



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Dalla stalla alla tavola: la ricerca di laboratorio dei contaminanti IPA, metalli e NF



IPA vogliamo conoscerli meglio?

Dalla contaminazione alla normativa



Mauti Tabita - DO Chimica
6 Maggio 2015

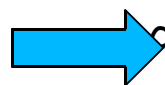
Introduzione

- Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono un gruppo di composti ubiquitari generati da combustione incompleta di sostanze organiche.
- Vengono rilasciati nell'atmosfera attraverso combustioni spontanee ma principalmente attraverso l'attività umana (produzione di energia industriale, scarichi di autoveicoli, riscaldamento domestico).
- L'assunzione di questi composti da parte dell'uomo avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti contaminati

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici sono molecole costituite da due o più anelli benzenici uniti fra loro

Generalmente:

- sono solidi a temperatura ambiente
- hanno punti di ebollizione e di fusione elevati
- sono chimicamente stabili
- sono suscettibili ad ossidazione e fotodegradazione
- sono poco solubili o del tutto insolubili in acqua (solubilità diminuisce all'aumentare del peso molecolare)
- sono molecole fluorescenti
- sono altamente lipofili

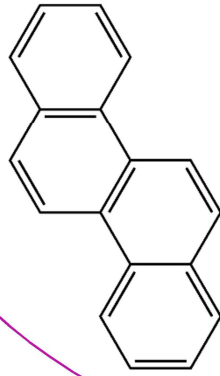


coefficiente di ripartizione acqua/ottanolo

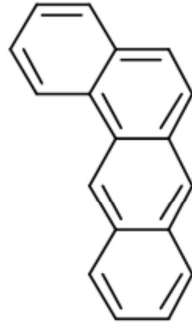


capacità di accumulo degli IPA in fasi apolari

IPA



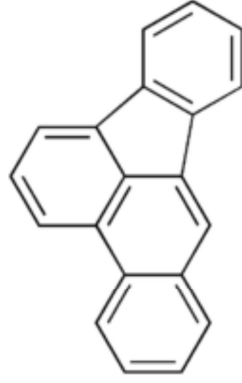
Crisene



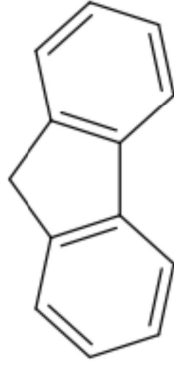
Benzo[a]anthracene



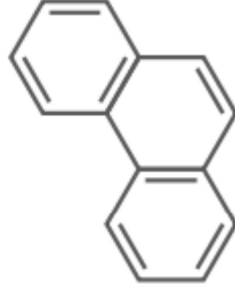
Benzo[a]pirene



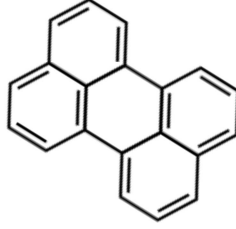
Benzo[b]fluorantene



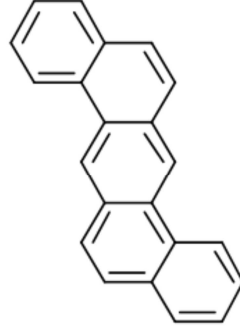
Fluorene



Fenantrene

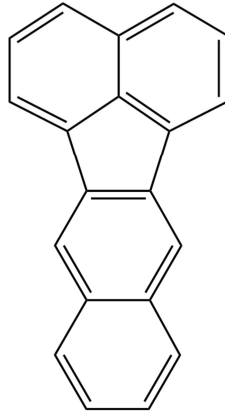


Perilene

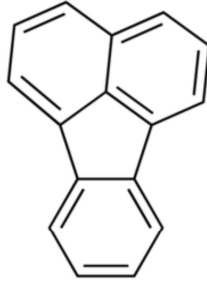


Dibenz[a,h]anthracene

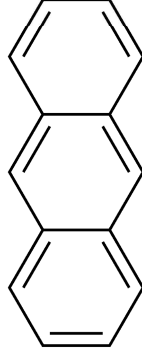
IPA



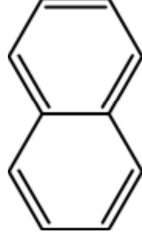
Benzo[k]fluorantene



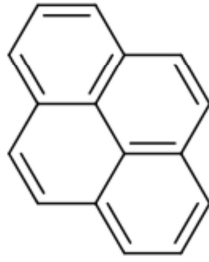
Fluorantene



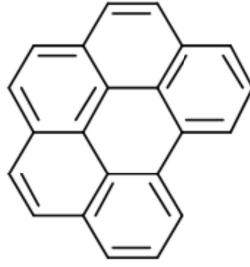
Anthracene



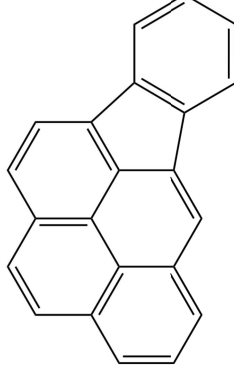
Naftalene



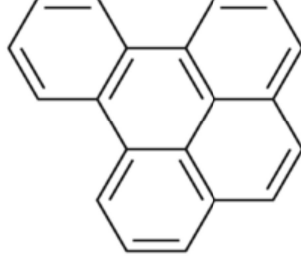
Pirene



Benzo[g,h,i]perilene



Indeno[1,2,3-cd]pirene



Benzo[e]pirene

IPA

Produzione: Materia organica esposta a temperature elevate ($>700^{\circ}\text{C}$) e in carenza di ossigeno

Le fonti sono sia antropiche che naturali

La maggior parte degli IPA presenti nell'ambiente provengono da fonti antropiche

Formazione:

- processi industriali
- lavorazione del petrolio e del carbone
- inceneritori
- emissioni dei veicoli a motore
- riscaldamento domestico a legna o carbone
- cottura di alimenti su fiamma
- fumo di tabacco
- incendi ed eruzioni vulcaniche



IPA

La presenza di IPA in alimenti non sottoposti a

trasformazione è dovuta a **contaminazione ambientale**:

- deposizione di materiale particolato ➡ grano, frutta, verdura
- assorbimento da suolo contaminato
- assorbimento da acque di fiume e di mare contaminate ➡ mitili, pesci e crostacei

Negli alimenti trasformati o lavorati la presenza di IPA è dovuta ai **trattamenti termici e processi di lavorazione**:

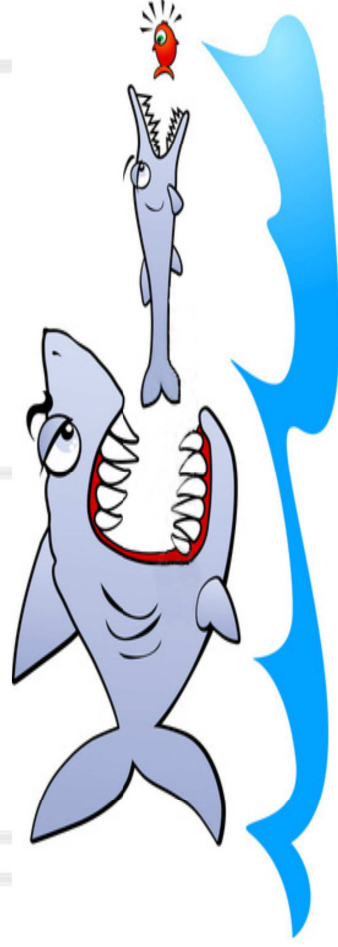
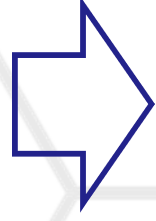
- cottura alla griglia, arrosto e al forno
- frittura
- essiccazione
- affumicatura ➡ tradizionale soppiantata dall'utilizzo del **fumo liquido** (livelli minori di IPA)



Assunzione di IPA e biomagnificazione

- Fonti di IPA sono numerose
- Si trovano in tutti i comparti ambientali
- Sono presenti come classe
- Sono composti ubiquitari

Processo di biomagnificazione



Impatto degli IPA sull'uomo

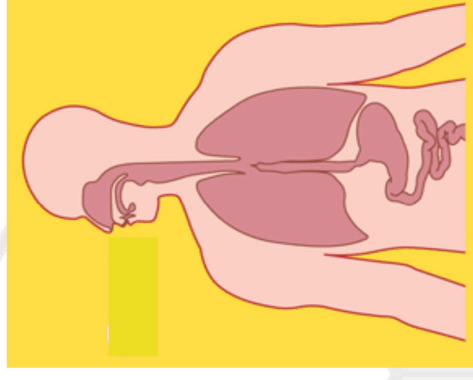
Se ingeriti o inalati vengono rapidamente assorbiti attraverso il tratto gastro-intestinale o l'epitelio polmonare



distribuiti in vari tessuti e organi



metabolizzati per aumentarne la idrofilicità e facilitarne l'escrezione

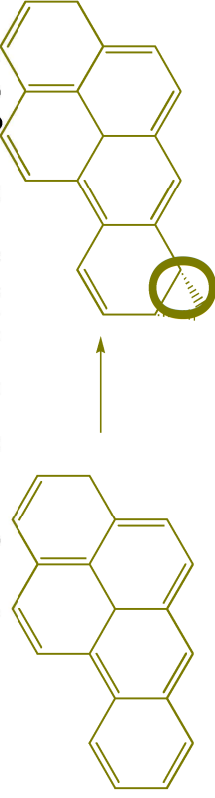


Nelle reazioni (ossidazioni) si formano intermedi elettrofili che interagiscono con molecole biologiche come il DNA promuovendo l'attività genotossica e cancerogena.

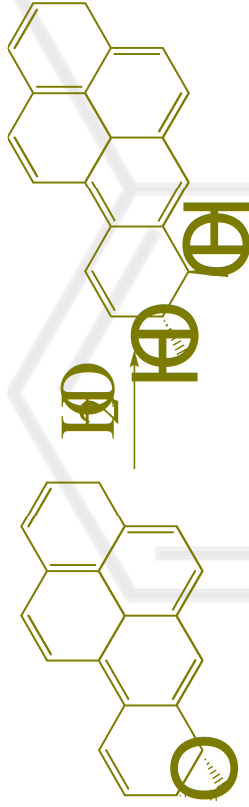
Gli IPA promuovono effetti tossici, immunosoppressione, effetti teratogeni e sulla riproduzione solo quando vengono metabolizzati



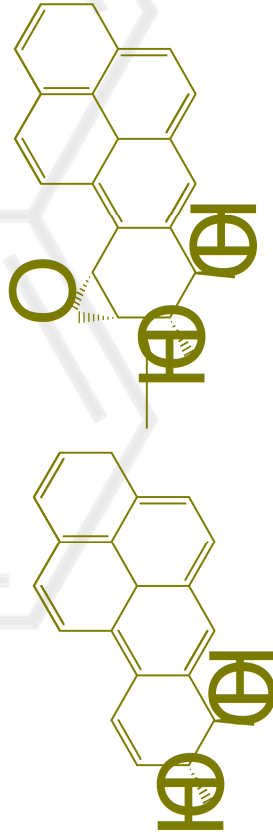
Meccanismo di cancerogenesi



Benzo[a]piren-7,8-ossido



Benzo[a]piren-7,8-diidro-7,8-diolo



Epossidazione nelle posizioni 7,8, le più reattive (regione K).

Attacco nucleofilo da parte dell'acqua, con formazione di un diolo, più idrosolubile (più facilmente eliminabile).

Una parte delle molecole del diolo vengono ulteriormente epossidate

Meccanismo di cancerogenesi



Il diolo epossidico viene legato al DNA attraverso attacco nucleofilo, ad es. da parte della adenina.
L'attacco covalente del grosso residuo idrocarburico rappresenta un danno per il DNA.

Danno  mutazioni
 cancerogenesi

Normativa

Decisione della Comunità Europea 835/2011 modifica il regolamento CE n. 1881/2006 per quanto riguarda i tenori massimi di IPA nei prodotti alimentari.

Abbassa i tenori massimi di **Benzo(a)pirene** e inserisce il limite massimo per la somma di Benzo(a)pirene, Benzo(a)antracene, Benzo(b)fluorantrene e crisene nei prodotti alimentari

Prodotti alimentari	Tenori massimi BaP (µg/kg di peso fresco)	Somma BaP, BaA, BbF, Cry
Oli e grassi (escluso il burro di cacao) destinati al consumo umano diretto o all'impiego quali ingredienti di prodotti alimentari.	2.0	10
Carni affumicate e prodotti a base di carni affumicate	2.0	12
Muscolo di pesce affumicato e prodotti della pesca affumicati, esclusi i molluschi bivalvi. Il tenore massimo si applica nei crostacei affumicati si applica al muscolo delle appendici e dell'addome. Nel caso di granchi e crostacei si applica al muscolo delle appendici.	2.0	12
Spratti affumicati e spratti affumicati in scatola. Molluschi bivalvi (freschi, refrigerati e congelati) carne e prodotti a base di carne trattati termicamente e venduti al consumatore finale.	5.0	30
Molluschi bivalvi (affumicati)	6.0	35
Alimenti a base di cereali e altri alimenti destinati ai lattanti e ai bambini	1.0	1.0
Alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento, compresi il latte per lattanti e il latte di proseguimento	1.0	1.0
Alimenti dietetici a fini medici speciali destinati specificatamente ai lattanti	1.0	1.0

Normativa

Direttiva della Comunità Europea CE 333/2007: stabilisce i metodi di campionamento e i requisiti minimi dei metodi d'analisi per il controllo ufficiale del tenore di IPA nei prodotti alimentari

Parametro	Requisito
Applicabilità	Matrici specificate nella normativa CE n°835/2011
Limite di determinazione	Non oltre 0,3 µg/kg
Limite di quantificazione	Non oltre 0,9 µg/kg
Precisione	Valori HORRA Tr o HORRATR inferiori a 1,5 nella prova di convalida collettiva
Recupero	50 %-120%
Specificità	Nessuna interferenza proveniente dalla matrice o spettrale, verifica dell'individuazione positiva

Piano Nazionale Integrato

Il Piano Nazionale Integrato è finalizzato ad orientare i controlli ufficiali per la sicurezza alimentare e per la lotta alle frodi lungo l'intera filiera produttiva, dai campi alla tavola, in funzione dei rischi.



A tal fine, le attività di controllo sulle produzioni alimentari devono essere integrate con tutti i fattori che possono condizionarle direttamente o indirettamente, quali, in particolare, la sanità ed il benessere degli animali, l'alimentazione zootecnica, la sanità delle piante ed alcune tematiche relative alla tutela dell'ambiente



Normativa

L'applicazione delle direttive e regolamenti della CE è garantita per la regione Lazio dal "Piano regionale integrato 2015-2018 sulla sicurezza alimentare" (PRIC) indica:

- i luoghi di campionamento (esercizi di vendita al dettaglio, stabilimenti di produzione/deposito),
- il numero di campionamenti che i Servizi Veterinari di ogni ASL devono eseguire annualmente.
- le matrici da campionare (prodotti ittici affumicati, prodotti a base di carne affumicati)

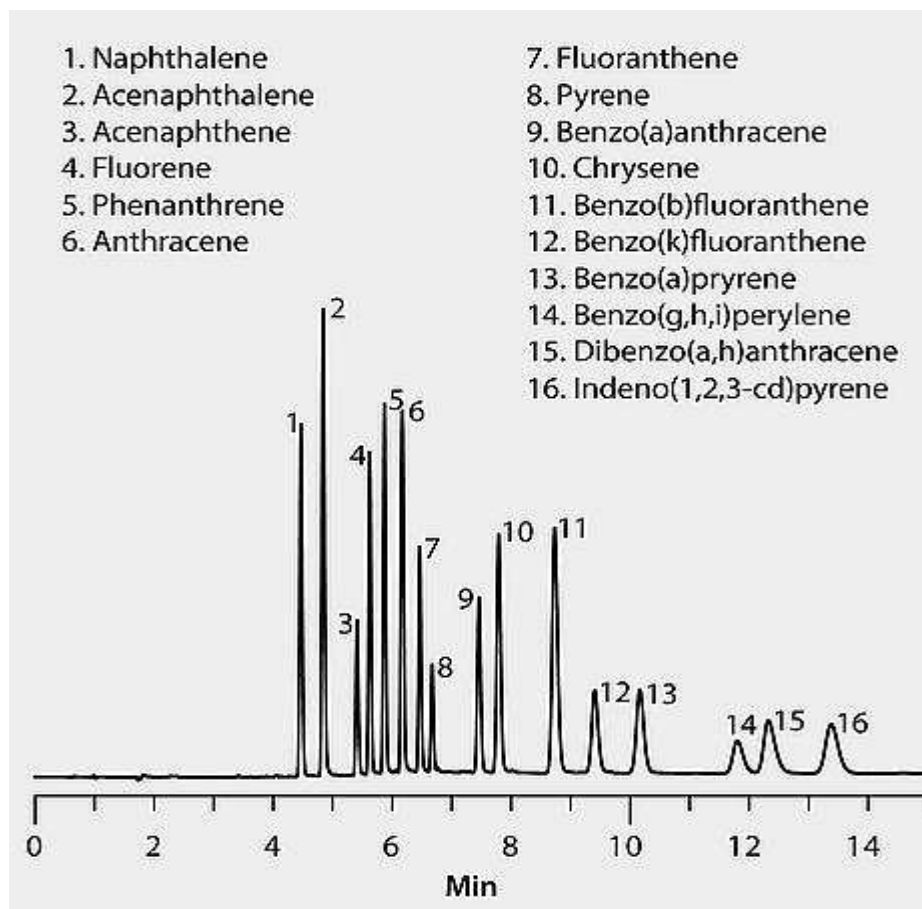
Metodo

La determinazione della
presenza di IPA in
diverse matrici
alimentari destinate al
consumo umano viene
effettuata mediante
cromatografia liquida
con rivelatore
fluorimetrico
(HPLC/FD)



Metodo

Il metodo risulta adatto all'analisi di tutti gli IPA sia per la fase estrattiva sia per la separazione cromatografica, ma abbiamo focalizzato la nostra attenzione solamente sui 4 analiti normati



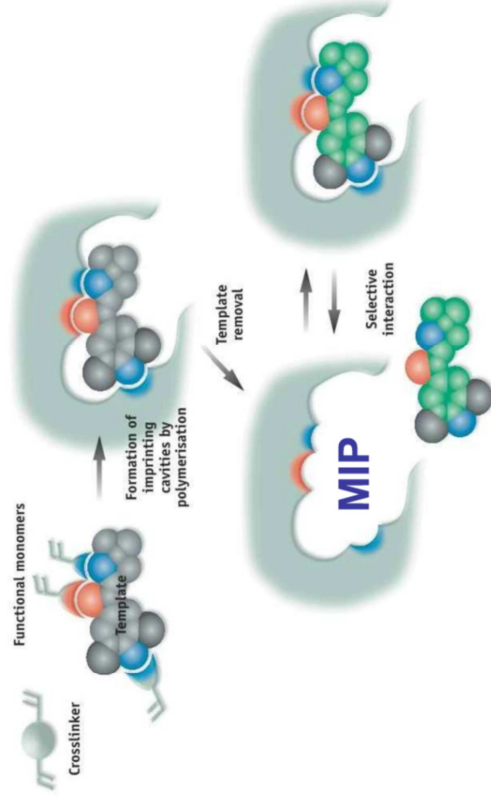
Procedura

- Estrazione del grasso dalla matrice : solvente organico o soxhlet
- Solubilizzazione della componente lipidica con solvente
- Purificazione dell'estratto su MIP
- Analisi strumentale

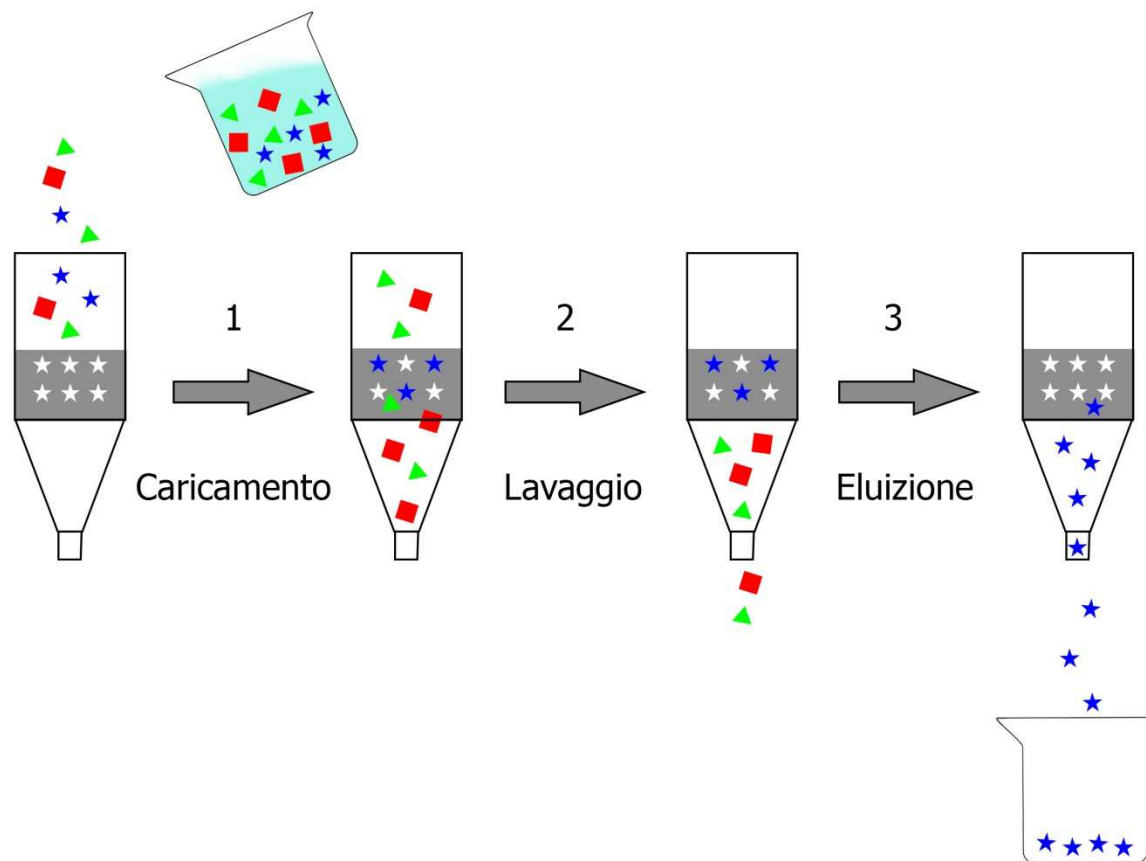
MIP Molecular Imprinted polymers

Sono una classe di polimeri altamente cross linked sviluppati per legare un analita o un gruppo di analiti strutturalmente simili.

Sono altamente specifici, sensibili, rapidi e semplice da eseguire



MIP Molecular Imprinted Polymers



Analisi HPLC/FLD

Si lavora in fase inversa utilizzando una colonna cromatografica con fase C18 (Colonna SUPELCOSIL PAH C18 - 15 cm x 4.6 mm - 5 µm)

Modalità operative:

Rivelatore a fluorescenza: $\lambda_{\text{ex/em}} = 260/420 \text{ nm}$ { Benzo[a]pirene
Benzo[b]fluorantene

$\lambda_{\text{ex/em}} = 254/390 \text{ nm}$ { Benzo[a]antracene
Crisene

Eluizione a gradiente lineare 50-100% Acetonitrile in 35 minuti

Analisi quantitativa

Identificazione

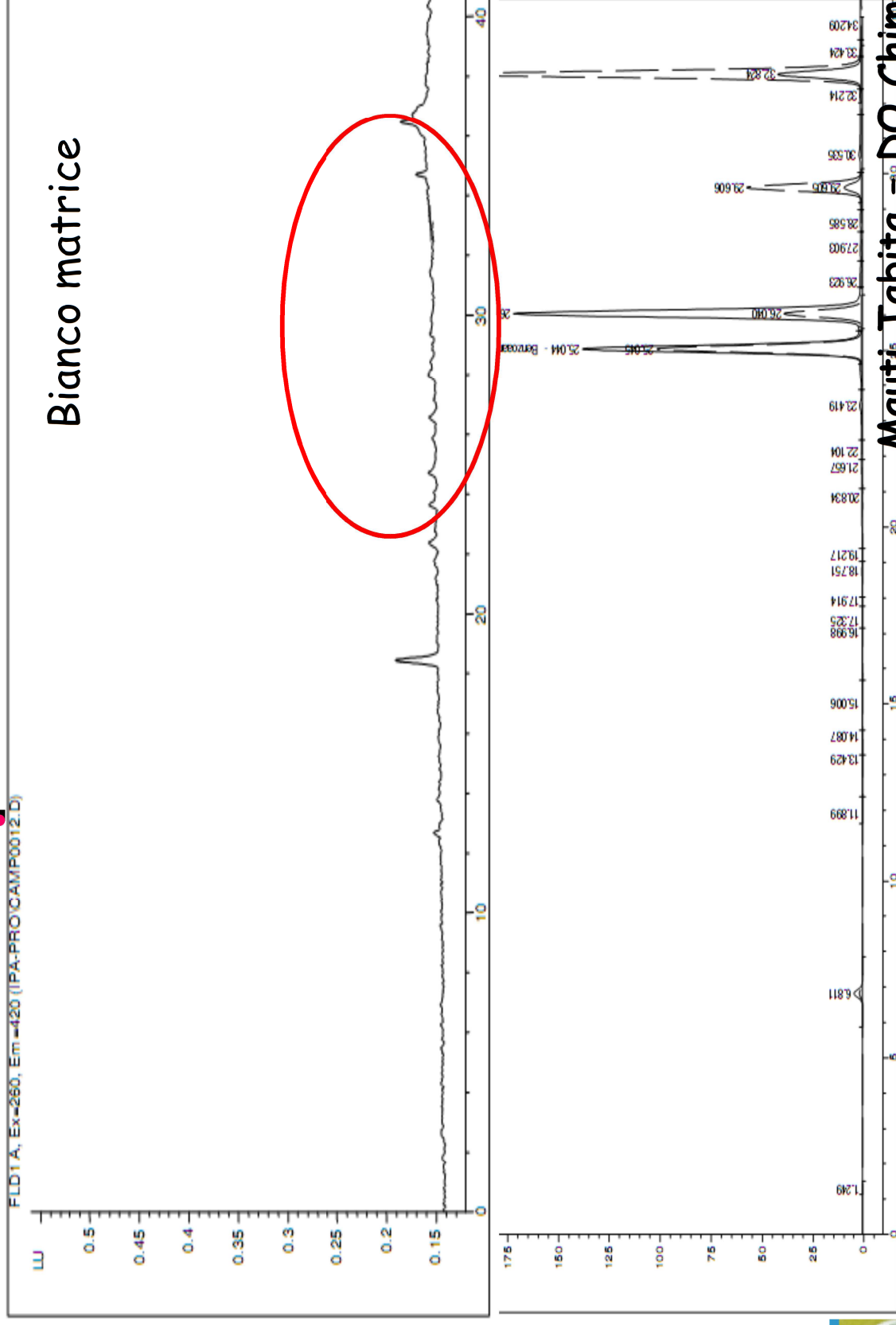
Confronto tra il tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco dello standard esterno, è accettata una variazione di $\pm 5\%$

Quantificazione

Costruzione della curva di taratura

Confronto tra aree integrate del picco del campione e dello standard esterno

Specificità



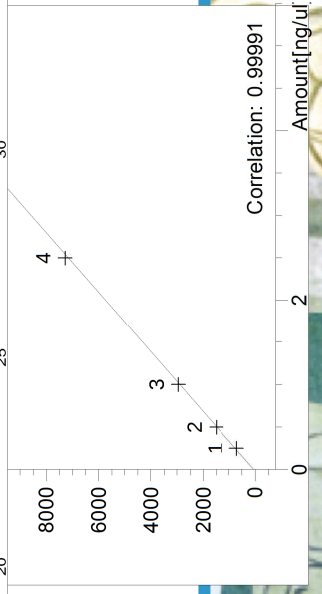
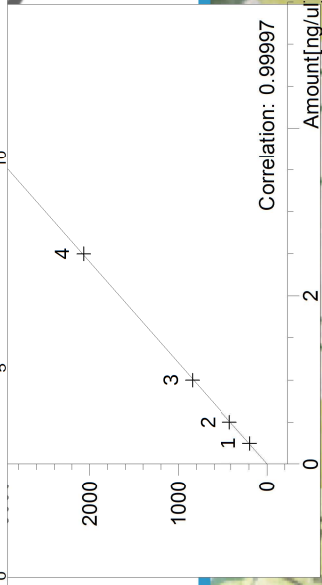
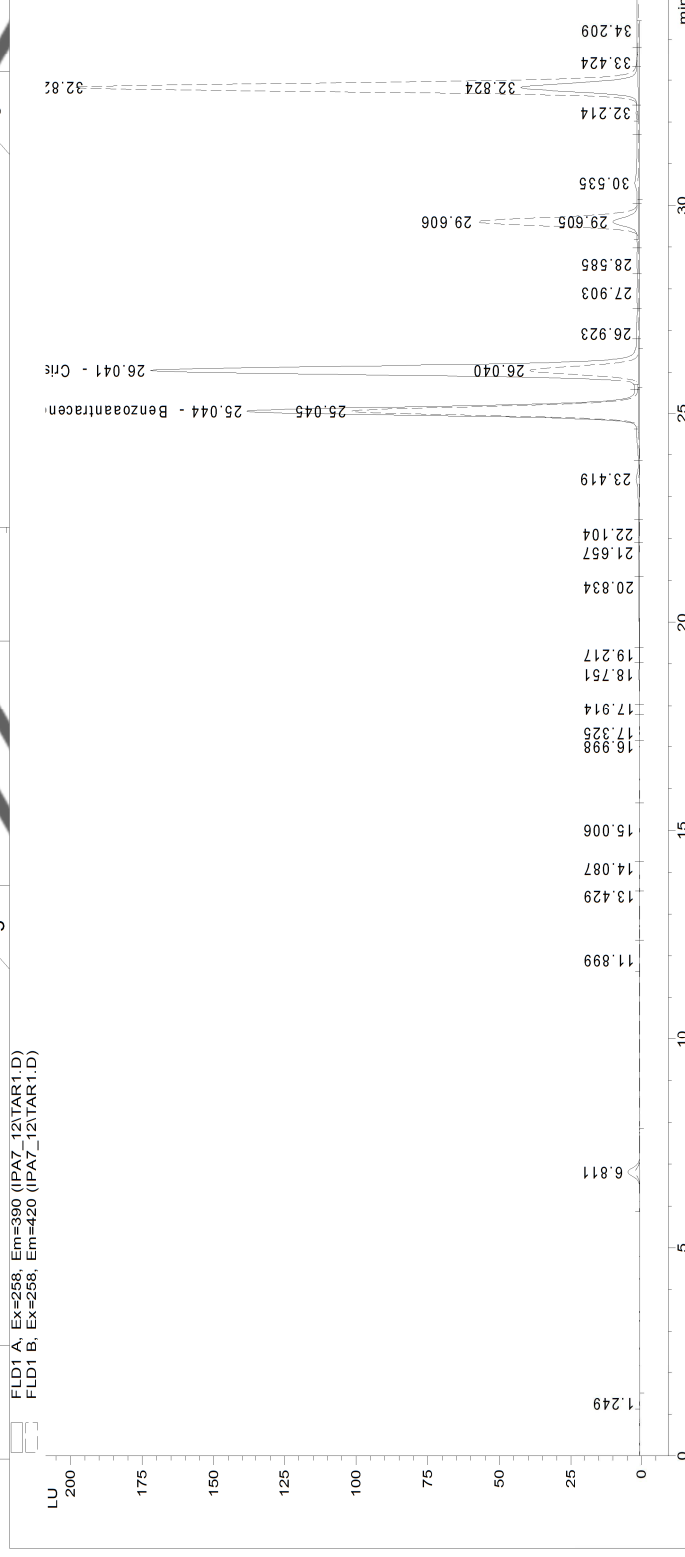
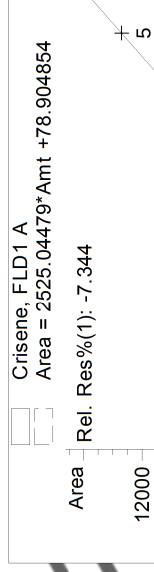
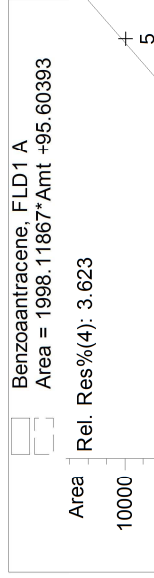
Mauri Tabita - DO Chimica

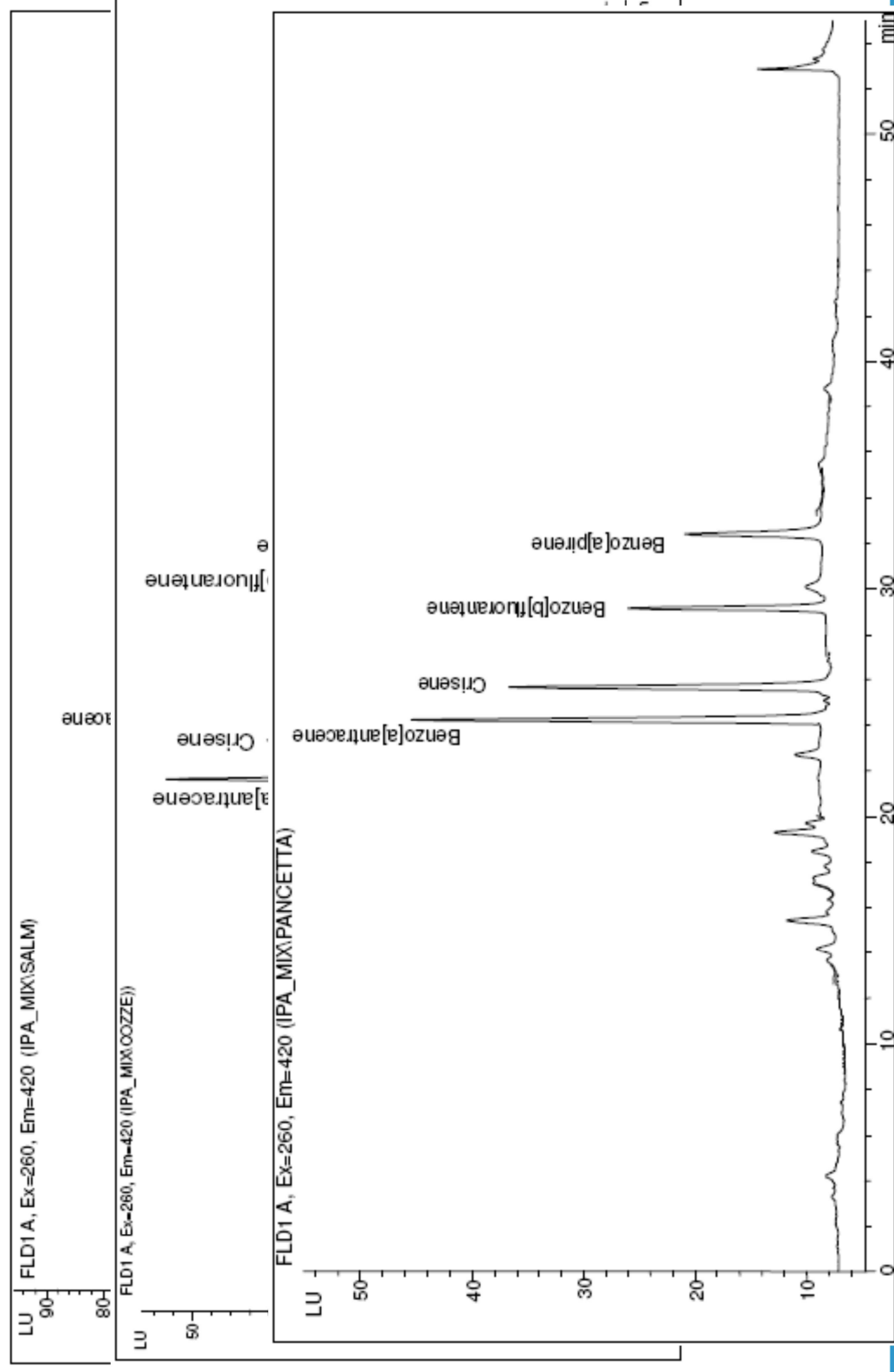
6 Maggio 2015



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
Toscana e Marche

Rette di taratura





Conclusioni

- Il metodo è molto sensibile
- Analisi è relativamente semplice
- Le matrici analizzate mostrano raramente la presenza di tutti e 4 gli IPA considerati e sempre in livelli minori rispetto ai limiti massimi previsti dalla Raccomandazione CE 835/2011
- I dati del PRIC relativi al triennio 2011-2013 non hanno evidenziato non conformità in 146 campioni di alimenti arrostiti o affumicati

Conclusioni

- Sono rispettati i parametri sia di specificità sia di recupero
- Gli altri parametri presenti nella Raccomandazione CE 333/2007 sono stati considerati nella prova di validazione del metodo.

...prospettive future...

- Ampliare il metodo a tutti gli IPA
- Automatizzare la fase di estrazione del grasso dalla matrice
- Analisi in GC/MS



Grazie dell'attenzione!!!!

