μέσοι όροι στην ίδια στήλη με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0,05).

A,B,C Μέσοι όροι στην ίδια σειρά με διαφορετικό γράμμα στον εκθέτη διαφέρουν σημαντικά (P≤0,05).

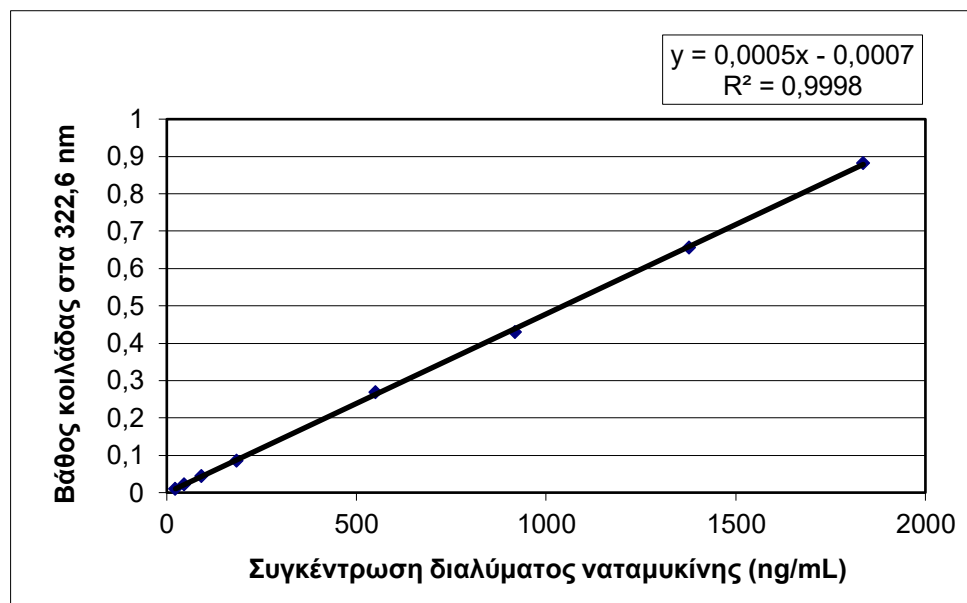
4.2 Καμπύλη αναφοράς – φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3^{ης} παραγώγου πρότυπων διαλυμάτων

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς καταγράφονταν τα φάσματα απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων στην περιοχή 290-380 nm και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου. Η καμπύλη αναφοράς κατασκευαζόταν συσχετίζοντας το βάθος της κοιλάδας στα 322,6 nm, όπως αυτό καταγραφόταν σε αυθαίρετες μονάδες, με τη συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων της ναταμυκίνης.

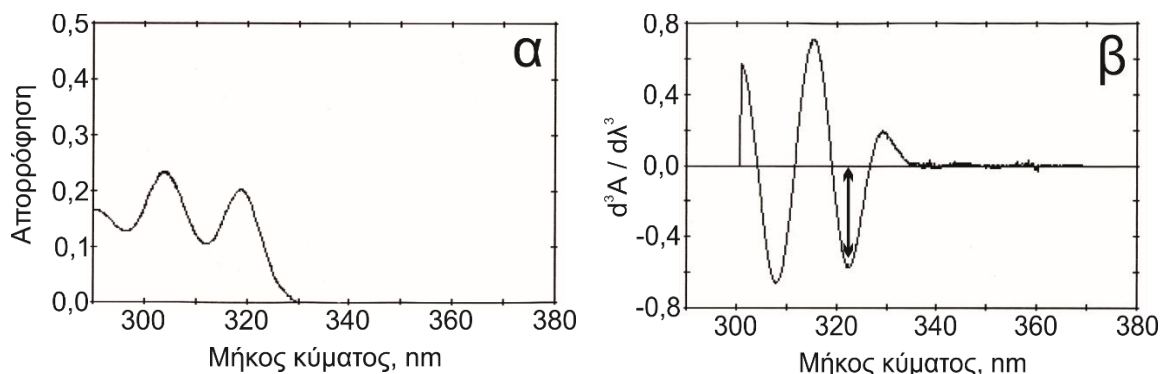
Πίνακας 5. Βάθος της κοιλάδας στα 322,6 nm των φασμάτων 3^{ης} παραγώγου πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης

Συγκέντρωση πρότυπων διαλυμάτων (ng/ml)	Βάθος κοιλάδας (322,6 nm)
22,95	0,010
45,9	0,022
91,8	0,045
183,6	0,086
550,8	0,269
918,0	0,430
1377,0	0,657
1836,0	0,883

Στον πίνακα 5 καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων της ναταμικίνης και τα αντίστοιχα βάρη των κοιλάδων στα 322,6 nm, ενώ στο σχήμα 2 απεικονίζεται η καμπύλη αναφοράς της ναταμικίνης και στο σχήμα 3 το φάσμα απορρόφησης στην περιοχή 290-380 nm και το αντίστοιχο φάσμα 3^{ης} παραγώγου πρότυπου διαλύματος ναταμικίνης.



Σχήμα 2. Καμπύλη αναφοράς της ναταμικίνης.

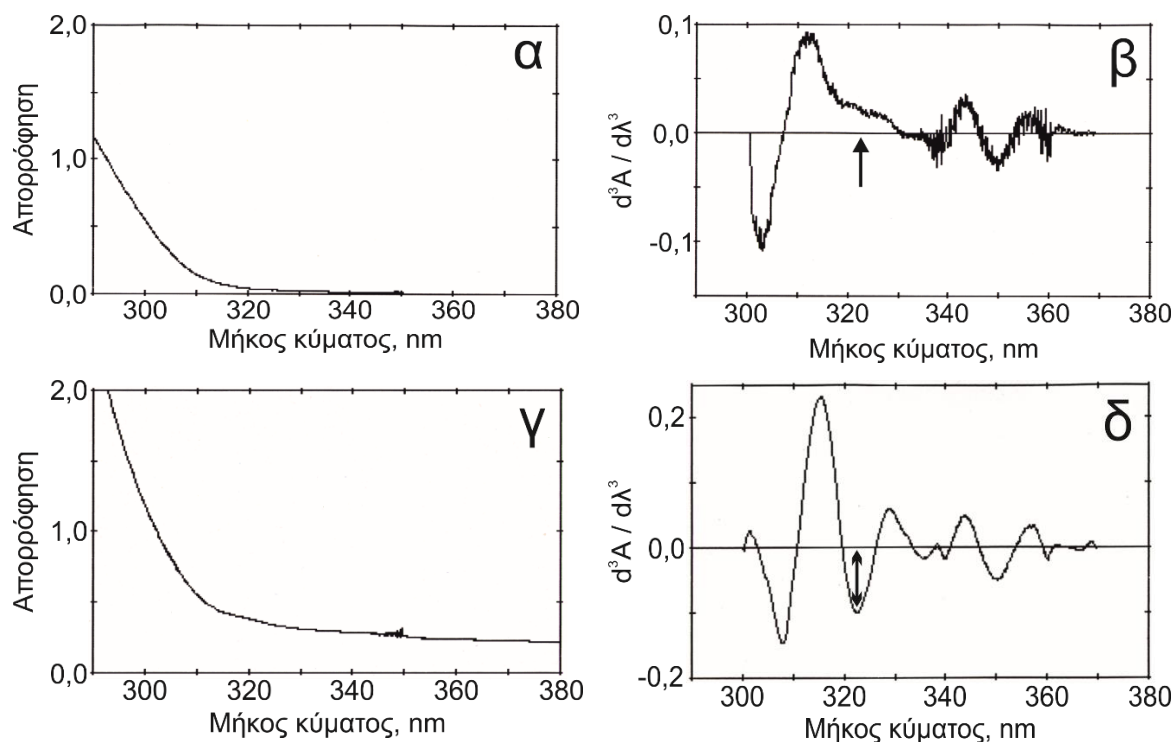


Σχήμα 3. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) πρότυπου διαλύματος ναταμικίνης.

4.3 Φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3^{ης} παραγώγου γιαούρτης

Για την κατασκευή των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε γιαούρτη που παρασκευάσαμε στο Εργαστήριο με αγελαδινό γάλα. Η διαδικασία εκχύλισης της γιαούρτης διενεργούταν όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1) και τα εκχυλίσματα αναλύονταν

φασματοφωτομετρικά, καταγράφοντας τα φάσματα απορρόφησης, στην περιοχή 290-380 nm και υποβάλλοντάς τα, στη συνέχεια, σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.2). Στο σχήμα 4 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης λευκού δείγματος γιαούρτης και δείγματος γιαούρτης επιβαρυμένου με 606 ng ναταμικίνης/g, καθώς επίσης και τα αντίστοιχα φάσματα 3^{ης} παραγώγου.



Σχήμα 4. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) λευκού δείγματος γιαούρτης. Φάσμα απορρόφησης (γ) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (δ) επιβαρυμένου (606 ng/g) δείγματος γιαούρτης.

4.4 Επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού ναταμικίνης σε γιαούρτη

4.4.1 Προσδιορισμός της ναταμικίνης σε γιαούρτη

Κατασκευαζόταν καμπύλη αναφοράς καταγράφοντας τα φάσματα απορρόφησης των πρότυπων διαλυμάτων στην περιοχή 290-380 nm και υποβάλλοντάς τα, στη συνέχεια, σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, όπως περιγράφηκε παραπάνω (βλέπε 4.2). Η ανάλυση παλινδρόμησης των δεδομένων που ελήφθησαν έδειξε ότι η καμπύλη αναφοράς της ναταμικίνης ήταν γραμμική στο εύρος συγκεντρώσεων που εξετάστηκε (22,95 έως 1836,0 ng/ml). Έτσι η καμπύλη αναφοράς, που βασίστηκε σε οκτώ σημεία δεδομένων, θα μπορούσε να περιγραφεί με την εξίσωση $y = -0,0007 + 0,0005x$ ($r^2 = 0,9998$), όπου y είναι

το βάθος της κοιλάδας στα 322,6 nm, όπως αυτό καταγραφόταν σε αυθαίρετες μονάδες, και x είναι η συγκέντρωση των πρότυπων διαλυμάτων της ναταμικίνης.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ναταμικίνης στη γιαούρτη (ng/g, ppb) γινόταν εφαρμόζοντας την παρακάτω σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση ναταμικίνης (ng/g)} = \frac{C \times V \times 10}{W}$$

Όπου C είναι η συγκέντρωση της ναταμικίνης (ng/mL) στο εκχύλισμα της δείγματος, σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς, V είναι ο βαθμός αραιώσης (εάν αραιωνόταν το εκχύλισμα του δείγματος) και W είναι το βάρος του δείγματος.

4.4.2 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικού προσδιορισμού

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου, που ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας (ναταμικίνη) στη γιαούρτη για την οποία είναι δυνατό να συναχθεί η παρουσία της με εύλογη στατιστική βεβαιότητα, καθορίστηκε σε 151,5 ng/g (Πίνακας 6).

Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου, που ορίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας (ναταμικίνη) στη γιαούρτη για την οποία η επαναληψιμότητα (εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση) είναι μικρότερη ή ίση με 16% και η μέση ανάκτηση είναι εντός της περιοχής 80 έως 110% (Commission Decision 2002) προσδιορίστηκε σε 303 ng/g (Πίνακας 6).

4.4.3 Ακρίβεια της μεθόδου

Ως ακρίβεια νοείται η εγγύτητα μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς (Commission Decision 2002). Κριτήριο, επομένως, εκτίμησης της ακρίβειας αποτελεί ουσιαστικά η ανάκτηση της μεθόδου (recovery), δεδομένου ότι αυτή νοείται ως το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία (Commission Decision 2002).

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε γιαούρτη που παρασκευάσαμε στο Εργαστήριο με αγελαδινό γάλα. Δείγματα γιαούρτης βάρους 3 g επιβαρύνθηκαν με ναταμικίνη σε επτά (7) διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης και υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, σε επεξεργασία και ανάλυση όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1 και 3.2.2). Τα επτά (7) επίπεδα συγκέντρωσης επιλέχθηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύπτουν, κατά το δυνατόν, το εύρος των συγκεντρώσεων της ναταμικίνης που

αναμένονταν να προσδιοριστούν σε δείγματα γιαούρτης και άλλων ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (ξινόγαλο – αριάνι, κεφίρ), που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης διενεργήθηκαν έξι (6) επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων για τη γιαούρτη παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα φαίνεται ότι, η συνολική ανάκτηση της μεθόδου και κατά συνέπεια η ακρίβεια που χαρακτηρίζει τη μέθοδο που αναπτύξαμε για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης στη γιαούρτη, ήταν $99,6 \pm 8,3\%$.

Πίνακας 6. Δεδομένα ακρίβειας της μεθόδου για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε γιαούρτη με διαφορική φασματοφωτομετρία 3^{ης} παραγώγου

Επίπεδο επιβάρυνσης (ng/g)	Μέση συγκέντρωση (ng/g) που βρέθηκε \pm SD*	Σχετική τυπική απόκλιση (%)	Μέση ανάκτηση \pm SD* (%)	Συνολική ανάκτηση \pm SD (%)
151,5	152,2 \pm 28,1	18,5	100,5 \pm 18,6	
303,0	294,8 \pm 27,6	9,4	97,3 \pm 9,1	
606,0	628,1 \pm 35,4	5,6	103,7 \pm 5,8	
1212,0	1204,1 \pm 56,5	4,7	99,3 \pm 4,7	99,6 \pm 8,3
1818,0	1837,4 \pm 83,6	4,6	101,1 \pm 4,6	
3030,0	2968,9 \pm 97,6	3,3	98,0 \pm 3,2	
6060,0	5905,9 \pm 231,6	3,9	97,5 \pm 3,8	

* 6 επαναλήψεις.

4.4.4 Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου μπορεί να εκτιμηθεί από την τυπική ή τη σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων προσδιορισμών που αποκτώνται επί ταυτόσημων δειγμάτων, με την ίδια αναλυτική διαδικασία, τα ίδια αντιδραστήρια, στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο τεχνολογικό εξοπλισμό (Commission Decision 2002).

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε γιαούρτη που παρασκευάσαμε στο Εργαστήριο με αγελαδινό γάλα. Δείγματα γιαούρτης βάρους 3 g επιβαρύνθηκαν σε τρία (3) διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης και υποβλήθηκαν, στη συνέχεια, σε επεξεργασία και ανάλυση όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1 και 3.2.2). Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές, αλλά σε διαφορετικές ημέρες. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης διενεργήθηκαν έξι (6) επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις τριών διαφορετικών ημερών για τη γιαούρτη παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Δεδομένα επαναληψιμότητας της μεθόδου για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε γιαούρτη με διαφορετική φασματοφωτομετρία 3^{ης} παραγώγου

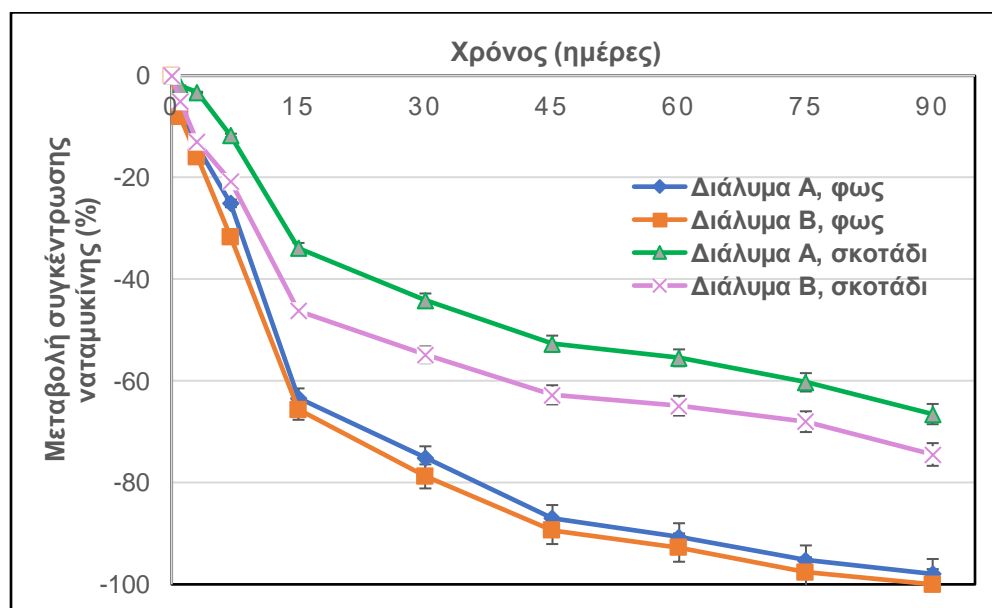
Επίπεδο επιβάρυνσης (ng/g)	Μέση* συγκέντρωση που βρέθηκε ± SD (ng/g)			Σχετική τυπική απόκλιση (%)			Συνολική σχετική τυπική απόκλιση (%)
	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	1 ^η ημέρα	2 ^η ημέρα	3 ^η ημέρα	
606,0	628,1 ± 35,4	601,5 ± 43,0	610,7 ± 39,4	5,6	7,1	6,4	
1212,0	1204,1 ± 56,5	1201,5 ± 63,8	1220,0 ± 75,4	4,7	5,3	6,2	5,1
1818,0	1837,4 ± 83,6	1823,7 ± 63,0	1795,9 ± 60,2	4,6	3,5	3,4	

* 6 επαναλήψεις.

4.5 Πειραματισμοί με πρότυπα διαλύματα ναταμυκίνης

4.5.1 Επίδραση του pH και των συνθηκών συντήρησης στη σταθερότητα πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης

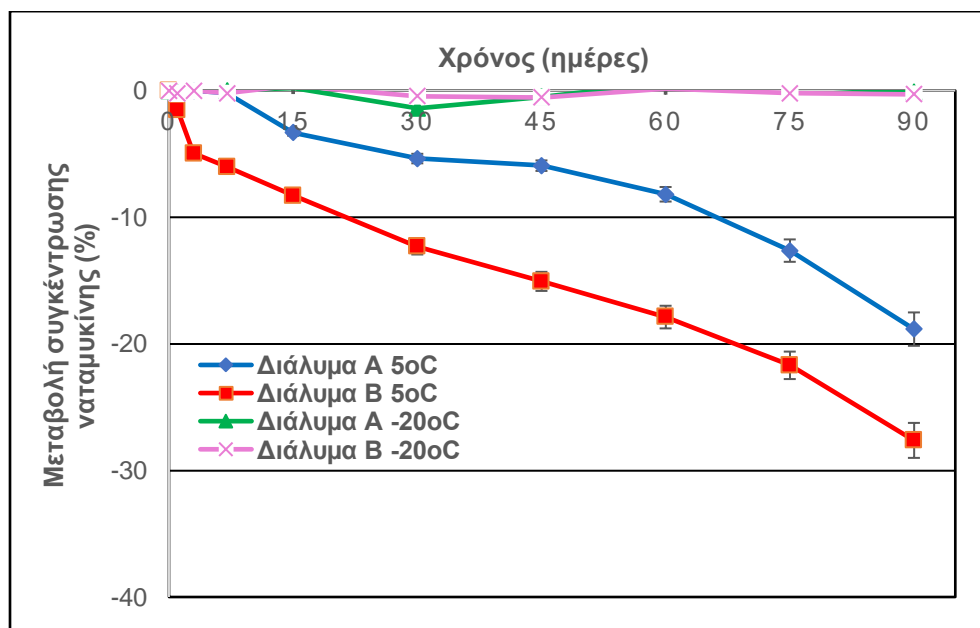
Στον πίνακα 3 και στο σχήμα 5 φαίνεται η επίδραση του φωτός στη σταθερότητα της ναταμυκίνης, κατά τη συντήρηση πρότυπων διαλυμάτων στη θερμοκρασία των 20°C. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 και 10/2, και pH 1,5 και 1,4, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο το pH όσο και η παρουσία φωτός επηρεάζουν σημαντικά ($P \leq 0,05$) τη σταθερότητα της ναταμυκίνης, γεγονός το οποίο σημειώνεται και από τους Meena et al. (2021). Ειδικότερα, όπως φαίνεται στον πίνακα 3, κατά τις πρώτες 10 ώρες συντήρησης στη θερμοκρασία των 20°C η ναταμυκίνη παρουσιάζει σχετική σταθερότητα. Μεγαλύτερη σταθερότητα διαπιστώθηκε όταν τα πρότυπα διαλύματα ναταμυκίνης παρασκευάστηκαν σε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (pH 1,5) και συντηρήθηκαν απουσία φωτός. Η συντήρηση των διαλυμάτων ναταμυκίνης παρουσία φωτός είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης, σε σχέση με τα διαλύματα που συντηρούνταν απουσία φωτός, η μείωση όμως της συγκέντρωσης δεν επηρεαζόταν σημαντικά από το pH των διαλυμάτων. Αντίθετα, η μείωση της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης επηρεαζόταν σημαντικά ($P \leq 0,05$) από το pH των πρότυπων διαλυμάτων όταν αυτά συντηρούνταν απουσία φωτός.



Σχήμα 5. Μεταβολή της συγκέντρωσης πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης (1377 ng/mL) σε μίγμα ακετονιτριλίου/1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα Α) και 10/2 (διάλυμα Β), κατά τη συντήρηση στους 20°C, παρουσία ή απουσία φωτός (n=5).

Κατά τη συντήρηση των πρότυπων διαλυμάτων στη θερμοκρασία των 20°C για χρονικό διάστημα 90 ημερών διαπιστώθηκε (Σχήμα 5) ότι η παρουσία φωτός είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης, σε σχέση με τα διαλύματα που συντηρούνταν απουσία φωτός, η μείωση όμως της συγκέντρωσης δεν επηρεαζόταν σημαντικά από το pH των διαλυμάτων, με εξαίρεση την έβδομη ημέρα συντήρησης. Από το ίδιο σχήμα φαίνεται ότι η διάσπαση της ναταμυκίνης ολοκληρώνεται μετά από συντήρηση 90 ημερών, στους 20°C παρουσία φωτός. Τα αποτελέσματα της μελέτης μας συμφωνούν με εκείνα των Koontz et al. (2003) και Nihad and Salami (2017).

Η μείωση, όμως, της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης επηρεαζόταν σημαντικά ($P \leq 0,05$) από το pH των πρότυπων διαλυμάτων όταν αυτά συντηρούνταν απουσία φωτός. Ο μεγαλύτερος ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης παρατηρήθηκε τις πρώτες 15 ημέρες μετά την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων (Σχήμα 5).



Σχήμα 6. Μεταβολή της συγκέντρωσης πρότυπων διαλυμάτων ναταμυκίνης (1377 ng/mL) σε μίγμα ακετονιτριλίου/1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα A) και 10/2 (διάλυμα B), κατά τη συντήρηση στους 5°C και στους -20°C, απουσία φωτός (n=5).

Αντίθετα με τους 20°C, η διατήρηση των πρότυπων διαλυμάτων της ναταμυκίνης στους 5°C, απουσία φωτός, επιμηκύνει σημαντικά το χρόνο συντήρησής τους. Ειδικότερα, η ναταμυκίνη παραμένει σταθερή κατά τη συντήρηση επί 7 ημέρες στους 5°C, όταν είναι

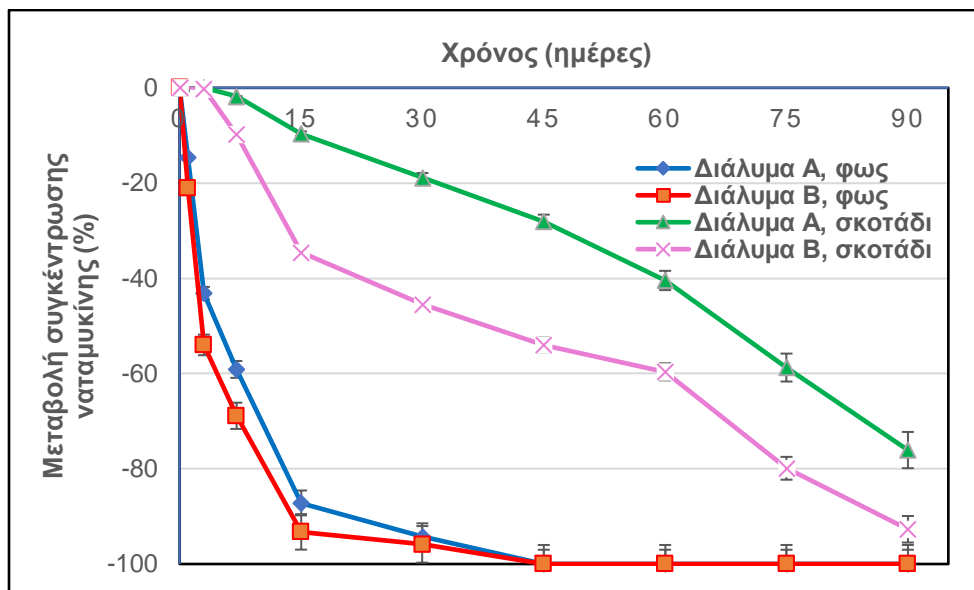
διαλυμένη σε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (pH 1,5) (Σχήμα 6). Μετά την έβδομη ημέρα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης η οποία είναι σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερη στα διαλύματα που ήταν παρασκευασμένα σε μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/2 (pH 1,4). Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με εκείνα των Koontz et al. (2003).

Όλα τα διαλύματα της ναταμυκίνης εμφάνισαν μεγάλη σταθερότητα όταν συντηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C) επί 90 ημέρες, απουσία φωτός (Σχήμα 6).

4.6 Πειραματισμοί με ζυμωμένα γάλατα

4.6.1 Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμυκίνης στο εκχύλισμα της γιαούρτης

Τα αποτελέσματα της διερεύνησης της σταθερότητας της ναταμυκίνης στο εκχύλισμα της γιαούρτης φαίνονται στον πίνακα 4 και στα σχήματα 7 και 8. Στον πίνακα 4 και στο σχήμα 7 φαίνεται η επίδραση του φωτός στη σταθερότητα της ναταμυκίνης, κατά τη συντήρηση εκχυλισμάτων γιαούρτης στη θερμοκρασία των 20°C . Για την παρασκευή των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε παραδοσιακή κασικίσια γιαούρτη εμπορίου που περιείχε 3430,7 ng/g ναταμυκίνης. Ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν μίγματα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος σε αναλογία όγκων 10/1 (pH εκχυλίσματος 2,8) και 10/2 (pH εκχυλίσματος 2,5). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η παρουσία φωτός επηρεάζει σημαντικά ($P \leq 0,05$) τη σταθερότητα της ναταμυκίνης. Ειδικότερα, όπως φαίνεται στον πίνακα 4, κατά τις πρώτες 10 ώρες συντήρησης στη θερμοκρασία των 20°C η ναταμυκίνη παρουσιάζει σχετική σταθερότητα. Μεγαλύτερη σταθερότητα διαπιστώθηκε όταν τα εκχυλίσματα συντηρήθηκαν απουσία φωτός. Η συντήρηση των εκχυλισμάτων γιαούρτης παρουσία φωτός είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης, σε σχέση με τα διαλύματα που συντηρούνταν απουσία φωτός, η μείωση όμως της συγκέντρωσης δεν επηρεαζόταν σημαντικά ($P > 0,05$) από το pH των εκχυλισμάτων.

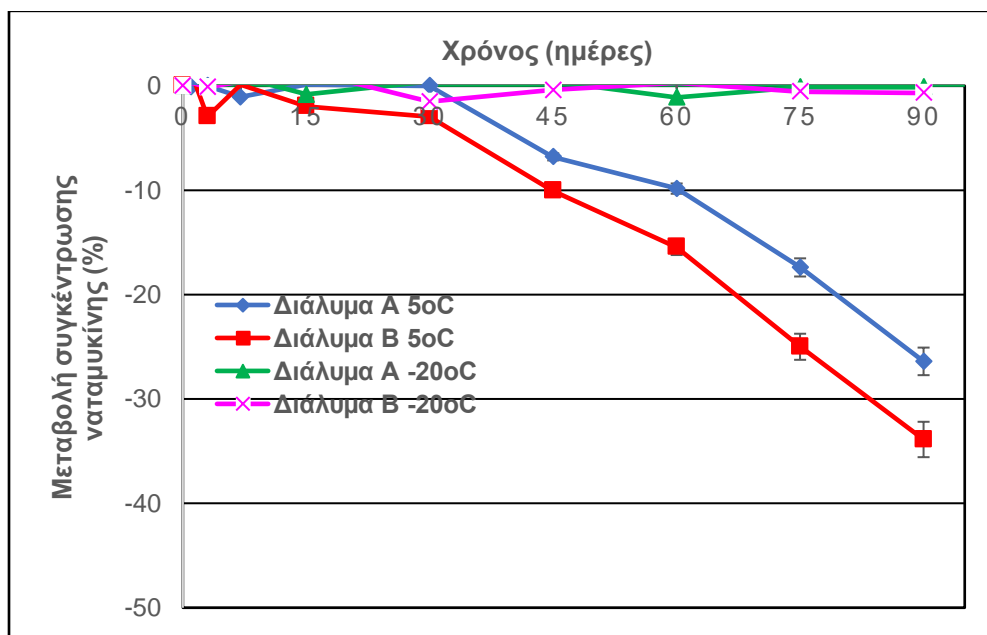


Σχήμα 7. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ναταμικίνης σε εκχυλίσματα γιαούρτης εμπορίου, που περιείχε 3430,7 ng ναταμικίνης/g, κατά τη συντήρηση στους 20°C, παρουσία ή απουσία φωτός. Ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτριλίου/1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα Α) και 10/2 (διάλυμα Β) (n=5).

Κατά τη συντήρηση των εκχυλισμάτων γιαούρτης στη θερμοκρασία των 20°C για χρονικό διάστημα 90 ημερών διαπιστώθηκε (Σχήμα 7) ότι η παρουσία φωτός είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερο ποσοστό μείωσης της συγκέντρωσης της ναταμικίνης, σε σχέση με τα εκχυλίσματα που συντηρούνταν απουσία φωτός, η μείωση όμως της συγκέντρωσης δεν επηρεαζόταν σημαντικά από το pH των εκχυλισμάτων, με εξαίρεση τις πρώτες επτά ημέρες συντήρησης. Από το ίδιο σχήμα φαίνεται ότι η διάσπαση της ναταμικίνης ολοκληρωνόταν μετά από συντήρηση 45 ημερών, στους 20°C παρουσία φωτός. Η μείωση της συγκέντρωσης της ναταμικίνης επηρεαζόταν σημαντικά ($P \leq 0,05$) από το pH των εκχυλισμάτων της γιαούρτης, όταν αυτά συντηρούνταν απουσία φωτός, με τη μείωση να είναι μεγαλύτερη όταν ως διάλυμα εκχύλισης χρησιμοποιούταν μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος σε αναλογία όγκων 10/2 (pH εκχυλίσματος 2,5).

Αντίθετα με τους 20°C, η διατήρηση των εκχυλισμάτων γιαούρτης στους 5°C επιμηκύνει σημαντικά το χρόνο συντήρησής τους. Ειδικότερα, η ναταμικίνη παραμένει σταθερή κατά τη συντήρηση επί 30 ημέρες στους 5°C, όταν ως διάλυμα εκχύλισης χρησιμοποιούταν μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (pH εκχυλίσματος 2,8) (Σχήμα 8). Μετά την τριακοστή ημέρα παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης της ναταμικίνης η οποία είναι σημαντικά ($P \leq 0,05$) μεγαλύτερη στα

εκχυλίσματα που προέκυψαν από τη χρησιμοποίηση μίγματος ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/2 (pH εκχυλίσματος 2,5).

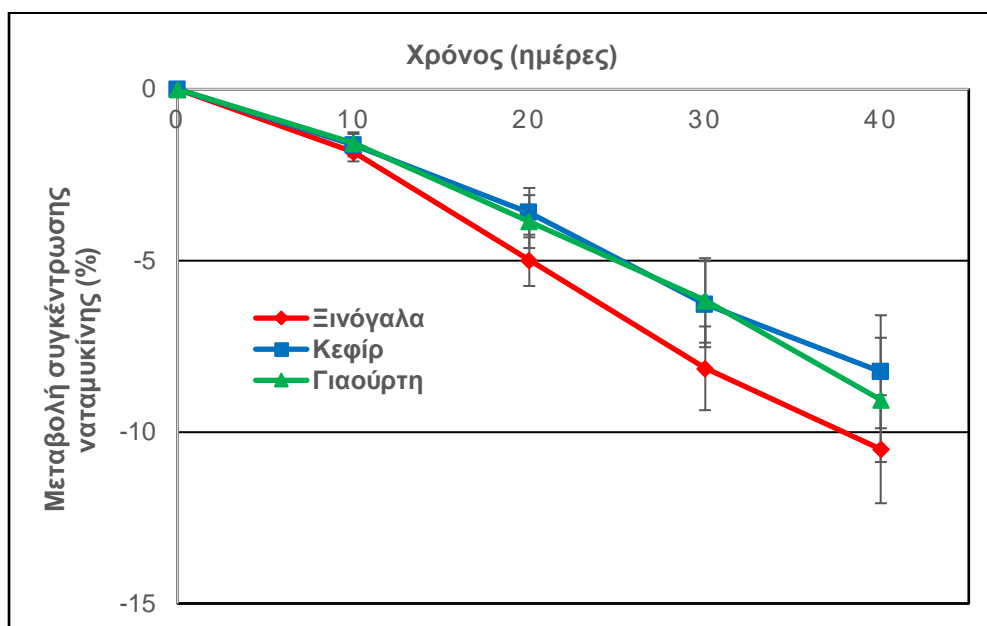


Σχήμα 8. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης σε εκχυλίσματα γιαούρτης εμπορίου, που περιείχε 3430,7 ng ναταμυκίνης/g, κατά τη συντήρηση στους 5°C και στους -20°C, απουσία φωτός. Ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτριλίου/1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1 (διάλυμα Α) και 10/2 (διάλυμα Β) (n=5).

Η ναταμυκίνη εμφάνισε μεγάλη σταθερότητα σε όλα τα εκχυλίσματα γιαούρτης όταν αυτά συντηρήθηκαν στην κατάψυξη (-20°C) επί 90 ημέρες (Σχήμα 8).

4.6.2 Διερεύνηση της σταθερότητας της ναταμυκίνης κατά τη συντήρηση ζυμωμένων γαλάτων στο ψυγείο

Από τη μελέτη του σχήματος 9 φαίνεται ότι η ναταμυκίνη ήταν αρκετά σταθερή κατά τη συντήρηση των ζυμωμένων γαλάτων (γιαούρτη, ξινόγαλα, κεφίρ) στο ψυγείο (5°C) επί 40 ημέρες, απουσία φωτός, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των Nihad and Salami (2017). Η εκατοστιαία μείωση της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης, κατά τη συντήρηση των ζυμωμένων γαλάτων στο ψυγείο επί 40 ημέρες, υπολογίστηκε σε 9,06%, 8,24% και 10,50%, για τη γιαούρτη, το κεφίρ και το ξινόγαλα, αντίστοιχα. Εντούτοις, η μεταβολή της συγκέντρωσης της ναταμυκίνης μεταξύ των προϊόντων αυτών δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική ($P > 0,05$) διαφορά. Να σημειωθεί ότι η μέση τιμή του pH που μετρήθηκε ήταν 4,2 στη γιαούρτη, και 4,3 στο ξινόγαλα και στο κεφίρ.

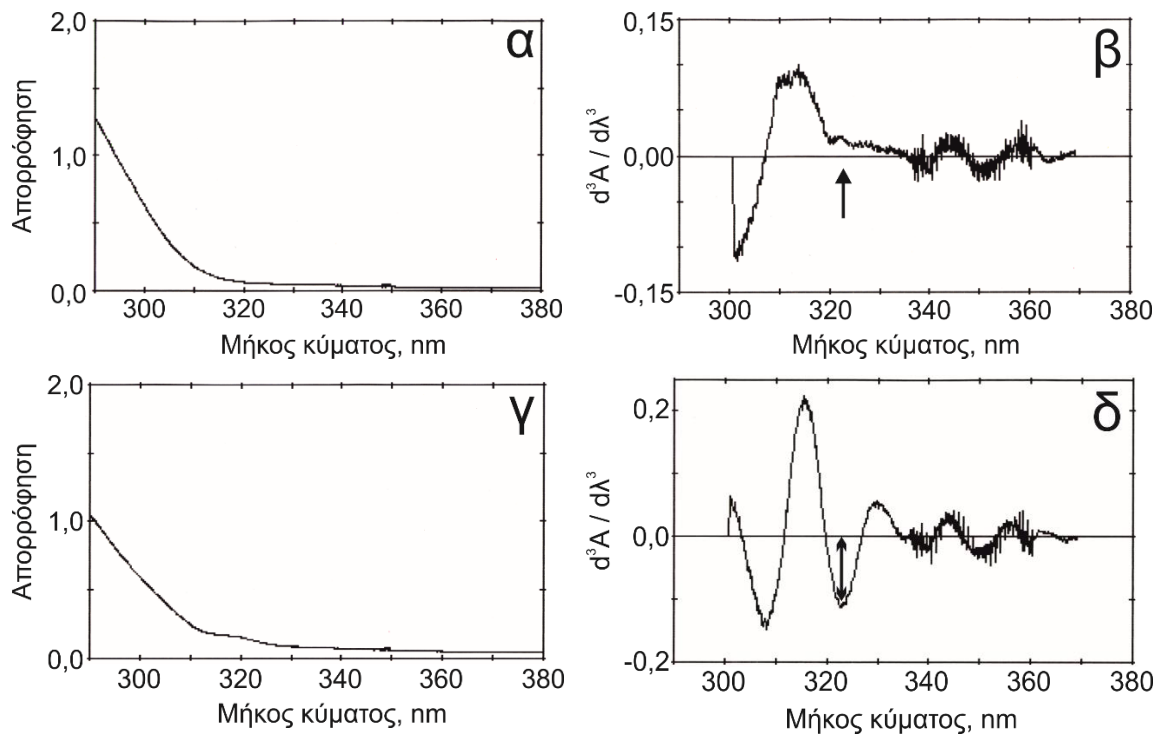


Σχήμα 9. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ναταμικίνης σε ζυμωμένα γάλατα εμπορίου κατά τη συντήρηση στους 5°C, απουσία φωτός (n=5).

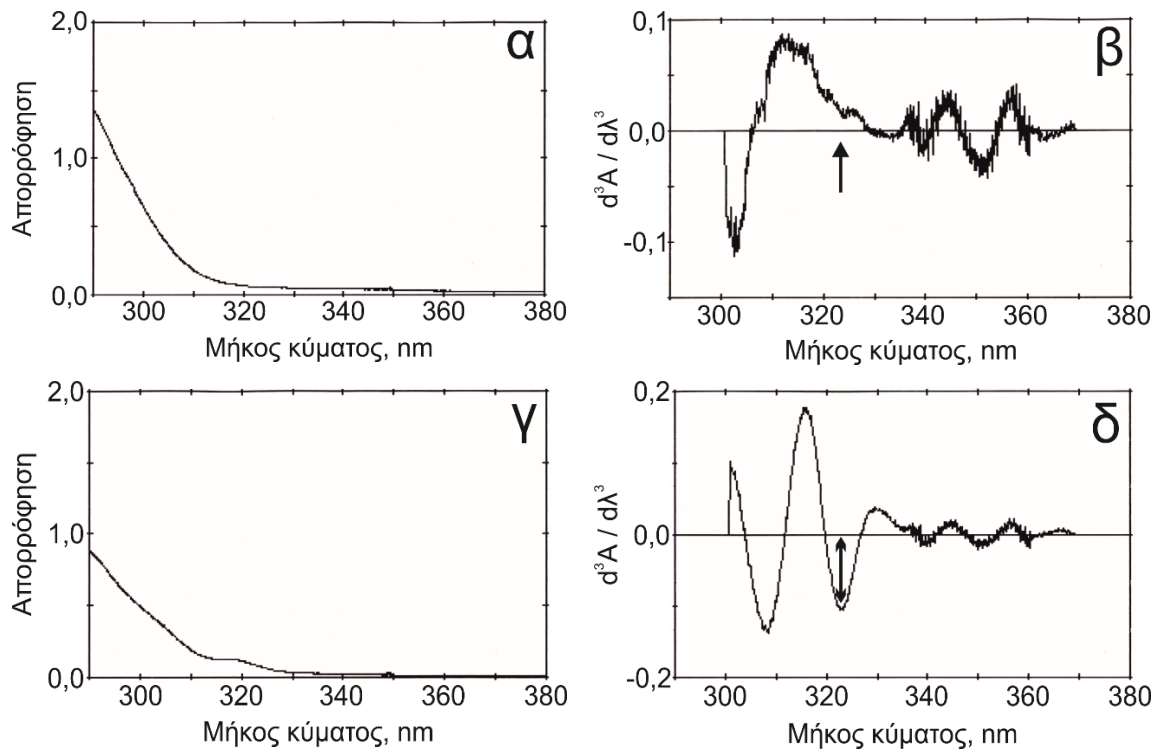
4.7 Πειραματισμοί με άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα

Διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου που διαμορφώσαμε και σε άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, στα οποία θα μπορούσε να προστεθεί ναταμικίνη ως συντηρητικό. Ως τέτοια προϊόντα επιλέχθηκαν το κεφίρ, το ξινόγαλα (αριάνι), το ρυζόγαλο και η κρέμα. Η επεξεργασία των δειγμάτων και η φασματοφωτομετρική ανάλυσή τους διενεργήθηκε όπως περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 3.2.1 και 3.2.2). Λόγω των καλών αναλυτικών χαρακτηριστικών της μεθόδου δεν παρατηρήθηκαν παρεμβολές στη μέτρηση από ουσίες του δείγματος, ακόμη και στην περίπτωση που το δείγμα περιείχε φρούτα, σοκολάτα ή κανέλλα. Η ευαισθησία, η ανάκτηση και η επαναληψιμότητα της μεθόδου, για όλα τα προϊόντα που εξετάσαμε, διαπιστώθηκε ότι κυμαίνονταν εντός των ορίων που βρέθηκαν κατά την επικύρωση της μεθόδου που διαμορφώσαμε για τη γιαούρτη. Εξάιρεση αποτελεί η κρέμα για την οποία, σύμφωνα με την επικύρωση της μεθόδου, προέκυψε ευαισθησία που διέφερε από τα άλλα προϊόντα που εξετάστηκαν. Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού της ναταμικίνης για την κρέμα ορίστηκε στα 606 ng/g και 1212 ng/g, αντίστοιχα.

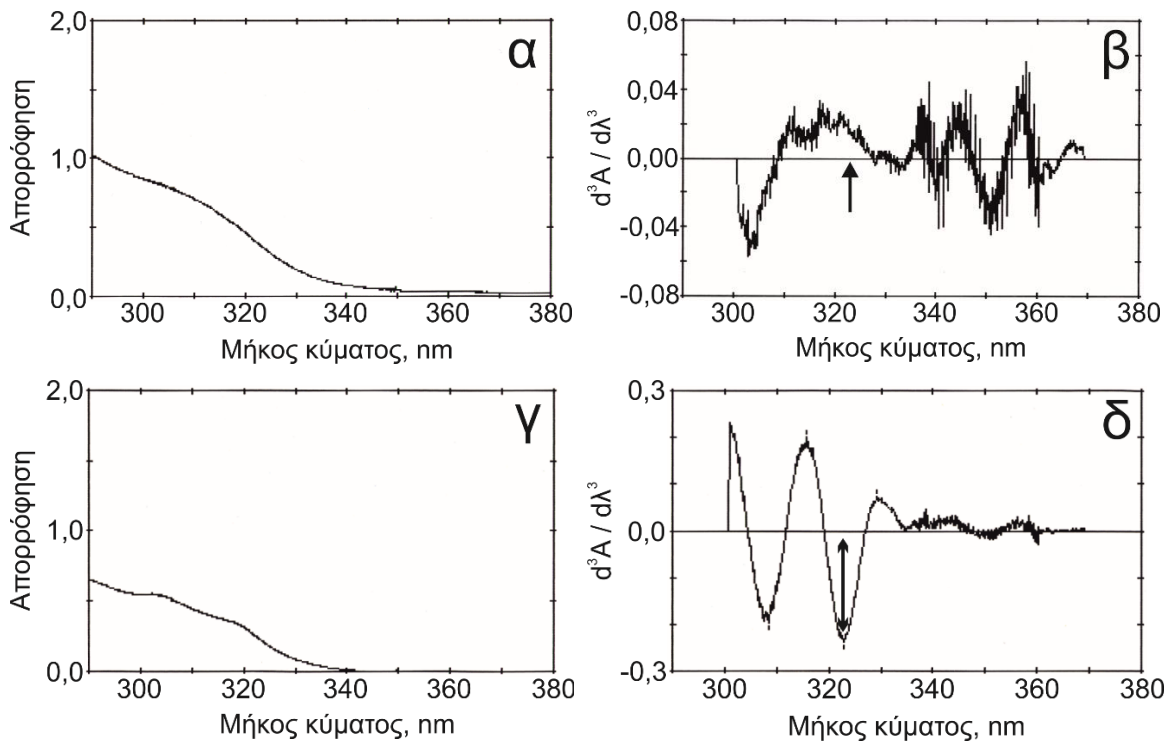
Στα σχήματα 10, 11, 12 και 13 απεικονίζονται φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3^{ης} παραγώγου λευκών και επιβαρυμένων με ναταμικίνη δειγμάτων κεφίρ, ξινογάλακτος, ρυζόγαλου και κρέμας, αντίστοιχα.



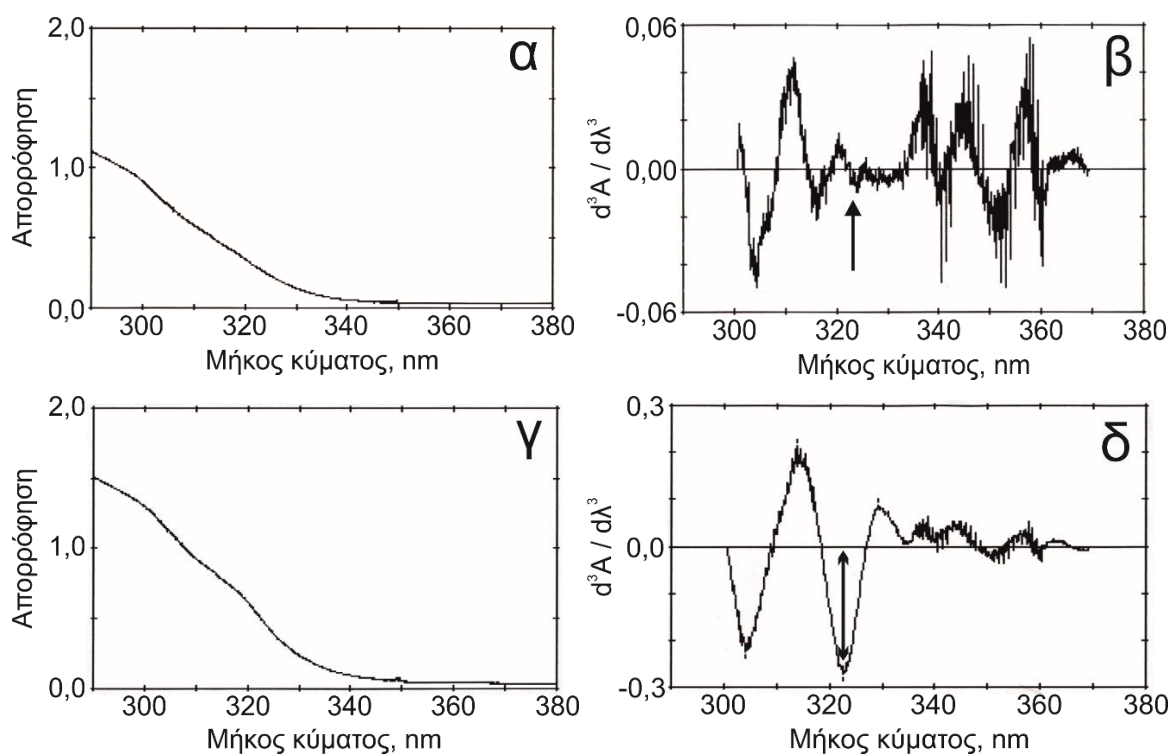
Σχήμα 10. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) λευκού δείγματος κεφίρ. Φάσμα απορρόφησης (γ) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (δ) επιβαρυμένου (606 ng/g) δείγματος κεφίρ.



Σχήμα 11. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) λευκού δείγματος ξινογάλακτος. Φάσμα απορρόφησης (γ) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (δ) επιβαρυμένου (606 ng/g) δείγματος ξινογάλακτος.



Σχήμα 12. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) λευκού δείγματος ρυζόγαλου. Φάσμα απορρόφησης (γ) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (δ) επιβαρυμένου (1818 ng/g) δείγματος ρυζόγαλου.



Σχήμα 13. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) λευκού δείγματος κρέμας. Φάσμα απορρόφησης (γ) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (δ) επιβαρυμένου (1818 ng/g) δείγματος κρέμας.

4.8 Διερεύνηση της παρουσίας της ναταμικίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά

Σύμφωνα με την Ελληνική Νομοθεσία (ΚΤΠ 2011) και σε εναρμόνιση με τον Κανονισμό 1333/2008/ΕΚ (Council Regulation 2008), η ναταμικίνη (E235) μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για την επιφανειακή επεξεργασία σκληρών, ημισκληρών και ημιμαλακών τυριών καθώς και των αποξηραμένων, ωριμασμένων αλλαντικών, σε μέγιστο επίπεδο 1 mg/dm² επιφάνειας, με την προϋπόθεση να μην ανιχνεύεται σε βάθος 5 mm.

Η ναταμυκίνη χρησιμοποιείται από τη βιομηχανία τροφίμων ως αντιμυκητιακό συντηρητικό με σκοπό την αναστολή της ανάπτυξης των μυκήτων και ζυμών στα τρόφιμα. Η ουσία είναι αποτελεσματική σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1 και 10 mg/kg (Thomas and Delver-Broughton 2003, Stark 2004), με τις ζύμες να εμφανίζουν, σε γενικές γραμμές, μεγαλύτερη ευαισθησία από τους μύκητες.

Σκοπός της διερεύνησης που διενεργήσαμε ήταν να ελεγχθεί συστηματικά η πιθανή μη σύννομη χρήση της ναταμυκίνης, ως συντηρητικού, σε ζυμωμένα και μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα. Για το σκοπό αυτό έγινε δειγματοληψία σε προϊόντα 29 εταιρειών, στην παρασκευή των οποίων δεν επιτρέπεται η χρήση της ναταμυκίνης. Τα αποτελέσματα από την εξέταση 283 δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης δίνονται συνοπτικά στον πίνακα 8 και αναλυτικά στον πίνακα 9 του συνημμένου παραρτήματος.

Από τη μελέτη των δεδομένων του πίνακα 8 γίνεται αντιληπτό ότι η ναταμυκίνη, παρόλο που δεν επιτρέπεται να χρησιμοποιείται, ανιχνεύτηκε σε όλα τα είδη γαλακτοκομικών προϊόντων που εξετάστηκαν. Από τον ίδιο πίνακα φαίνεται ότι η κρέμα, το ρυζόγαλο και το πρόβειο γιαούρτη ήταν τα προϊόντα με το μεγαλύτερο ποσοστό θετικών δειγμάτων, ενώ οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προσδιορίστηκαν σε γιαούρτη από κατσικίσιο γάλα και σε κρέμα βανίλια. Η ναταμυκίνη ανιχνεύτηκε σε παρόμοιες συγκεντρώσεις τόσο στην κυρίως μάζα όσο και στην επιφάνεια των γαλακτοκομικών προϊόντων που αναλύθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει ότι η εν λόγω ουσία ενσωματώθηκε κατά την διαδικασία παρασκευής των προϊόντων.

Εξάλλου, από τα αναλυτικά αποτελέσματα του πίνακα 9 του παραρτήματος φαίνεται ότι οι εταιρείες που χρησιμοποιούν τη ναταμυκίνη στα προϊόντα τους είναι συγκεκριμένες. Να σημειωθεί εδώ ότι για ευνόητους λόγους οι εταιρείες συμβολίζονται στον πίνακα με αριθμούς. Από τον εν λόγω πίνακα γίνεται αντιληπτό ότι, αναφορικά με την αγελαδινή γιαούρτη, από τις 14 εταιρείες που ελέγχθηκαν μόνο 5 χρησιμοποιούσαν την ναταμυκίνη ως συντηρητικό. Σε ό,τι αφορά την πρόβεια και την κατσικίσια γιαούρτη, 7 και 3 εταιρείες, από τις 16 και 9, αντίστοιχα, που ελέγχθηκαν χρησιμοποιούσαν το συντηρητικό, ενώ μη σύννομη χρήση της ναταμυκίνης έγινε μόνο σε μία από τις 6 εταιρείες που παράγουν κεφίρ και ξινόγαλα (αριάνι). Επίσης, από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μη ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Πίνακας 9) φαίνεται ότι 7 και 5 εταιρείες από τις 12 και 11, αντίστοιχα, που ελέγχθηκαν, έκαναν μη σύννομη χρήση της ναταμυκίνης για την παραγωγή ρυζόγαλου και κρέμας, αντίστοιχα.

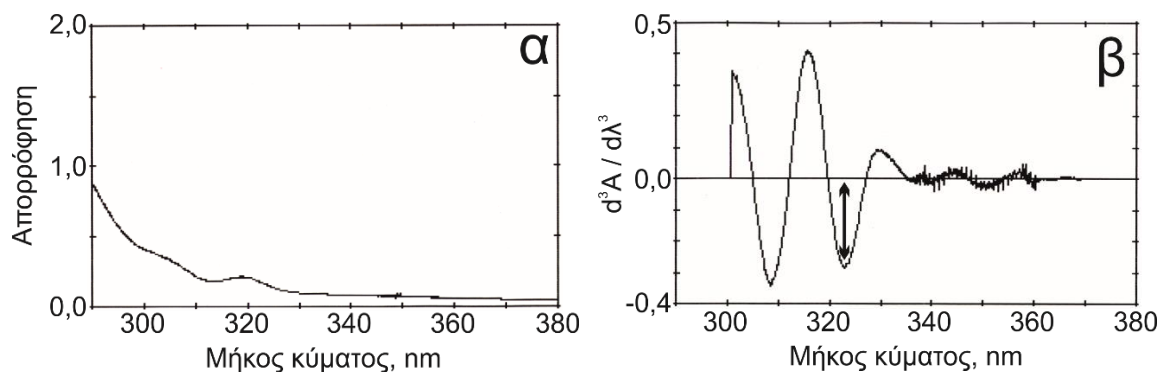
Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η ναταμυκίνη προσδιορίστηκε στα προϊόντα 18 από τις 29 εταιρείες που ελέγχθηκαν. Πρέπει, όμως, να ληφθεί υπόψη ότι η απουσία της ναταμυκίνης από τα προϊόντα των 11 εταιρειών θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι αναλύθηκε μικρός αριθμός δειγμάτων, αλλά και μικρός αριθμός διαφορετικών προϊόντων, από αυτές τις εταιρείες.

Τέλος, η μη σύννομη χρήση της ναταμυκίνης συνιστά, αφενός μεν κίνδυνο για τη Δημόσια Υγεία, αφετέρου αθέμιτη πρακτική στο εμπόριο γαλακτοκομικών προϊόντων γιατί παρατείνει το χρόνο ζωής τους σε βάρος των προϊόντων των ανταγωνιστικών εταιρειών. Για τους λόγους αυτούς είναι επιτακτική ανάγκη να διενεργούνται συστηματικοί έλεγχοι από τον ΕΦΕΤ σε όλες τις εταιρείες παραγωγής ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των τυριών, του ρυζόγαλου και της κρέμας.

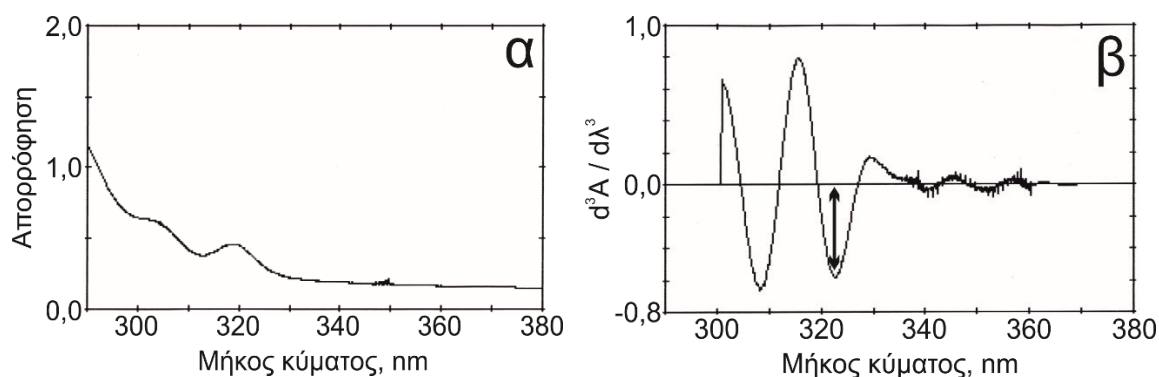
Πίνακας 8. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων για τον προσδιορισμό της ναταμικίνης

Προϊόν	Σύνολο δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων (≥151,5 ng/g)	Ποσοστό θετικών δειγμάτων (≥151,5 ng/g)	Αριθμός δειγμάτων με συγκέντρωση ≥303 ng/g	Ποσοστό θετικών δειγμάτων ≥303 ng/g	Ελάχιστη συγκέντρωση (ng/g)	Μέγιστη συγκέντρωση (ng/g)	Αριθμός εταιρειών
Γιαούρτη αγελαδινή	72	22	30,6%	14	19,4%	381,1	4836,7	14
Γιαούρτη πρόβεια	78	45	57,7%	38	48,7%	514,4	13370,0	16
Γιαούρτη κατσικίσια	49	12	24,5%	9	18,4%	2302,5	59676,7	9
Σύνολο δειγμάτων γιαούρτης	199	79	39,7%	61	30,7%	381,1	59676,7	24
Κεφίρ	18	3	16,7%	3	16,7%	1995,0	2411,7	6
Ξινόγαλα (Αριάνι)	18	3	16,7%	3	16,7%	1095,0	2436,7	6
Σύνολο δειγμάτων ζυμωμένου γάλακτος	235	85	36,2%	67	28,5%	381,1	59676,7	24
Ρυζόγαλο	27	15	55,6%	15	55,6%	1003,3	15307,8	12
Κρέμα	21	11	52,4%	11	52,4%	3658,9	49080,0	11
Σύνολο	283	111	39,2%	93	32,9%	381,1	59676,7	29

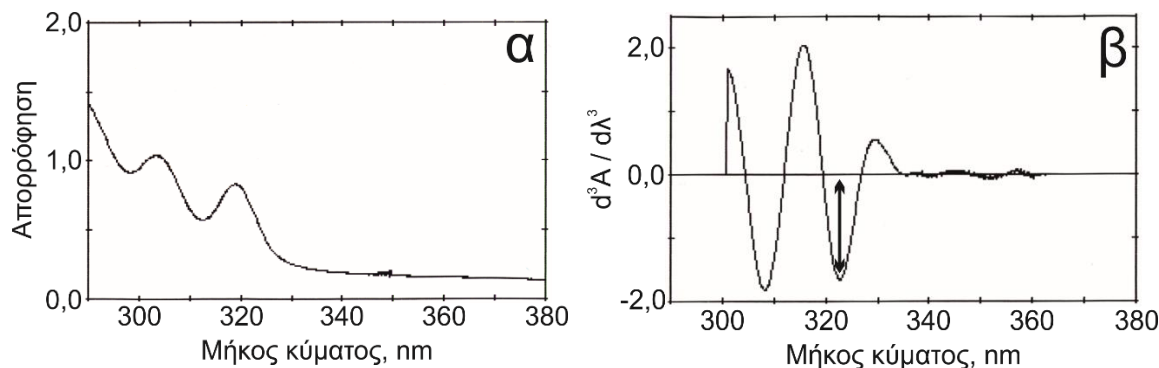
Στα σχήματα 14, 15, 16, 17, 18, 19 και 20 απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά φάσματα απορρόφησης και φάσματα 3^{ης} παραγώγου δειγμάτων γιαούρτης, κεφίρ, ξινογάλακτος, ρυζόγαλου και κρέμας. Τα δείγματα αφορούσαν προϊόντα που παρασκευάζονται στην Ελλάδα και κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά.



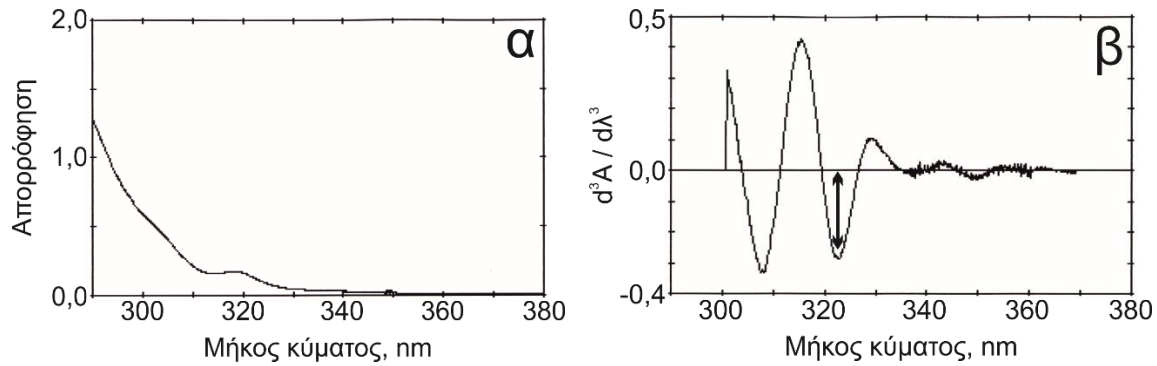
Σχήμα 14. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος γιαούρτης από αγελαδινό γάλα που περιείχε ναταμυκίνη σε συγκέντρωση 2770,0 ng/g.



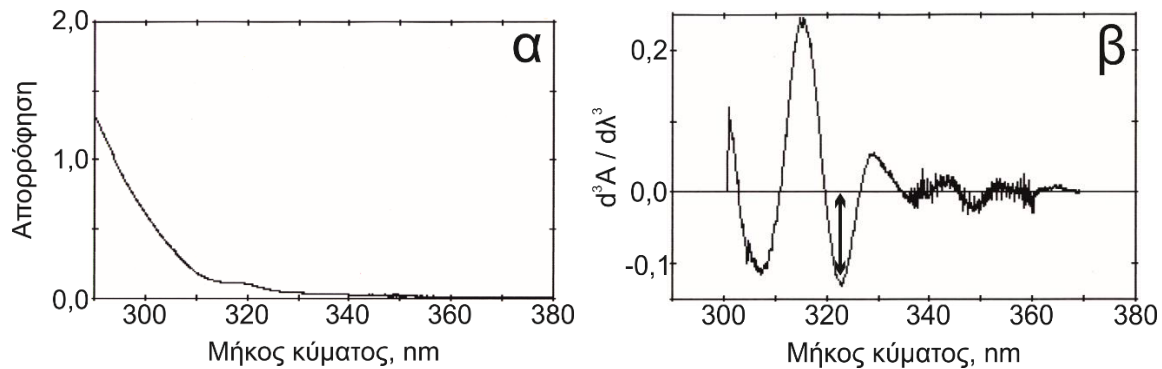
Σχήμα 15. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος γιαούρτης από πρόβειο γάλα που περιείχε ναταμυκίνη σε συγκέντρωση 4960,8 ng/g.



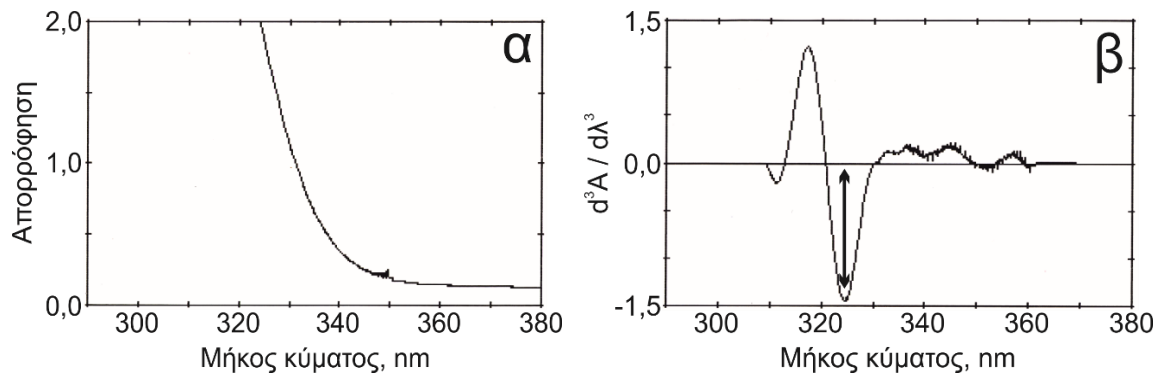
Σχήμα 16. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος γιαούρτης από κατσικίσιο γάλα που περιείχε ναταμυκίνη σε συγκέντρωση 13885,8 ng/g.



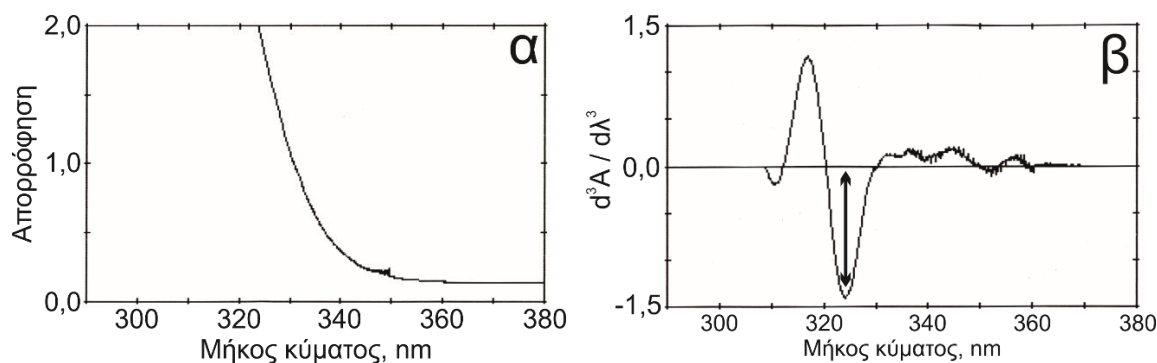
Σχήμα 17. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος κεφίρ που περιείχε ναταμικίνη σε συγκέντρωση 2411,7 ng/g.



Σχήμα 18. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος ξινογάλακτος που περιείχε ναταμικίνη σε συγκέντρωση 1095,0 ng/g.



Σχήμα 19. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος ρυζόγαλου που περιείχε ναταμικίνη σε συγκέντρωση 11436,7 ng/g.



Σχήμα 20. Φάσμα απορρόφησης (α) και φάσμα 3^{ης} παραγώγου (β) δείγματος κρέμας κακάο που περιείχε ναταμυκίνη σε συγκέντρωση 11035,8 ng/g.

5. Συμπεράσματα

Στη μελέτη αυτή αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε ζυμωμένα γάλατα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ τα αποτελέσματα της ερευνητικής μας προσπάθειας θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο από ερευνητές όσο και από εμπλεκόμενους στην υγιεινή και ασφάλεια των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Ειδικότερα στη μελέτη αυτή αναπτύχθηκε αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε ζυμωμένα γάλατα και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η μέθοδος είναι γρήγορη και έχει εξαιρετικά αναλυτικά χαρακτηριστικά, τα οποία την καθιστούν ιδανική να χρησιμοποιηθεί ως διερευνητική μέθοδος (screening method) για την ανίχνευση ή/και τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα. Η μέθοδος είναι χαμηλού κόστους και φιλική προς το περιβάλλον επειδή χρησιμοποιεί μικρό όγκο διαλυτών, και είναι εξαιρετικά γρήγορη στην εφαρμογή της δεδομένου ότι 10 δείγματα μπορούν να αναλυθούν σε 30 min.

Επιπλέον, από την έρευνα που διενεργήσαμε καταδείχθηκε ότι:

- Η ναταμυκίνη είναι πολύ ευαίσθητη στο φως.
- Η ναταμυκίνη είναι αρκετά σταθερή σε θερμοκρασία ψύξης (5°C) και εξαιρετικά σταθερή σε θερμοκρασία κατάψυξης (-20°C).
- Η ναταμυκίνη είναι σημαντικά ($P \leq 0,05$) σταθερότερη στο διάλυμα εκχύλισης απ' ό,τι στο εκχύλισμα γιαούρτης.
- Η ναταμυκίνη είναι αρκετά σταθερή όταν αυτή ενσωματώνεται σε ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (γιαούρτη, κεφίρ και ξινόγαλα).
- Η ναταμυκίνη είναι πολύ σταθερή όταν αυτή ενσωματώνεται σε μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (ρυζόγαλα και κρέμα).

- Υπάρχει εκτεταμένη μη σύννομη χρήση της ναταμικίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα.
- Είναι επιτακτική η ανάγκη διενέργειας συστηματικών ελέγχων από τον ΕΦΕΤ σε όλες τις εταιρείες παραγωγής ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των τυριών, του ρυζόγαλου και της κρέμας.

Περίληψη

Στην ερευνητική αυτή εργασία υποδεικνύεται μια απλή, γρήγορη, χαμηλού κόστους, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε ζυμωμένα γάλατα (γιαούρτη, κεφίρ, ξινόγαλα) και μη ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα (ρυζόγαλο, κρέμα). Επιπλέον, με την εφαρμογή της νέας μεθόδου, που επιτρέπει τον προσδιορισμό της ναταμυκίνης σε επίπεδο 303 ng/g (1212 ng/g για την κρέμα), διερευνήθηκε η παρουσία της σε γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται και κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, 3 g δείγματος ζυγίζονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και εκχυλίζονται με μίγμα ακετονιτριλίου / 1M φωσφορικού οξέος, με αναλογία όγκων 10/1, υποβάλλοντας το περιεχόμενο του σωλήνα σε έντονη ανατάραξη επί ένα min. Μετά από φυγοκέντρηση των σωλήνων σε 2000g επί ένα min, μέρος του υπερκείμενου υγρού που διαχωρίζεται μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία και καταγράφεται το φάσμα απορρόφησης του εκχυλίσματος στην περιοχή 290 – 380 nm. Στη συνέχεια, το φάσμα απορρόφησης υποβάλλεται σε διαφορική επεξεργασία 3^{ης} παραγώγου, επιλέγοντας στον υπολογιστή του φασματοφωτομέτρου τη διαφοροποίηση τρίτης τάξης και τη διαφορά μήκους κύματος ($\Delta\lambda$) των 6,3 nm, για περιοχή σάρωσης ≤ 100 nm (N=9). Κάτω από αυτές τις συνθήκες η ναταμυκίνη εμφανίζει χαρακτηριστική κοιλάδα στα 322,6 nm, το βάθος της οποίας, όπως αυτό καταγράφεται σε αυθαίρετες μονάδες, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ουσίας στο δείγμα που αναλύεται.

Η μέθοδος που προτείνεται έχει εξαιρετικά αναλυτικά χαρακτηριστικά δεδομένου ότι η ακρίβειά της, όπως αυτή εκφράζεται από την ανάκτηση της ναταμυκίνης είναι $99,6 \pm 8,3\%$, ενώ η γραμμικότητά της είναι άριστη, αφού ο συντελεστής συσχέτισης R^2 για την περιοχή συγκεντρώσεων 22,95 – 1836 ng/mL είναι 0,9998. Εξάλλου, η επαναληψιμότητα της μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από τη σχετική τυπική απόκλιση (%) είναι 5,1%. Η μέθοδος είναι χαμηλού κόστους και φιλική προς το περιβάλλον, επειδή χρησιμοποιεί μικρό όγκο διαλυτών, και είναι εξαιρετικά γρήγορη στην εφαρμογή της δεδομένου ότι 10 δείγματα μπορούν να αναλυθούν σε 30 min.

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση της παρουσίας της ναταμυκίνης σε γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται και κυκλοφορούν στην Ελληνική αγορά. Εξετάστηκαν συνολικά 283 δείγματα γαλακτοκομικών προϊόντων που συλλέχθηκαν από τον Οκτώβριο του έτους 2022 έως τον Ιανουάριο του έτους 2023. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν τη μη σύννομη χρήση της ναταμυκίνης στη γιαούρτη (30,7% των δειγμάτων), το κεφίρ και το ξινόγαλα (16,7% των δειγμάτων), το ρυζόγαλο (55,6% των δειγμάτων) και την κρέμα (52,4% των δειγμάτων).

Λέξεις κλειδιά: Ναταμυκίνη, διαφορική φασματοφωτομετρία, προσδιορισμός, σταθερότητα, γιαούρτη, κεφίρ, ξινόγαλα, ρυζόγαλο, κρέμα.

Summary

DETERMINATION OF NATAMYCIN IN FERMENTED MILKS BY DERIVATIVE SPECTROPHOTOMETRY

In the present study, a simple, rapid, sensitive, cost-effective and reliable method for the determination of natamycin in fermented milk products (yoghurt, kefir, airan) and non-fermented milk products (rice pudding, custard) is presented. In addition, upon application of the new method which allows determination of natamycin at a level of 303 ng/g (1212 ng/g in custard), its presence in milk products produced and distributed in the Greek market was investigated.

According to the proposed method, 3 g of sample are weighed into a test tube and extracted with an acetonitrile / 1 M phosphoric acid (10/1 v/v) mixture, by vortex mixing the content of the tube for 1 min. Following centrifugation at 2000g for 1 min, a portion of the clear supernatant layer is transferred to a quartz cell and the absorbance spectrum of the extract is recorded in the range of 290-380 nm. The obtained spectrum is then submitted to 3rd derivative processing, by selecting 3rd order differentiation mode and key entry N=9. This entry corresponds to a 3rd derivative wavelength difference ($\Delta\lambda$) of 6.3 nm, for a scan wavelength range ≤ 100 nm. Under the particular conditions, natamycin shows a characteristic trough at 322.6 nm, the depth of which, as recorded in arbitrary units, is proportional to the concentration of the substance in the sample being analyzed.

The proposed method has excellent analytical characteristics since its accuracy, as it is expressed by the recovery of natamycin, is $99.6 \pm 8.3\%$, while its linearity is excellent since the correlation coefficient R^2 for the concentration range of 22.95-1836 ng/mL is 0.9998. Moreover, the precision of the method, as it is expressed by the relative standard deviation (%) is 5.1%. The method is cost-effective, environmentally friendly since small volumes of solvents are used, and rapid as it takes only 30 min for 10 samples to analyze.

The proposed method was applied to investigate the presence of natamycin in dairy products produced and distributed in the Greek market. A total of 283 samples of dairy products, collected from October 2022 to January 2023, were examined. The results demonstrated the illicit use of natamycin in yoghurt (30.7% of the samples), kefir and airan (16.7% of the samples), rice pudding (55.6% of the samples) and custard (52, 4% of the samples).

Key words: Natamycin, derivative spectrophotometry, determination, stability, yoghurt, kefir, airan, rice pudding, custard.

Βιβλιογραφία

- Athar MA and Winner HI, 1971. The development of resistance by *candida* species to polyene antibiotics in vitro. *Journal of Medical Microbiology* 4, 505-517.
- Bakar D, 2011. Comparative studies on the qualities of commercialized yoghurt in Kumasi and the effect of natamycin on yoghurt during storage (Doctoral dissertation).
- Bernhardt H, 1998. Fungi in the intestine – Normal flora or pathogens? *Zeitschrift fur Arztlische Fortbildung und Qualitätssicherung* 92, 154-156.
- Bilgic Alkaya D and Karalomlu O, 2016. Determination of natamycin in turkish yoghurt, *International Journal of Analytical Chemistry* 2016, 1-5.
- Branen AL, Davidson RM, Salminen S and Thorngate JH, 2005. *Food additives* (2nd ed). Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 566-570.
- Brick H, 1976. New molecular decomposition products of natamycin (pimaricin) with intact lactone ring. *Journal of Antibiotics* 29, 632-637.
- Brik H, 1981. Natamycin. *Analytical profiles of drug substances and excipients* 10, 513-561.
- Cerniglia CE and Kotarski S, 1999. Evaluation of veterinary drug residues in food for their potential to affect human intestinal microflora. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 29, 238-261.
- Chaudhari J and Chhabra G, 2014. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for natamycin in bulk and ophthalmic dosage forms. *Asian Journal Pharmaceutical & Clinical Research* 7, 54-59.
- Commission Decision, 2002. Commission Decision 2002/657/EC on performance of analytical methods and interpretation of results. *Official Journal of the European Communities* L 221, 8-36.
- Council Regulation, 2008. Council Regulation 1333/2008/EC of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Communities* L 354, 16-33.
- Czeizel AE, Kazy Z and Vargh P, 2003. A case-control teratological study of vaginal natamycin treatment during pregnancy. *Reproductive Toxicology* 17, 387-91.
- Dalhoff AA and Levy SB, 2015. Does use of the polyene natamycin as a food preservative jeopardise the clinical efficacy of amphotericin B? A word of concern. *International Journal of Antimicrobial Agents* 45, 564-567.
- Dalie DKD, Deschamps AM and Richard-Forget F, 2010. Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control* 21, 370-380.

- Davidson PM and Doan C, 2020. Natamycin. In: Antimicrobials in Food. CRC Press, pp. 339-356.
- de Boer E, Labotsi M, Stolk-Horsthuis M and Visser JN, 1979. Sensitivity to natamycin of fungi in factories producing dry sausage. *Fleischwirtschaft* 59, 1868-1869.
- de Boer E and Stolk-Horsthuis M, 1977. Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses. *Journal of Food Protection* 40, 533-536.
- de Ruig WG, van Oostrom JJ and Leenheer K, 1987. Spectrometric and liquid chromatographic determination of natamycin in cheese and cheese rind. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 70, 944-948.
- Deacon JW, 1997. Prevention and control of fungal growth. In: *Modern Mycology*, 3rd Ed., Oxford, Blackwell Science, pp. 289-290.
- Delavenne E, Ismail R, Pawtowski A, Mounier J, Barbier G and Le Blay G, 2013. Assessment of *Lactobacilli* strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control* 30, 106-213.
- Delves-Broughton J and Weber G, 2011. Nisin, natamycin and other commercial fermentates used in food biopreservation. In: *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverages biopreservation*, Lacroix C, Ed., Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 63-99.
- Detry P, Willame P, Van Hoeck E, Van Loco J and Gosciny S, 2022. Development, validation and application of multi-class methods for the analysis of food additives by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A* 39, 1349-1364.
- Dzigbordi B, Adubofuor J and Dufie WF, 2013. The effects of different concentrations of natamycin and the point of addition on some physicochemical and microbial properties of vanilla-flavoured yoghurt under refrigerated condition. *International Food Research Journal* 20, 3287-3292.
- EFSA, 2009. Scientific Opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. *EFSA Journal* 7, 1412, 1-25.
- EI-Matary DA, Baher WM and Zaki NM, 2017. Effect of irradiation and natamycin on decontamination of fungi from laboratory inoculated minced meat. *Assiut Veterinary Medical Journal* 63, 152-160.
- Elsser-Gravesen D and Elsser-Gravesen A, 2013. Biopreservatives. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 143, 29-49.

- EMA, 1998. Natamycin. Committee for Veterinary Products. EMA/MRL/342/98-FINAL. Available at: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/034298en.pdf>.
- Fang S, Peng X, Liang X, Shen J, Wang J, Chen J and Meng Y, 2019. Enhancing water solubility and stability of natamycin by molecular encapsulation in methyl- β -cyclodextrin and its mechanisms by molecular dynamics simulations. *Food Biophysics* 15, 188-195.
- Farid MA, El-Enshasy HA, El-Diwany AI and El-Sayed ESA, 2000. Optimization of the cultivation medium for natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of Basic Microbiology* 40, 157-166.
- Fletouris DJ, Botsoglou NA and Mantis AJ, 1995. Rapid spectrophotometric method for analyzing natamycin in cheese and cheese rind. *Journal of AOAC International* 78, 1024-1029.
- Frisvad JC, Samson RA, Rassing BR, Van Der Horst MI, Van Rijn FTJ and Stark J, 1997. *Penicillium discolor*, a new species from cheese, nuts and vegetables. *Antonie van Leeuwenhoek* 72, 119-126.
- Fuselli F, Guarino C, La Mantia A, Longo L, Faberi A and Marianella RM, 2012. Multi-detection of preservatives in cheeses by liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 906, 9-18.
- Gao YR, Wang XP and Liu Y, 2010. Biological stability of natamycin solution. *Food Science* 31, 41-44.
- Grove DC and Randall WA, 1955. Assay methods of antibiotics. Medical Encyclopaedia, Inc., New York, NY, USA.
- Guarino C, Fuselli F, Mantia AL and Longo L, 2011. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. *Food Chemistry* 127, 1294-1299.
- Hameed KGA, 2016. Fungal diversity in different types of cheese and the effect of natamycin on their survival during Feta cheese manufacture and storage. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 3, 214-220.
- Hamilton-Miller JM, 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriological Reviews* 37, 166-196.
- He C, Zhang Z, Li B, Xu Y and Tian S, 2019. Effect of natamycin on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*—Postharvest pathogens of grape berries and jujube fruit. *Postharvest Biology and Technology* 151, 134-141.

- Hejzlar M and Výmola F, 1970. Comparative study of pimaricin and fungicidin activity in vitro, Preliminary report. Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology 14, 211-213.
- Hoekstra ES and Van der Horst MI, 1998. Survey of the fungal flora in Dutch cheese factories and warehouses. Journal of Food Mycology 1, 13-22.
- Hsiao CH, Yeh LK, Chen HC, Lin HC, Chen PY, Ma DH and Tan HY, 2014. Clinical characteristics of *Alternaria keratitis*. Journal of Ophthalmology 2014, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/536985>
- Jay JM, 1996. Modern Food Microbiology, 5th Ed., Chapman & Hall, New York, pp. 293-294.
- Jay JM, Loessner JM and Golden AD, 2005. Modern Food Microbiology. In: Food Science Text Series (FSTS), 7th Ed., Springer Science Inc, pp. 329-330.
- JECFA, 1976. Evaluation of certain food additives. Twentieth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series N°599/FAO Food and Nutrition Series N°1, Rome, Italy.
- JECFA, 2002. Safety evaluation of certain food additives: Fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series No 48, WHO, Geneva, Switzerland, pp. 49-76.
- Kallinteri LD, Kostoula OK and Savvaidis IN, 2013. Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese. Food Microbiology 36, 176-181.
- Koontz JL, Marcy JE, Barbeau WE and Susan ED, 2003. Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 7111-7114.
- Kure C, Skaar I and Brendehaug J, 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. International Journal of Food Microbiology 93, 41-49.
- ΚΤΠ, 2011. Κώδικας Τροφίμων Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσης. Άρθρο 33, Πρόσθετες Ύλες Τροφίμων – Τεχνολογικά Βοηθήματα, Ακτινοβόληση Τροφίμων. Εθνικό Τυπογραφείο, Αθήνα.
- Lalitha P, Shapiro BL, Loh AR, Fothergill AW, Prajna NV, Srinivasan M, Oldenburg CE, Quigley DA, Chidambaram JD, McLeod SD, Acharya NR and Lietman TM, 2011. Amphotericin B and natamycin are not synergistic in vitro against *Fusarium* and *Aspergillus* spp. isolated from keratitis. British Journal of Ophthalmology 95, 744-745.

- Laurindo J, Prado N, Morés S and Tonial I, 2019. Quantification, migration and decline of natamycin in blue cheeses. *Brazilian Journal of Food Technology* 22, e2018077. <https://doi.org/10.1590/1981>.
- Ledesma E, Rendueles M and Díaz M, 2016. Contamination of meat products during smoking by polycyclic aromatic hydrocarbons: Processes and prevention. *Food Control* 60, 64-87.
- Levinskas GJ, Ribelin WE and Shaffer CB, 1966. Acute and chronic toxicity of pimaricin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 8, 97-109.
- Li X, Gao F, Liu H and Gao Y, 2020. Development of a capillary zone electrophoresis method to determine natamycin in food and a comparison with a liquid chromatography method. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100, 811-816.
- Littman ML, Foster JB, Almeda E and Wilson ME, 1958. Some intraocular and conjunctival effects of amphotericin B in man and in the rabbit. *Archives of Ophthalmology* 60, 555-556.
- Lule VK, Garg S, Gosewade SC and Khedkar CD, 2016. Natamycin. *Encyclopedia of Food and Health*, pp. 56-62.
- Luo JM, Jin ZH, Cen PL and Wang M, 2008. Measurement and correlation of the solubilities of natamycin in different solvents. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities* 22, 733-738.
- Martindale, 1972. Natamycin. In: *The Extra Pharmacopoeia: Incorporating Squire's Companion*, 26th Ed. Pharmaceutical Press, London, England, pp. 776-777.
- Martindale, 1977. Natamycin. *The Extra Pharmacopoeia: Incorporating Squire's Companion*, 27th Ed. Pharmaceutical Press, London, England, pp. 648-649.
- Martindale, 1989. Natamycin. *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*, 29th Ed. Pharmaceutical Press, London, England, pp. 431-432.
- Martindale, 2002. Natamycin. In: *Martindale: The Complete Drug Reference*, 33rd Ed. Pharmaceutical Press, London, England, p. 392.
- Martlbauer E, Ali H, Dietrich R and Terplan G, 1990. Enzyme immunoassay for the detection of natamycin in cheese rind. *Archiv für Lebensmittelhygiene* 41, 112-115.
- Meena M, Prajapati P, Ravichandran C and Sehrawat R, 2021. Natamycin: a natural preservative for food applications-a review. *Food Science and Biotechnology* 30, 1481-1496.
- Molzahn SW and Woods RA, 1972. Polyene resistance and the isolation of sterol mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 72, 339-348.

- Molognoni L, Daguera H, Antunes de Sá Ploêncio L and De Dea Lindner J, 2018. A multi-purpose tool for food inspection: Simultaneous determination of various classes of preservatives and biogenic amines in meat and fish products by LC-MS. *Talanta* 178, 1053-1066.
- Munn AL, Heese-Peck A, Stevenson BJ, Pichler H and Riezman H, 1999. Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Molecular Biology of the Cell* 10, 3943-3957.
- Newcomer VD, Sternberg TH, Wright ET, Reisner RM, McNall EG and Sorensin LJ, 1960. The treatment of systemic diseases with orally administered pimaricin: Preliminary report. *Annals New York Academy of Sciences* 89, 240-246.
- Ombarak RA and Shelaby HH, 2017. The inhibitory effect of natamycin and potassium sorbate on mold growth in egyptian fresh soft cheese (Tallaga Cheese). *Alexandria Journal for Veterinary Sciences* 53, 33-37.
- Nihad A-HS and Salami M, 2017. Study of storage conditions effect (light-heat) on natamycin content and stability in some dairy products (cheese-yoghurt). *Clinical Pharmacology & Biopharmaceutics* 6, 1-6.
- Paseiro-Cerrato R, Otero-Pazos P, Rodríguez-Bernaldo de Quirós A, Sendón R, Angulo I and Paseiro-Losada P, 2013. Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for compliance with EU food legislation. *Food Control* 33, 262-267.
- Pipek P, Rohlík BA, Lojkova A and Staruch L 2010. Suppression of mould growth on dry sausages. *Czech Journal of Food Sciences* 28, 258-263.
- Raab W, 1972. *Natamycin (Pimaracin). Its Properties and Possibilities in Medicine*. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, Germany.
- Rasgele P and Kaymak F, 2013a. Effects of food preservative natamycin on liver enzymes and total protein in *Mus Musculus*. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 19, 298-302.
- Rasgele PG and Kaymak F, 2013b. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of natamycin in mice bone marrow cells. *Pakistan Journal of Zoology* 45, 1103-1112.
- Rencüzoğullari E, Azirak S, Canimoglu S, Parlak S and Buyukleyla M, 2009. Effects of natamycin on sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology* 32, 47-52.
- Rybinska K, Postupolski J and Szczesna M, 1997. Determination of natamycin residues in ripening cheeses by high performance liquid chromatography. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 48, 173-178.

- Safe LM, Safe SH, Subden RE and Morris DC, 1977. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. Canadian Journal of Microbiology 23, 398-401.
- Salem AM, Amin R A, Khater DF and Shokr LA, 2016. Antifungal effect of some chemical preservatives on *aspergillus niger* in minced beef meat. Benha Veterinary Medical Journal 30, 295-301.
- Sara AE, Ekbal MA, Adham MA and Hamdi AM, 2014. The role of natamycin fortification to extent shelf life of plain yoghurt. Betha Veterinary Medical Journal 27, 140-149.
- Stark J, 2003. Natamycin: an effective fungicide for food and beverages. Natural antimicrobials for the minimal processing of foods, Cambridge: Woodhead Publishing Ltd. pp. 82-97.
- Stark J, 2004. Permitted preservatives - natamycin. In: Robinson RK, Batt, CA and Patel P (Eds.) Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press, New York, USA, pp. 1776-1781.
- Struyk AP, Drost G, Haisvisz JM, Van Eek T and Hoogerheide JC, 1958. Pimaricin, a new antifungal antibiotic. Antibiotics Annual 5, 878-885.
- Subden RE, Safe L and Morris DC, 1977. Eburicol, lichesterol, ergosterol, and obtusifoliol from polyene antibiotic-resistant mutants of *Candida albicans*. Canadian Journal of Microbiology 23, 751-754
- Te Welscher YM, Hendrik H, Balagué MM, Souza CM, Riezman H, De Kruijff B and Breukink E, 2008. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. Journal of Biological Chemistry 283, 6393-6401.
- Te Welscher YM, van Leeuwen MR, de Kruijff B, Dijksterhuis J and Breukink E, 2012. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 109, 11156-11159.
- Thoma K and Kubler N, 1998. New results in the photoinstability of antimycotics, Drugs, Photochemistry and Photostability 225, 116-118.
- Thomas LV and Delves-Broughton J, 2003. Natamycin, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 4109-4115.
- Tuinstra LGMT and Traag WA, 1982. Liquid chromatographic determination of natamycin in cheese at residue levels. Journal of Association of Official Analytical Chemists 65, 820-822.

- Vierikova M, Hrciarikova E and Lehotay J, 2013. Determination of natamycin content in cheese using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 36, 2933-2943.
- van Leeuwen MR, Golovina EA and Dijksterhuis J, 2009. The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1908-1918.
- Zeng X, Miao W, Zeng H, Zhao K, Zhou Y, Zhang J, Zhao Q, Tursun D, Xu D and Li F, 2019. Production of natamycin by *Streptomyces gilvosporeus* Z28 through solid-state fermentation using agro-industrial residues. *Bioresource Technology* 273, 377-385.
- Ziogas BN, Sisler HD and Lusby WR, 1983. Sterol content and other characteristics of pimaricin-resistant mutants of *Aspergillus nidulans*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20, 320-329.

Παράρτημα

Πίνακας 9. Αποτελέσματα ανάλυσης δειγμάτων γαλακτοκομικών προϊόντων για τον προσδιορισμό ναταμυκίνης

Αριθμός δείγματος	Είδος προϊόντος	Εταιρεία	Συγκέντρωση ναταμυκίνης (ng/g)
A) Αγελαδινή γιαούρτη			
1	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	2770,0
2	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
3	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
4	Στραγγιστή πλήρης γιαούρτη	3	< 303,0
5	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
6	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	27	< 303,0
7	Γιαούρτη αγελάδας	22	486,0
8	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
9	Στραγγιστή γιαούρτη 2%	27	< 303,0
10	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
11	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	27	< 303,0
12	Γιαούρτη αγελάδας	22	1737,6
13	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
14	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
15	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	16	< 303,0
16	Στραγγιστή γιαούρτη 2%	27	396,3
17	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	418,9
18	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	16	< 303,0
19	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	27	< 303,0
20	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
21	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
22	Στραγγιστή γιαούρτη 5%	5	< 303,0
23	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
24	Στραγγιστή αγελαδινή γιαούρτη	27	< 303,0
25	Στραγγιστή γιαούρτη 8%	7	< 303,0
26	Στραγγιστή γιαούρτη 5%	5	< 303,0
27	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
28	Στραγγιστή γιαούρτη 2%	27	< 303,0
29	Στραγγιστή γιαούρτη 8%	7	< 303,0
30	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
31	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	2108,7
32	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
33	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
34	Γιαούρτη ελαφρύ	3	< 303,0
35	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	1235,8

36	Γιαούρτη 2% σπιτικό	7	< 303,0
37	Αγελαδινή γιαούρτη χωρίς λακτόζη	3	< 303,0
38	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	819,2
39	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 5%	1	< 303,0
40	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
41	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
42	Στραγγιστή γιαούρτη 5%	5	< 303,0
43	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
44	Στραγγιστή γιαούρτη 2%	7	< 303,0
45	Στραγγιστή γιαούρτη 10%	27	< 303,0
46	Αγελαδινή γιαούρτη	19	< 303,0
47	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	973,6
48	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
49	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	27	381,1
50	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
51	Στραγγιστή γιαούρτη 6%	7	< 303,0
52	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 2%	1	< 303,0
53	Στραγγιστή γιαούρτη 6%	5	< 303,0
54	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
55	Στραγγιστή γιαούρτη 6%	7	< 303,0
56	Στραγγιστή γιαούρτη 5%	5	< 303,0
57	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
58	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 5%	1	< 303,0
59	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	4	< 303,0
60	Γιαούρτη αγελάδας	25	4836,7
61	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	18	< 303,0
62	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	14	764,1
63	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 5%	1	< 303,0
64	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
65	Στραγγιστή γιαούρτη 2%	7	< 303,0
66	Συμπυκνωμένη γιαούρτη φρούτων	7	< 303,0
67	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
68	Γιαούρτη αγελάδας	22	1124,9
69	Συμπυκνωμένη γιαούρτη	2	< 303,0
70	Συμπυκνωμένη γιαούρτη 5%	1	< 303,0
71	Παραδοσιακή αγελαδινή γιαούρτη	15	< 303,0
72	Γιαούρτη αγελάδας	22	3232,6

B) Πρόβεια γιαούρτη

73	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	23	4279,3
74	Πρόβεια γιαούρτη	28	992,7
75	Πρόβεια γιαούρτη (ελαφρύ)	19	< 303,0
76	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
77	Πρόβεια γιαούρτη (ελαφρύ)	3	< 303,0
78	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	8	< 303,0

79	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	23	6713,9
80	Πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
81	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	9040,2
82	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	23	7396,7
83	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
84	Πρόβεια γιαούρτη (ελαφρύ)	3	< 303,0
85	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	8	< 303,0
86	Πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0
87	Πρόβεια γιαούρτη 0,6%	19	873,9
88	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	8	< 303,0
89	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	17	< 303,0
90	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
91	Πρόβεια γιαούρτη (ελαφρύ)	3	< 303,0
92	Πρόβεια γιαούρτη	22	1735,8
93	Πρόβεια γιαούρτη 1%	28	< 303,0
94	Πρόβεια γιαούρτη	23	4960,8
95	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	28	2119,2
96	Πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
97	Πρόβεια γιαούρτη	22	1477,5
98	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0
99	Πρόβεια γιαούρτη	23	3369,2
100	Πρόβεια γιαούρτη	28	1110,8
101	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	17	< 303,0
102	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
103	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	14	1885,8
104	Πρόβεια γιαούρτη	28	1347,5
105	Πρόβεια γιαούρτη	22	2489,2
106	Πρόβεια γιαούρτη 1%	28	2205,8
107	Πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
108	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	10	< 303,0
109	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	27	< 303,0
110	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	4905,8
111	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	6322,5
112	Πρόβεια γιαούρτη	23	4680,8
113	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
114	Πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
115	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	7203,3
116	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	13370,0
117	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	13	< 303,0
118	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	27	514,4
119	Πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
120	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0
121	Πρόβεια γιαούρτη 1%	28	2070,0
122	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0

123	Πρόβεια γιαούρτη	22	2692,2
124	Πρόβεια γιαούρτη	28	1558,9
125	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	8	< 303,0
126	Πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
127	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	23	5170,0
128	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	27	< 303,0
129	Πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
130	Πρόβεια γιαούρτη	22	2714,4
131	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0
132	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	11536,7
133	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	11325,6
134	Πρόβεια γιαούρτη	11	< 303,0
135	Πρόβεια γιαούρτη	28	1736,7
136	Πρόβεια γιαούρτη	23	5228,3
137	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	6361,7
138	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	26	7461,7
139	Πρόβεια γιαούρτη	28	711,7
140	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0
141	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	13	< 303,0
142	Πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
143	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	27	995,4
144	Πρόβεια γιαούρτη	23	5032,9
145	Πρόβεια γιαούρτη	28	954,4
146	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	8	< 303,0
147	Πρόβεια γιαούρτη	19	< 303,0
148	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	9	< 303,0
149	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	22	1069,4
150	Παραδοσιακή πρόβεια γιαούρτη	4	< 303,0

Γ) Κατσικίσια γιαούρτη

151	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	14	3430,7
152	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
153	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
154	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
155	Βιολογική κατσικίσια γιαούρτη	11	< 303,0
156	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	17	< 303,0
157	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
158	Βιολογική κατσικίσια γιαούρτη	11	< 303,0
159	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
160	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
161	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	13885,8
162	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
163	Κατσικίσια ημιαποβουτυρωμένη γιαούρτη 3,5%	11	< 303,0
164	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
165	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	2477,5

166	Βιολογική κατσικίσια γιαούρτη	11	< 303,0
167	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	8	< 303,0
168	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
169	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
170	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
171	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	14	2302,5
172	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
173	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
174	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	3	< 303,0
175	Κατσικίσια ημιαποβουτυρωμένη γιαούρτη 3,5%	11	< 303,0
176	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	59676,7
177	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	58543,3
178	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	8	< 303,0
179	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
180	Κατσικίσια ημιαποβουτυρωμένη γιαούρτη 3,5%	11	< 303,0
181	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
182	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
183	Κατσικίσια γιαούρτη	3	< 303,0
184	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
185	Κατσικίσια γιαούρτη	15	< 303,0
186	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	12305,9
187	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	8	< 303,0
188	Κατσικίσια γιαούρτη	3	< 303,0
189	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
190	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	13	< 303,0
191	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	16411,7
192	Κατσικίσια γιαούρτη	3	< 303,0
193	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
194	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	8	< 303,0
195	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	12	< 303,0
196	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	26	17220,0
197	Κατσικίσια γιαούρτη	3	< 303,0
198	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	10	< 303,0
199	Παραδοσιακή κατσικίσια γιαούρτη	8	< 303,0

Δ) Κεφίρ

200	Κεφίρ	18	2411,7
201	Κεφίρ	13	< 303,0
202	Κεφίρ	4	< 303,0
203	Κεφίρ	3	< 303,0
204	Κεφίρ	14	< 303,0
205	Κεφίρ με φρούτα δάσους	14	< 303,0
206	Κεφίρ με φρούτα	3	< 303,0
207	Κεφίρ	8	< 303,0
208	Κεφίρ	18	2278,3

209	Κεφίρ	8	< 303,0
210	Κεφίρ με φρούτα	4	< 303,0
211	Κεφίρ	3	< 303,0
212	Κεφίρ	8	< 303,0
213	Κεφίρ	13	< 303,0
214	Κεφίρ	18	1995,0
215	Κεφίρ με φρούτα	4	< 303,0
216	Κεφίρ	13	< 303,0
217	Κεφίρ με φρούτα δάσους	14	< 303,0

Ε) Ξινόγαλα (αριάνι)

218	Ξινόγαλα (αριάνι)	18	1095,0
219	Ξινόγαλα (αριάνι)	4	< 303,0
220	Ξινόγαλα (αριάνι)	8	< 303,0
221	Ξινόγαλα (αριάνι)	3	< 303,0
222	Ξινόγαλα (αριάνι)	14	< 303,0
223	Ξινόγαλα (αριάνι)	18	1953,3
224	Ξινόγαλα (αριάνι)	8	< 303,0
225	Ξινόγαλα (αριάνι)	3	< 303,0
226	Ξινόγαλα (αριάνι)	13	< 303,0
227	Ξινόγαλα (αριάνι)	4	< 303,0
228	Ξινόγαλα (αριάνι)	14	< 303,0
229	Ξινόγαλα (αριάνι)	13	< 303,0
230	Ξινόγαλα (αριάνι)	8	< 303,0
231	Ξινόγαλα (αριάνι)	3	< 303,0
232	Ξινόγαλα (αριάνι)	13	< 303,0
233	Ξινόγαλα (αριάνι)	18	2436,7
234	Ξινόγαλα (αριάνι)	4	< 303,0
235	Ξινόγαλα (αριάνι)	14	< 303,0

ΣΤ) Ρυζόγαλο

236	Παραδοσιακό ρυζόγαλο	24	4724,0
237	Ρυζόγαλο	23	15307,8
238	Ρυζόγαλο	8	< 303,0
239	Παραδοσιακό ρυζόγαλο	24	< 303,0
240	Ρυζόγαλο	23	12377,5
241	Ρυζόγαλο	23	11127,5
242	Ρυζόγαλο	8	2630,8
243	Ρυζόγαλο	26	< 303,0
244	Ρυζόγαλο	23	11939,2
245	Ρυζόγαλο	23	11314,2
246	Ρυζόγαλο	20	< 303,0
247	Ρυζόγαλο	28	12492,2
248	Ρυζόγαλο	26	1003,3
249	Ρυζόγαλο	4	< 303,0

250	Ρυζόγαλο	8	4180,0
251	Ρυζόγαλο	3	< 303,0
252	Ρυζόγαλο	15	< 303,0
253	Ρυζόγαλο	9	6913,3
254	Ρυζόγαλο	28	9278,3
255	Ρυζόγαλο	20	< 303,0
256	Ρυζόγαλο	21	1511,7
257	Ρυζόγαλο	23	11436,7
258	Ρυζόγαλο	26	1713,3
259	Ρυζόγαλο	3	< 303,0
260	Ρυζόγαλο	4	< 303,0
261	Ρυζόγαλο	28	< 303,0
262	Ρυζόγαλο	29	< 303,0

Z) Κρέμα

263	Κρέμα βανίλια	23	12119,2
264	Κρέμα κακάο	23	11035,8
265	Κρέμα βανίλια	20	< 1212,0
266	Κρέμα κακάο	23	< 1212,0
267	Κρέμα κακάο	20	16180,0
268	Κρέμα βανίλια	20	3892,2
269	Κρέμα βανίλια	20	3658,9
270	Κρέμα βανίλια	4	< 1212,0
271	Κρέμα βανίλια	8	< 1212,0
272	Κρέμα βανίλια	6	< 1212,0
273	Κρέμα βανίλια	27	< 1212,0
274	Κρέμα βανίλια	15	< 1212,0
275	Κρέμα βανίλια	28	9820,0
276	Κρέμα βανίλια	20	49080,0
277	Κρέμα βανίλια	21	< 1212,0
278	Κρέμα βανίλια	23	12103,3
279	Κρέμα κακάο	23	12913,3
280	Κρέμα σοκολάτα	26	< 1212,0
281	Κρέμα βανίλια	26	< 1212,0
282	Κρέμα βανίλια	3	5280,0
283	Κρέμα βανίλια	4	4580,0
