



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

# I Fenoli: una questione perniciosa

A decorative banner at the bottom of the slide features a horizontal strip of abstract art with various colors and line patterns. Overlaid on this banner is the text: 

Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI  
CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”

- Cosa sono i fenoli
- Esempi di fenoli “Buoni”
- I fenoli come contaminanti chimici
- Tecniche analitiche per la determinazione dei fenoli
- Risultati delle attività della DOC

**pernicióso (ant. pernizióso)** agg. [dal lat. perniciosus, der. di perniciēs: v. perniciē]. – **Che provoca danni molto gravi, che comporta effetti nocivi, talvolta addirittura funesti o esiziali** (riferito ad atti, comportamenti, eventi e sim.): errore, consiglio, atto p.; è stata una decisione veramente p.; si è messo in un’impresa p.; lo scontro tra fazioni ebbe effetti p.; Fuggi ratto, o signor; fuggi da tanto Pernicioso influsso (Parini). In medicina, detto di particolari forme cliniche di alcune malattie o sindromi, che, a differenza di altre analoghe affezioni, possono presentare decorso molto grave: malaria p. o febbre p. (anche come s. f., la perniciosa), la forma più grave di malaria (causata da uno sporozoo, *Plasmodium falciparum*), tale da provocare da sola, in assenza di complicazioni, la morte in breve tempo, che può manifestarsi o come aggravamento dei sintomi associati a una febbre continua oppure con la comparsa improvvisa di un nuovo sintomo o complesso di sintomi in concomitanza con l’attacco febbrile: se ne distinguono varie forme a seconda della prevalenza sintomatologica (tifosa, biliosa, comatosa, tetanica, bulbare, ecc.). Per l’anemia p., v. anemìa. ♦ Avv. perniciosaménte, in modo pernicioso, con effetti perniciosi: le tensioni sociali influiscono perniciosamente sulla stabilità politica ed economica del paese.

I fenoli sono sostanze derivate dagli idrocarburi aromatici per la sostituzione di uno o più atomi di idrogeno con gruppi ossidrilici -OH.[1] Capostipite di questa classe, da cui prende anche il nome, è il fenolo, di formula  $C_6H_5OH$ , in cui un atomo di idrogeno del benzene è sostituito da un gruppo -OH.

Come gli alcoli sono ossidabili; in particolare si comportano come alcoli alifatici terziari, in quanto per ossidazione la molecola viene spesso completamente degradata.

A differenza degli alcoli sono però acidi: l'anione che si forma per perdita dell'idrogeno del gruppo -OH è particolarmente stabile, dato che la risonanza disperde la carica elettrica negativa su tutto l'anello aromatico.

La presenza di gruppi elettron-attrattori migliora l'effetto di dispersione della carica aumentando l'acidità del composto. Analogamente, gruppi elettron-repulsori rendono invece più difficile disperdere la carica negativa e quindi diminuiscono l'acidità.

composto    pKa

fenolo        9,98

p-cresolo    10,20 (il p-cresolo reca sull'anello un gruppo -CH<sub>3</sub> elettron-repulsore)

acido picrico 0,38 (l'acido picrico reca sull'anello tre gruppi -NO<sub>2</sub>, elettron-attrattori)

I fenoli subiscono facilmente reazioni di sostituzione elettrofila nelle posizioni orto e para.

## I POLIFENOLI

I polifenoli costituiscono una famiglia di circa 5000 molecole organiche naturali, seminaturali o sintetiche largamente presenti nel regno vegetale. Sono caratterizzati, come indica il nome, dalla presenza di molteplici gruppi fenolici associati in strutture più o meno complesse generalmente di alto peso molecolare. Il numero e le caratteristiche di tali strutture fenoliche sottolineano le uniche proprietà fisiche, chimiche, e biologiche (metaboliche, tossiche, terapeutiche, ecc) di membri particolari della classe di polifenoli.

Questi composti sono spesso il prodotto del metabolismo secondario delle piante.

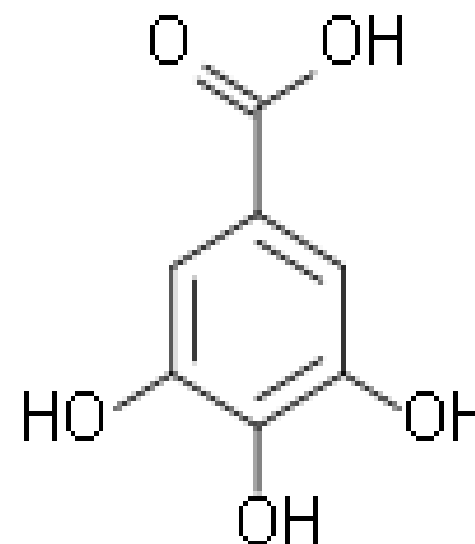
I polifenoli sono antiossidanti naturali presenti nelle piante (molecole polifenoliche tipo bioflavonoidi noti come procianidine, proantocianidine, leucoantocianidine, piconogenoli, tannini, ecc.) e possono risultare utili nella prevenzione dell'ossidazione delle lipoproteine e nel reagire con i radicali liberi, eliminandoli; sono accertati inoltre effetti biomedici positivi a livello cardiovascolare, di malattie legate alla senescenza e di arresto della crescita tumorale.



L'acido gallico o acido triidrossibenzoico è un acido organico contenuto in molti prodotti di origine vegetale. La formula chimica è  $C_6H_2(OH)_3COOH$ .

Tra i fenoli di origine naturale rientra nella categoria degli acidi fenolici; ha azione antiossidante.

Il suo nome ha origine dalle galle, escrescenze che si formano sulle foglie o sui rami dei vegetali, dovute alla parassitosi di funghi, batteri, insetti o acari.



**ACIDO GALLICO**



L'acido gallico è prodotto dalla pianta per combattere la proliferazione cellulare. È comune nelle specie vegetali legnose, presente in forma solubile come estere dell'acido chinico o legato a glucosio nei gallotannini. Oltre a trovarsi nelle foglie e nelle radici di alcune piante si trova anche nei semi e nei frutti come le olive, ed è per questo uno dei **polifenoli contenuti nell'olio d'oliva**. Si trova anche in more,

lamponi, fragole e mango.

In campo medico, l'acido gallico è un potente antiemorragico ed è utilizzato nei casi di menorragia.

Alcuni suoi esteri (etilico, propilico, ottilico, ecc.) sono ampiamente utilizzati come conservanti alimentari ad azione antiossidante



## **I Flavonoidi**

I flavonoidi sono dei composti polifenolici metaboliti secondari delle piante. Sono principalmente idrosolubili, sono di solito presenti nella pianta come glicosidi e nella stessa pianta un aglicone può esistere in combinazione con diversi zuccheri. Si conoscono attualmente più di 4000 glicosidi dei flavonoidi e più di 1800 agliconi appartenenti a questa classe.

Il termine è completamente interscambiabile con bioflavonoidi, nome con il quale sono comunemente conosciuti questi nutrienti. Talvolta vengono raggruppati con la denominazione vitamina P.



## PCP

Il pentaclorofenolo (PCP) è un composto organoclorato usato come pesticida e disinfettante. Prodotto per la prima volta nel 1930, è stato commercializzato con diversi nomi commerciali. Si può trovare in due forme: PCP come tale oppure come sale sodico del PCP, che si dissolve facilmente in acqua.

Il composto viene impiegato, prevalentemente come sale sodico, come insetticida contro le termiti, defogliante prima della mietitura, diserbante, fungicida, molluscidicida e antivegetativo in generale. È contenuto, come conservante, in prodotti come legno, prodotti del legno, tessuti, amido, destrine e colle.

L'esposizione a breve termine a grandi quantità di PCP può causare effetti dannosi a carico del fegato, reni, sangue, polmoni, sistema nervoso centrale, sistema immunitario, tratto gastrointestinale. Studi sperimentali eseguiti hanno evidenziato una **DL50** pari a 146 mg/kg peso corporeo nel ratto maschio e 175 mg/kg nel ratto femmina. **Nell'uomo la dose letale minima è di circa 1 g. Concentrazioni plasmatiche superiori a 30 µg/ml sono considerate tossiche. In due casi letali, i rilevamenti post-mortem delle concentrazioni di pentaclorofenolo nei vari distretti sono stati i seguenti: 113 e 156 µg/ml nel sangue, 14 e 35 µg/g nel cervello, 123 µg/g nel rene, 94 e 134 µg/g nel fegato e 520 µg/ml nelle urine.** In Gran Bretagna il valore massimo consentito di esposizione, in campo occupazionale, è pari a 0,5 mg/m<sup>3</sup> per lunghi periodi e 1,5 mg/m<sup>3</sup> per brevi periodi.

L'esposizione a pentaclorofenolo può comportare l'insorgenza di neoplasie maligne (linfoma non-Hodgkin, mieloma multiplo, cancro del rene), anemia aplastica, pancreatiti, emolisi intravascolare, e orticaria. **L'assorbimento involontario di pentaclorofenolo può portare ad avvelenamento acuto caratterizzato da innalzamento del metabolismo basale accompagnato da ipertermia, sudorazione profusa, sete, agitazione, nausea, dolore addominale, affaticamento, movimenti incoordinati, aumento della frequenza e della profondità della respirazione, tachicardia, coma.** La morte sopraggiunge per insufficienza respiratoria. Il contatto con PCP (in particolare sotto forma di vapore) può irritare la pelle, gli occhi e le alte vie respiratorie. L'esposizione a lungo termine a livelli bassi come quelli che si verificano sul posto di lavoro può invece causare danni al fegato, ai reni, al sangue e al sistema nervoso.



## **Gli Alchifenoli**

Gli alchilfenoli (AP) sono sostanze chimiche non alogenate usate quasi esclusivamente per produrre gli alchilfenoli etossilati (APE), un gruppo di tensioattivi non ionici. Gli APE più comunemente impiegati sono i nonilfenoli etossilati (NPE) e, in misura minore, gli ottilfenoli etossilati (OPE). Una volta rilasciati nell'ambiente, gli alchilfenoli etossilati possono essere nuovamente degradati in alchilfenoli, che sono persistenti, bioaccumulabili e tossici per gli organismi acquatici. .



## I Nonilfenoli

I nonilfenoli etossilati sono stati utilizzati come agenti tensioattivi, emulsificatori, disperdenti e imbibenti in varie applicazioni industriali e nei prodotti di consumo. Delle 77.000 tonnellate utilizzate in Europa occidentale nel 1997, gran parte (quasi il 30%) era impiegata nei detergenti ad uso industriale e domestico, anche se significative quantità erano anche utilizzate come emulsificatori (11%), prodotti nell'industria tessile (10%) e del cuoio (7%), ingredienti di pesticidi ed altri prodotti agricoli (6%) e di vernici ad acqua (OSPAR 2001). Inoltre, si segnala che una porzione rilevante di queste sostanze (16%, vale a dire oltre 12.000 tonnellate) sia stata impiegata in “mercati di nicchia” (come ingredienti nei cosmetici, negli shampoo ed in altri prodotti per la cura personale) ed in altre applicazioni di cui non si conosce con certezza la destinazione finale (forse colle e sigillanti). Si riscontra inoltre l'uso dei derivati degli NP come antiossidanti in alcuni tipi di plastica (Guenther et al. 2002).

Il rischio più generale associato agli alchilfenoli (sia NP che OP) risiede senz'altro nella loro **attività estrogenica**, vale a dire la loro capacità di imitare gli ormoni estrogeni naturali. Questo può portare ad uno sviluppo sessuale alterato in alcuni organismi, di cui l'esempio più noto è la **“femminizzazione”** dei pesci (Jobling et al.,

1995, 1996), un fattore che si ritiene abbia contribuito significativamente ai diffusi cambiamenti nello sviluppo sessuale e nella fertilità dei pesci nei fiumi del Regno Unito (Jobling et al. 2002). Atienzar et al. (2002) hanno recentemente descritto gli effetti diretti dell'NP sulla struttura e funzione del DNA nelle larve dei cirripedi (crostacei), un meccanismo che potrebbe essere responsabile per gli effetti di sconvolgimento ormonale rilevati in questi organismi.

**I rischi per la salute umana rimangono poco chiari, anche se studi recenti hanno evidenziato pericoli che potrebbero direttamente interessare l'uomo.** Ad esempio, Chitra et al. (2002) descrivono effetti sulla funzione spermatica nei mammiferi, mentre recentemente sono anche stati riscontrati danni al DNA nei linfociti umani

# Scopi della spettrometria di massa

Determinazione del peso molecolare

Delucidazione della struttura molecolare

Identificazione di componenti di una miscela

Indagini quantitative

Studi meccanicistici

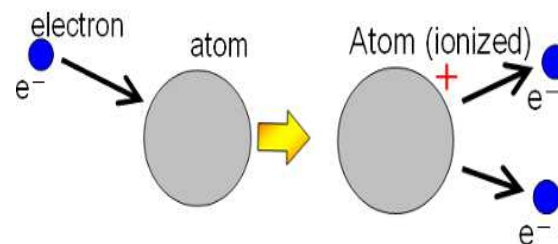
Studio di interazioni intermolecolari

## Hard Ionization:

- Ionizzazione elettronica  
- Electron Ionization (EI)

## Soft Ionization:

- Ionizzazione chimica  
Chemical Ionization (CI)
- Bombardamento con atomi veloci  
- Fast Atom Bombardment (FAB)
- Ionizzazione termospray  
- Thermospray Ionization (TSP)
- Ionizzazione elettrospray  
- Electrospray Ionization (ESI)
- Ionizzazione chimica a pressione atmosferica  
- Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)
- Desorbimento laser assistito da matrice  
- Matrix Assisted Laser Desorption (MALDI)

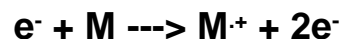


# Ionizzazione elettronica (EI)

Nella camera di ionizzazione le molecole del campione da analizzare, in fase gassosa, interagiscono con un fascio di elettroni generato da un filamento incandescente (Renio o Tugsteno) ed accelerato attraverso un potenziale regolabile dall'operatore. L'energia del fascio e' normalmente fissata a 70 eV.

Durante l'avvicinamento degli elettroni alla molecola bersaglio, l'onda elettronica ed il campo elettrico molecolare interagiscono tra di loro con una mutua distorsione. L'onda elettronica distorta puo' essere considerata composta da un insieme di radiazioni di differente lunghezza d'onda, alcune delle quali hanno la frequenza corretta per interagire con gli elettroni della molecola.

In termini quantomeccanici l'impatto elettronico puo' quindi promuovere eccitazioni elettroniche simili a quelle osservate nella spettroscopia UV, fino ad ottenere anche l'espulsione di un elettrone dalla molecola con formazione di uno ione radicale positivo, lo Ione Molecolare  $M(.+)$ :





## MS process

### Ionization

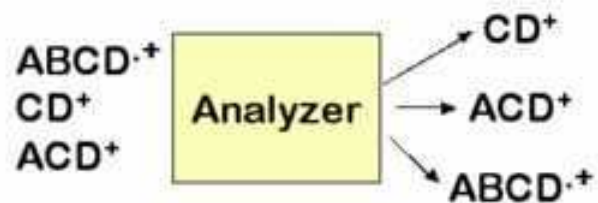


### Fragmentation



and so on.

### Mass analysis and detection







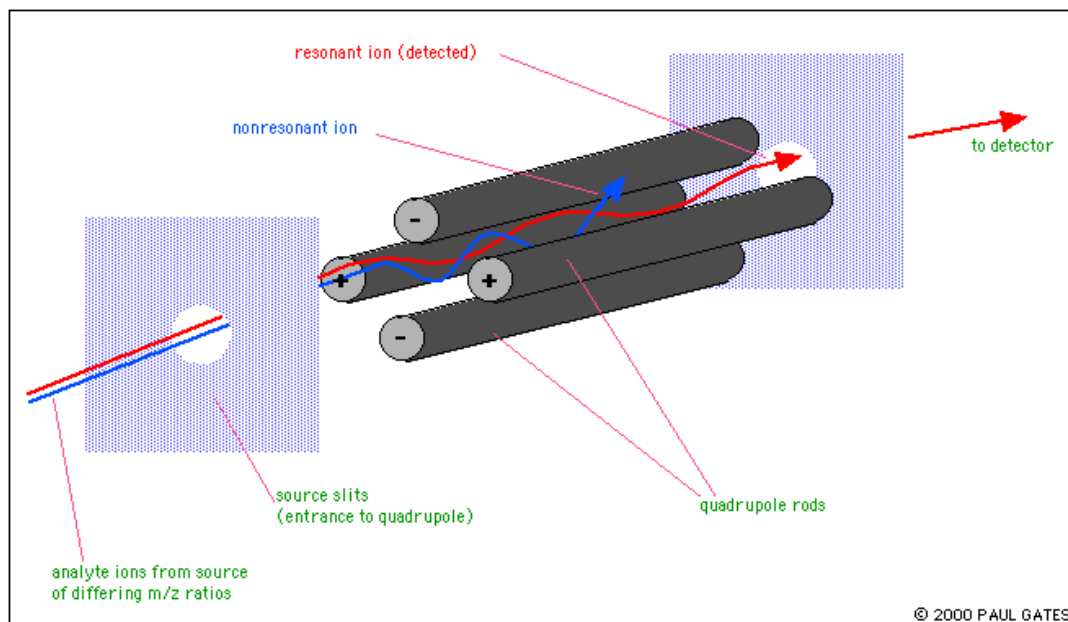
Nella comune pratica di laboratorio, si suggerisce prima di tutto di eseguire un confronto computerizzato dello spettro appena registrato con il vasto archivio di spettri ormai disponibile su tutti gli spettrometri commerciali. Anche se la molecola esaminata non e' compresa nell'archivio, l'elaboratore elenca una serie di composti che contengono il maggior numero possibile di ioni comuni con lo spettro incognito. L'identificazione di ioni caratteristici e' uno stadio importante anche nell'interpretazione "manuale" degli spettri di massa: l'aiuto di un computer quindi non guasta.

Nell'interpretazione non assistita, normalmente si segue una procedura abbastanza semplice:

**1.Identificazione dello ione molecolare.**

**2.Identificazione di ioni caratteristici.**

**3.Identificazione di processi di frammentazione caratteristici.**



L'analizzatore a quadrupolo consiste in un tubo rettilineo in cui è fatto il vuoto ed in cui sono presenti quattro barre parallele, disposte simmetricamente intorno all'asse del tubo, di sezione circolare oppure iperbolica. Le barre diametralmente opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti è applicata un voltaggio formato da due componenti: una differenza di potenziale continua e una oscillante ad alta frequenza. **Lo ione entra nell'analizzatore parallelamente all'asse z, ed è spinto dai campi elettrici continuo e oscillante a seguire una traiettoria a spirale .**

## ITD

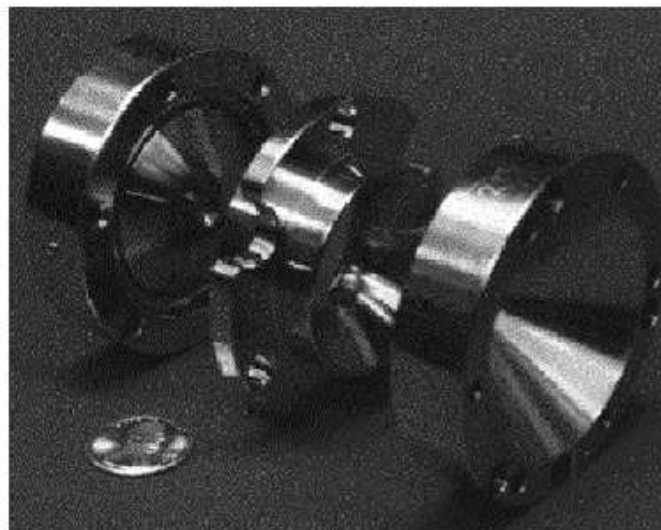
Concettualmente, una trappola ionica di Paul può essere immaginata come un quadrupolo avvolto su se stesso a formare un anello chiuso. La barra interna è ridotta a un punto nel centro della trappola, la barra esterna è l'elettrodo circolare e le barre all'estremità costituiscono i “tappi”.

La sovrapposizione di un potenziale diretto con uno alternato danno una specie di ‘quadrupolo 3D’ in cui ioni di tutte le masse sono intrappolati in una traiettoria 3D.

Gli inventori proposero l'uso di questa trappola ionica come spettrometro di massa applicando una frequenza di risonanza lungo l'asse z per espellere gli ioni di una certa massa.



## Paul ion trap



assemblata (tagliata a metà) e  
non assemblata

## MOTO DEGLI IONI



Figures obtained when injecting a fine dust of aluminium in a quadrupolar field such as is encountered in an ion trap. The particles altogether rotate along  $r$  and oscillate along  $z$ , yielding a figure-of eight trajectory.



## Metodo PCP

### Estrazione:

- Acetonitrile : acqua (1:1 v/v)
- sali Quechers fase 1

prima dell'estrazione si aggiunge  
lo standard PCP  $^{13}\text{C}_6$





## Derivatizzazione:

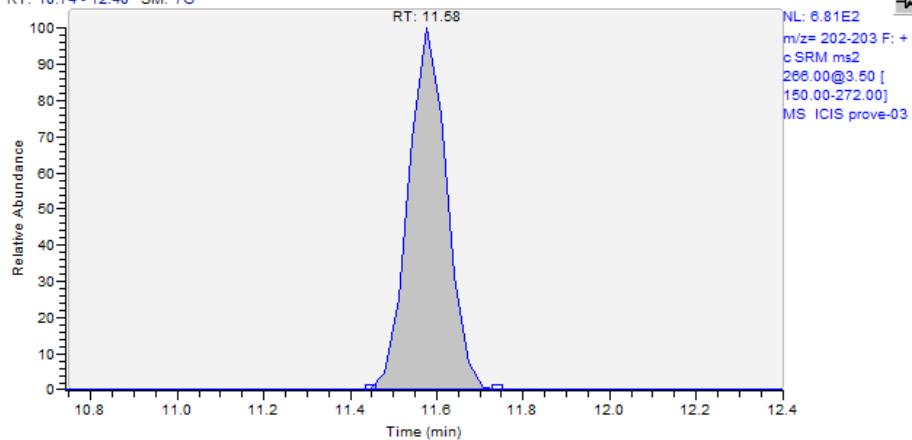
- Carbonato di potassio anidro
- Anidride acetica anidra
- Esano per pesticidi



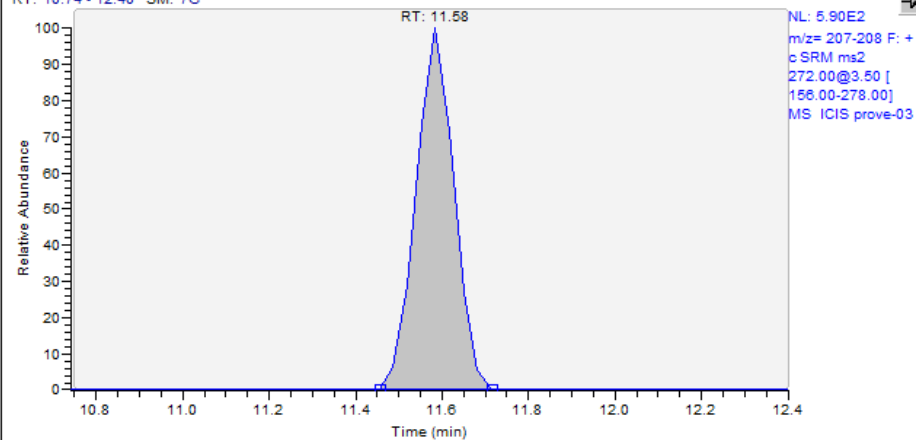


Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

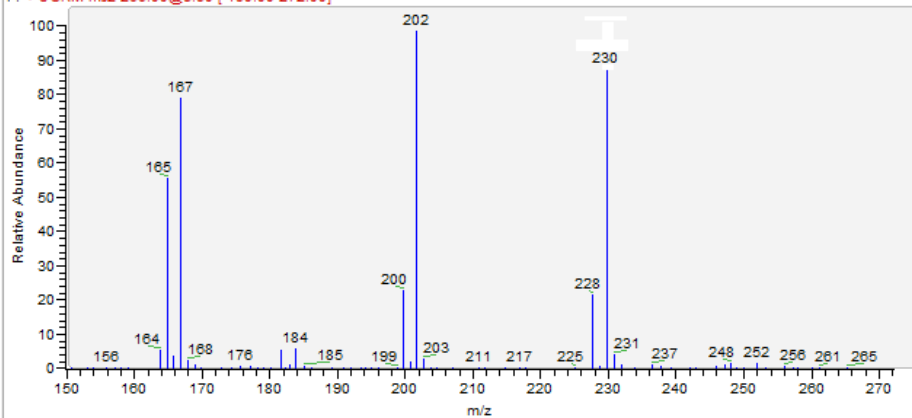
RT: 10.74 - 12.40 SM: 7G



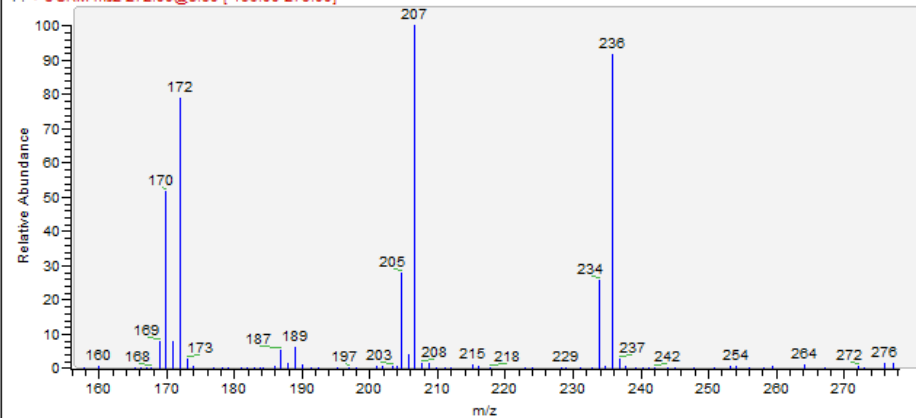
RT: 10.74 - 12.40 SM: 7G



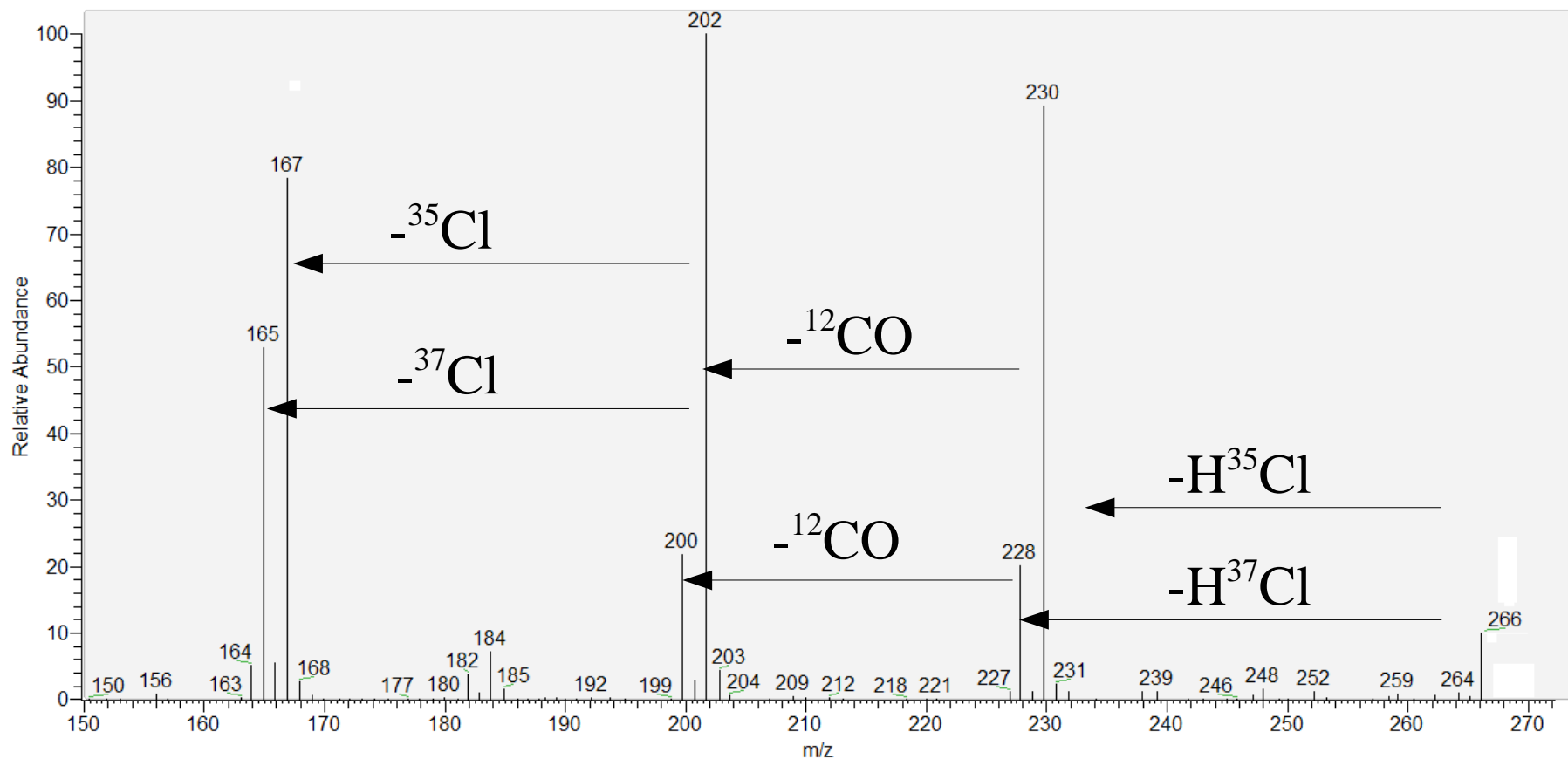
prove-03 #682-696 RT: 11.54-11.61 AV: 3 SB: 25 11.13-11.46 , 11.71-12.18 NL: 7.25E2  
F: + c SRM ms2 266.00@3.50 [ 150.00-272.00]



prove-03 #686-695 RT: 11.55-11.62 AV: 3 SB: 28 11.07-11.47 , 11.74-12.20 NL: 6.13E2  
F: + c SRM ms2 272.00@3.50 [ 156.00-278.00]



Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI  
CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”



MS mode:	Single-stage MS (unit mass resolution)	Single-stage MS (high resolution/high mass accuracy)	MS/MS
<b>Typical systems (examples):</b>	Quadrupole, ion trap, time-of-flight (TOF)	TOF, Orbitrap, FTMS, magnetic sector	Triple quadrupole, ion trap, hybrid MS (e.g. Q-TOF, Q-trap)
<b>Acquisition mode:</b>	Full scan, Limited $m/z$ range, Selected ion monitoring (SIM)	Full scan, Limited $m/z$ range, Selected ion monitoring (SIM)	Selected/multiple reaction monitoring (SRM/MRM), full scan product-ion spectra
<b>Requirements for identification:</b>	$\geq 3$ diagnostic ions, preferably including the (quasi) molecular ion	$\geq 2$ diagnostic ions, preferably including the (quasi) molecular ion; mass accuracy $< 5$ ppm; at least one fragment ion	$\geq 2$ product ions
	<b>Ion ratio(s):</b> according to Table 5		



Ion ratio (least/most intense ion)	Maximum tolerance (relative) for GC-EI-MS	Maximum tolerance (relative) for LC-MS <sup>n</sup> , LC-MS, GC-MS <sup>n</sup> , GC-CI-MS
0.50-1.00	± 10 %	± 30 %
0.20-0.50	± 15 %	± 30 %
0.10-0.20	± 20 %	± 30 %
<0.10	± 50 %	± 30 %



IDENTIFICATION CRITERIA SHEET (2002/657/EC)  
FOR CONFIRMATORY METHODS BASED ON CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY  
Version 1

Date	21/12/2011	GC-EI-MS	GC-CI-MS	GC-HR-MS	GC-MS/MS	LC-MS/MS
------	------------	----------	----------	----------	----------	----------

XXXXXXXXXX

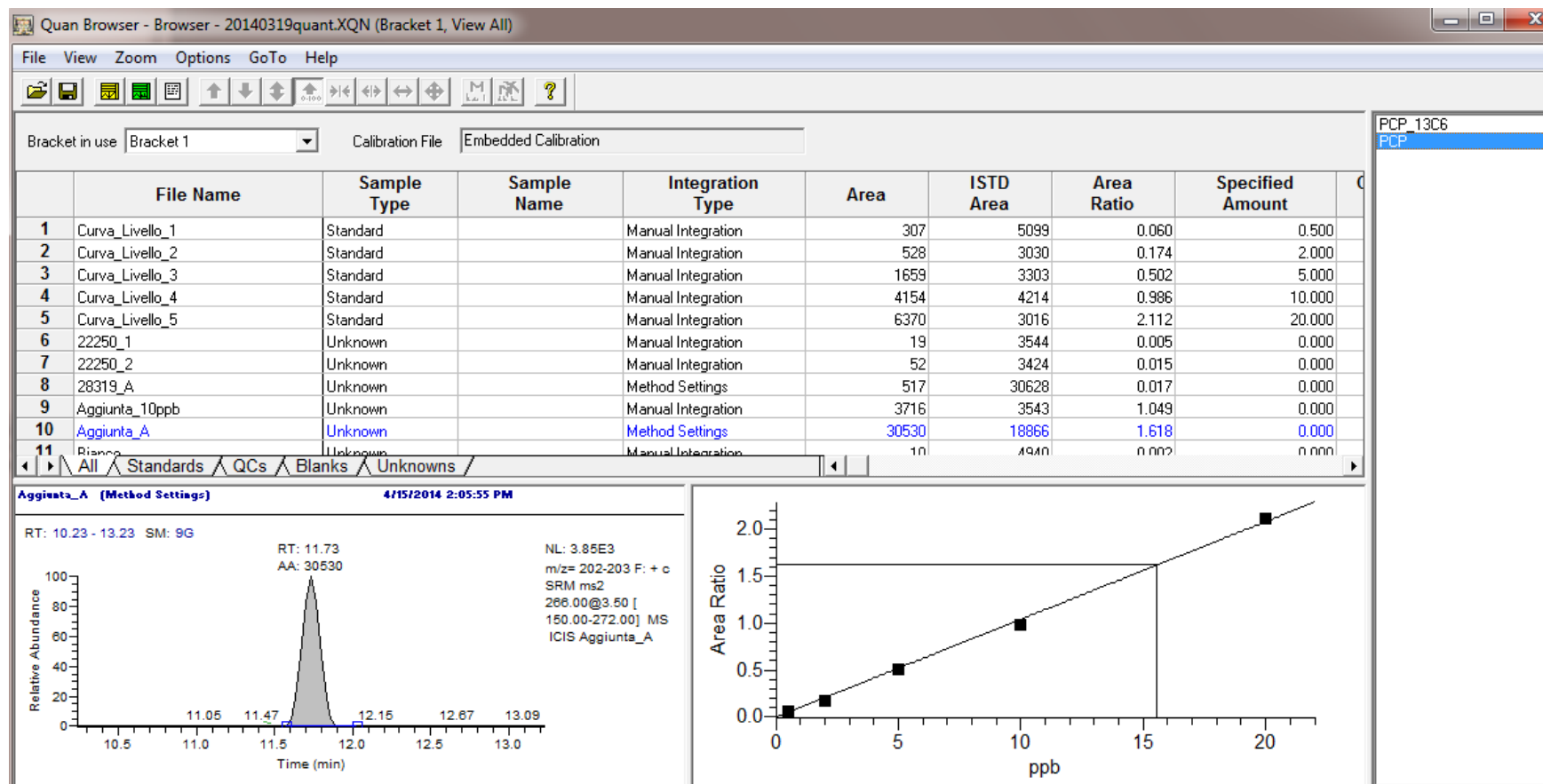
Analyte :	<b>2,4-D-Metilestere</b>		Reference	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
Matrix :									
Sample identification	<b>Std_5_ppb</b>								
RT Internal Standard (min)			15,900	15,880					
RT Analyte (min)			14,540	14,510					
RRT Analyte			0,914	0,914					
Tolerance RRT	+/- (%)	0,5	0,910   0,919	IN					
Internal Standard signal			2054	2508					
Analyte signal 1 (base peak)	>		2333	457					
Analyte signal 2	>		1385	285					
Analyte signal 3	>								
Analyte signal 4	>								
Ion Ratio 1 (signal 2 / signal 1)			0,594	0,624					
Tolerance Ion Ratio 1	+/- (%)	10	0,534   0,653	IN					
Ion Ratio 2 (signal 3/signal1)									
Tolerance Ion ratio 2	+/- (%)								
Ion Ratio 3 (signal 4 / signal 1)									
Tolerance Ion Ratio 3	+/- (%)								
Identification points				2,0					
Conclusion				<b>PRESENCE NON CONFIRMED</b>					
Estimated concentration	Unit :								
Comments	Internal STD : TCPF								

General Informations

Signals

Automatic Calculation/Conclusion





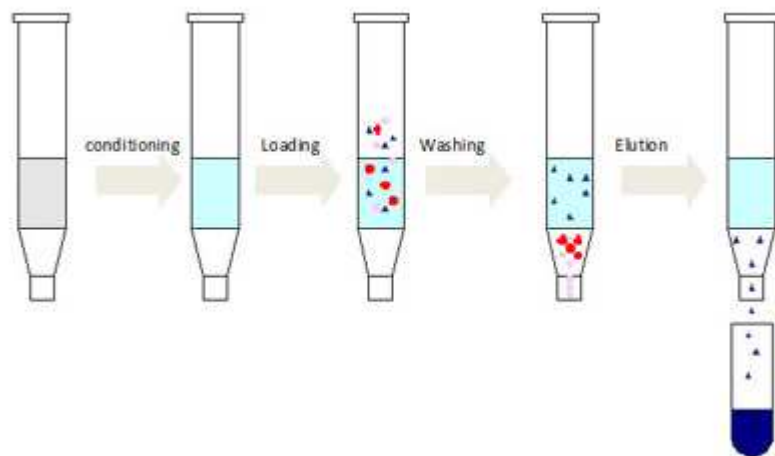
## Metodo NF

### Estrazione:

Estrazione della parte lipidica del campione mediante opportuno solvente  
aggiunta della miscela tecnica di NF e dello standard interno Ep-F  $^{13}\text{C}_6$

### Purificazione:

#### Colonne SPE OASIS

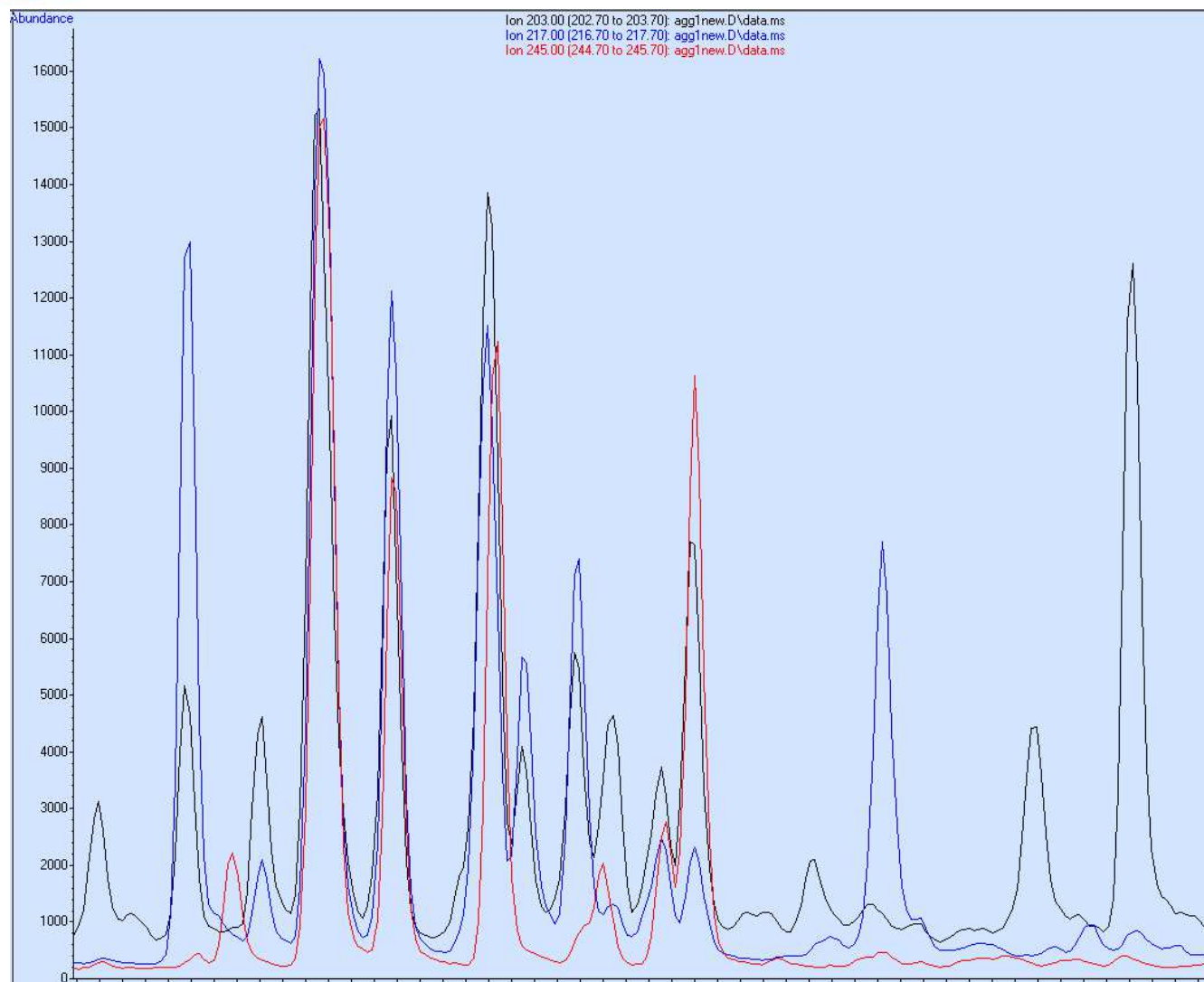


## Derivatizzazi



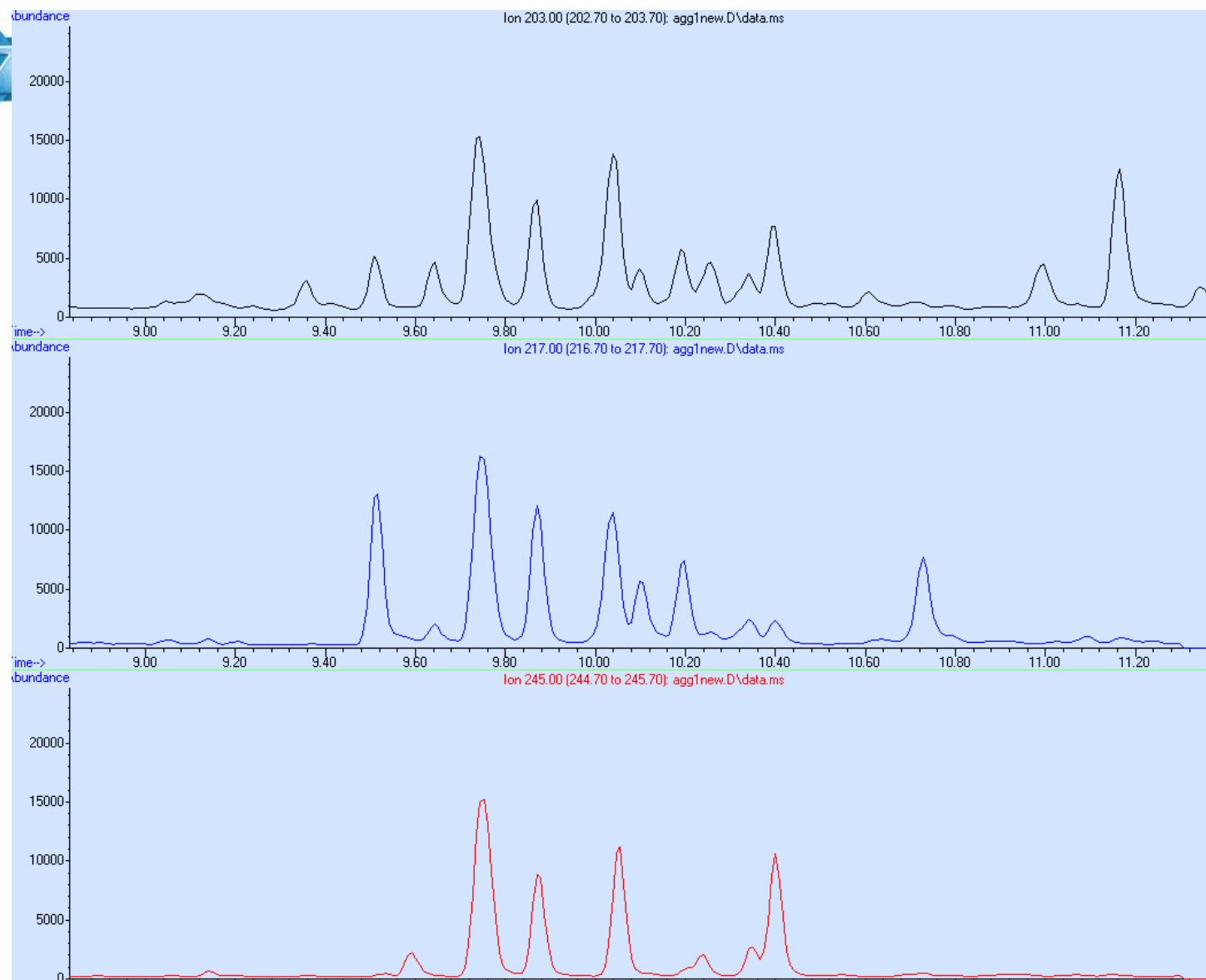
- > Anidride trifluoro acetica

prima della reazione di derivatizzazione si aggiunge il NNF  
come standard siringa e recupero



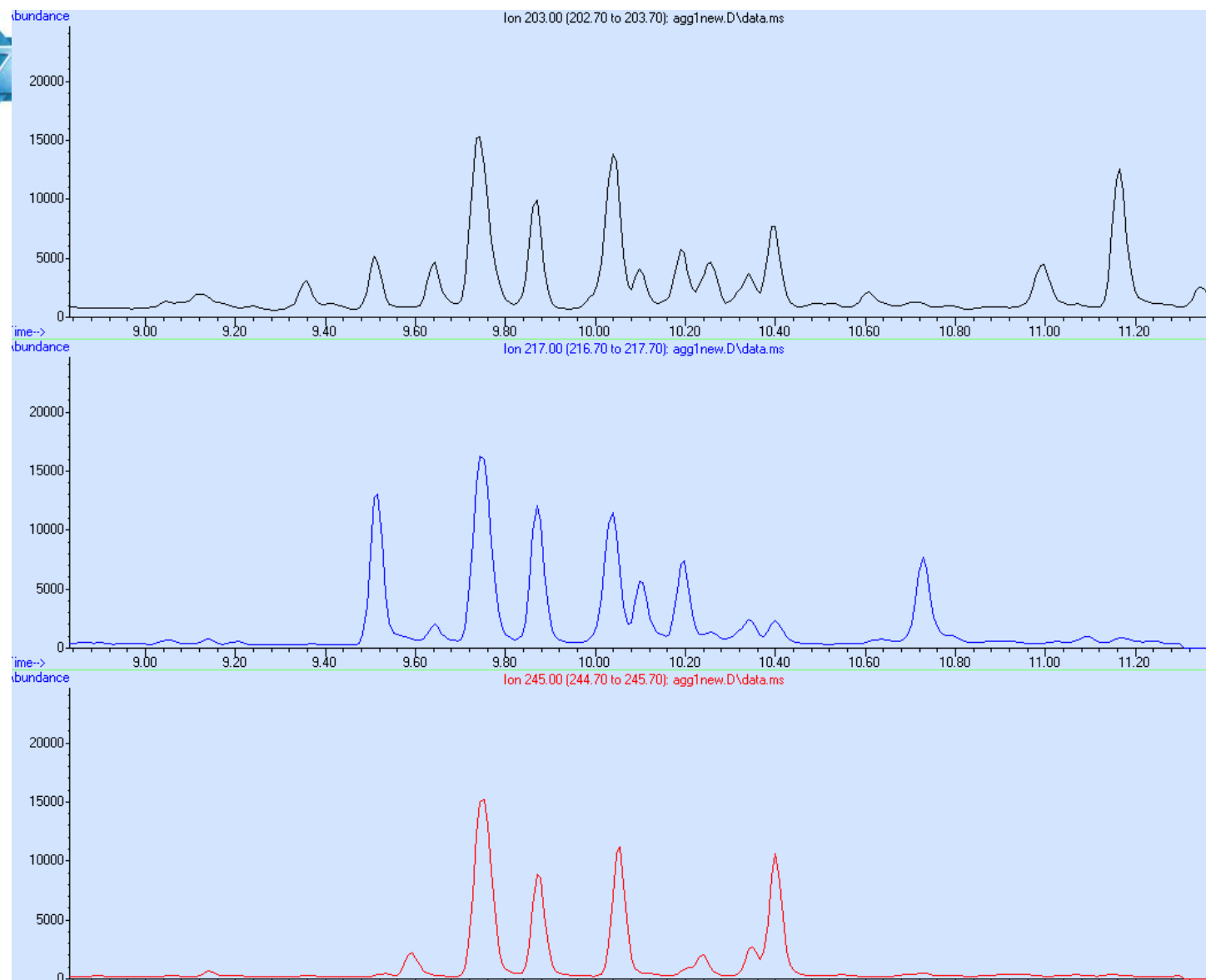
Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI

CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”



Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI  
CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”





Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI  
CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”

## Ricerca SIN

	NF LATTE	NF MITILI	NF PESCI	NF UOVA	PCP VEGETALI	PCP LATTE	PCP UOVA
media	36,6	126,0	74,3	84,4	0,0020	/	/
mediana	10,0	99,5	66,0	45,0	0,0005	/	/
minimo	0,4	0,9	0,8	45,0	0,0005	/	/
massimo	380,0	293,0	160,0	140,0	0,035	/	/
% presenza	35%	89%	79%	20%	0%	/	/
presenza	70	16	23	7	0	0	0
< LOQ	129	2	6	28	28	249	15
totale	199	18	29	35	28	249	15



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

Grazie per l'attenzione



Dario Lucchetti - D.O.Chimica – 6 Maggio 2015 “DALLA STALLA ALLA TAVOLA: LA RICERCA DI LABORATORIO DEI  
CONTAMINANTI IPA, METALLI E NF”