

“Sviluppo, validazione ed accreditamento di un metodo spettrofotometrico per il controllo del pesce e delle carni nell’ambito del trattamento illecito con monossido di carbonio”

Dr. Mila Nocentini

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana,
Laboratorio chimico- Sezione di Firenze*

Roma, 29 Novembre 2012



RICERCHE

Ricerca corrente anno 2004:

“Sviluppo di metodi analitici per rilevare trattamento con monossido di carbonio nei prodotti della pesca e valutazione dello stato di conservazione”
IZSLT 16/o4RC

Ricerca corrente anno 2006:

“Validazione di un metodo spettrofotometrico per la determinazione quantitativa del monossido di carbonio nei prodotti della pesca”
IZSLT o8/o6RC

Finanziamento complessivo \approx 60.000 euro



PUBBLICAZIONI

- Smulevich, G., Droghetti, E., Focardi, C., Coletta, M., Ciaccio, C. & **Nocentini, M.** (2007). A rapid spectroscopic method to detect the fraudulent treatment of tuna fish with carbon monoxide. *Food Chemistry*, 101, 1071-1077.
- Droghetti, E., Bartolucci, G. L., Focardi, C., Bambagiotti-Alberti, **M.**, **Nocentini, M.** & Smulevich, G. (2011). Development and validation of a quantitative spectrophotometric method to detect the amount of carbon monoxide in treated tuna fish. *Food Chemistry*, 128, 1143-1151
- Bartolucci, G., Droghetti, E., Focardi, C., Bambagiotti-Alberti, M., **Nocentini, M.** & Smulevich, G. (2010). High throughput headspace GC-MS quantitative method to measure the amount of carbon monoxide treated tuna fish. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 1041-1045.
- Enrica Droghetti,¹ Claudia Focardi, **Mila Nocentini** & Giulietta Smulevich.
A spectrophotometric method for the detection of carboxymyoglobin in beef drip.
International Journal of Food Science and Technology 2012 doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03205.x



MONOSSIDO DI CARBONIO

Il colore rosso vivo nelle carni rappresenta un indice importante per il consumatore ed è correlato alla freschezza del prodotto.

Tale colorazione è data dalla presenza dell'ossigeno nel muscolo che è legato alla forma ferrosa della mioglobina (Ossimioglobina: Mb-O₂).

Con il passare del tempo la carne però tende ad assumere un colore rosso bruno dovuto alla trasformazione della ossimioglobina in metamioglobina in cui l'atomo di ferro passa da Fe⁺² (forma ferrosa) ad Fe⁺³ (forma ferrica).

Negli ultimi anni trattamenti con monossido di carbonio in atmosfera modificata sono stati sviluppati per stabilizzare la forma ferrosa della mioglobina senza alterare le caratteristiche della carne stessa.



MAP: Modified Atmosphere Packaging

Processo industriale che permette di sostituire l'aria all'interno di una confezione con una miscela di gas.

Uno dei gas usati nella tecnologia MAP è il monossido di carbonio (CO).

L'impacchettamento in atmosfera modificata di monossido di carbonio non solo inibisce la crescita dei batteri aerobici, ma conferisce anche alla carne un tipico color rosso ciliegia dovuto alla formazione del complesso Mb-CO.

Questo è molto più resistente all'ossidazione rispetto al complesso Mb-O₂ e pertanto non è trasformato nella forma ferrica (Fe³⁺).

Belcher, J. N. (2006). Industrial packaging developments for the global meat market. *Meat Sci.*, 74(1), 143-148.

Smulevich, G., Droghetti, E., Focardi, C., Coletta, M., Ciaccio, C. & Nocentini, M. (2007). A. [Food Chem.](#), 101(3), 1071-1077.



MONOSSIDO DI CARBONIO

Il trattamento con CO quindi comporta importanti vantaggi commerciali quali la stabilità del colore ed il protrarsi apparente della freschezza del prodotto

Comunque il consumo di prodotti trattati in atmosfera modificata di CO non è da considerarsi tossico per l'uomo.

Tuttavia questo rappresenta un rischio per la salute pubblica in quanto il prodotto mantiene il colore inalterato rosso vivo anche a fronte di profonde alterazioni enzimatiche.

In particolare per i pesci ricchi di istidina (ad es. tonno, sgombero, sardine) il trattamento con CO non previene il rischio di formazione di istamina.

Shalaby A., (1997) Significance of biogenic amine to food safety and human health. *Food Research Int.* 29(7) 675-690

Silla Santos M., (1996). Biogenic amine: their importance in foods. *Int. J. Food Microb.* 29, 213-231



MONOSSIDO DI CARBONIO

Il trattamento dei prodotti carnei
ed ittici con monossido di
carbonio NON è ammesso dalla
Comunità Europea ed infatti
questo non è incluso nella lista
degli additivi ammessi (Direttiva
95/2/EC).

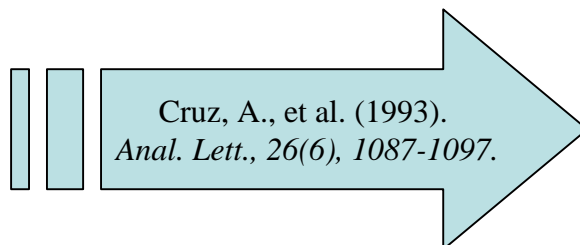


METODI DI ANALISI

*Metodo
Spettrofotometrico*



*Applicato al sangue.
Rapido, semplice
economico*

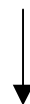


Applicato in Tossicologia
Forense sul Sangue.

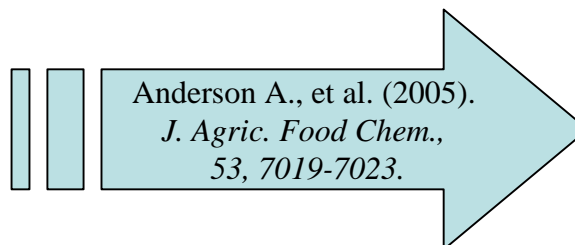


Si analizza la variazione delle
bande caratteristiche
dell'emoglobina quando legata
al CO rispetto a quando è
libera.

*Metodo
Gascromatografico*



*Applicato ai prodotti ittici. Richiede
più tempo e personale qualificato.
Inoltre ha costi più alti*



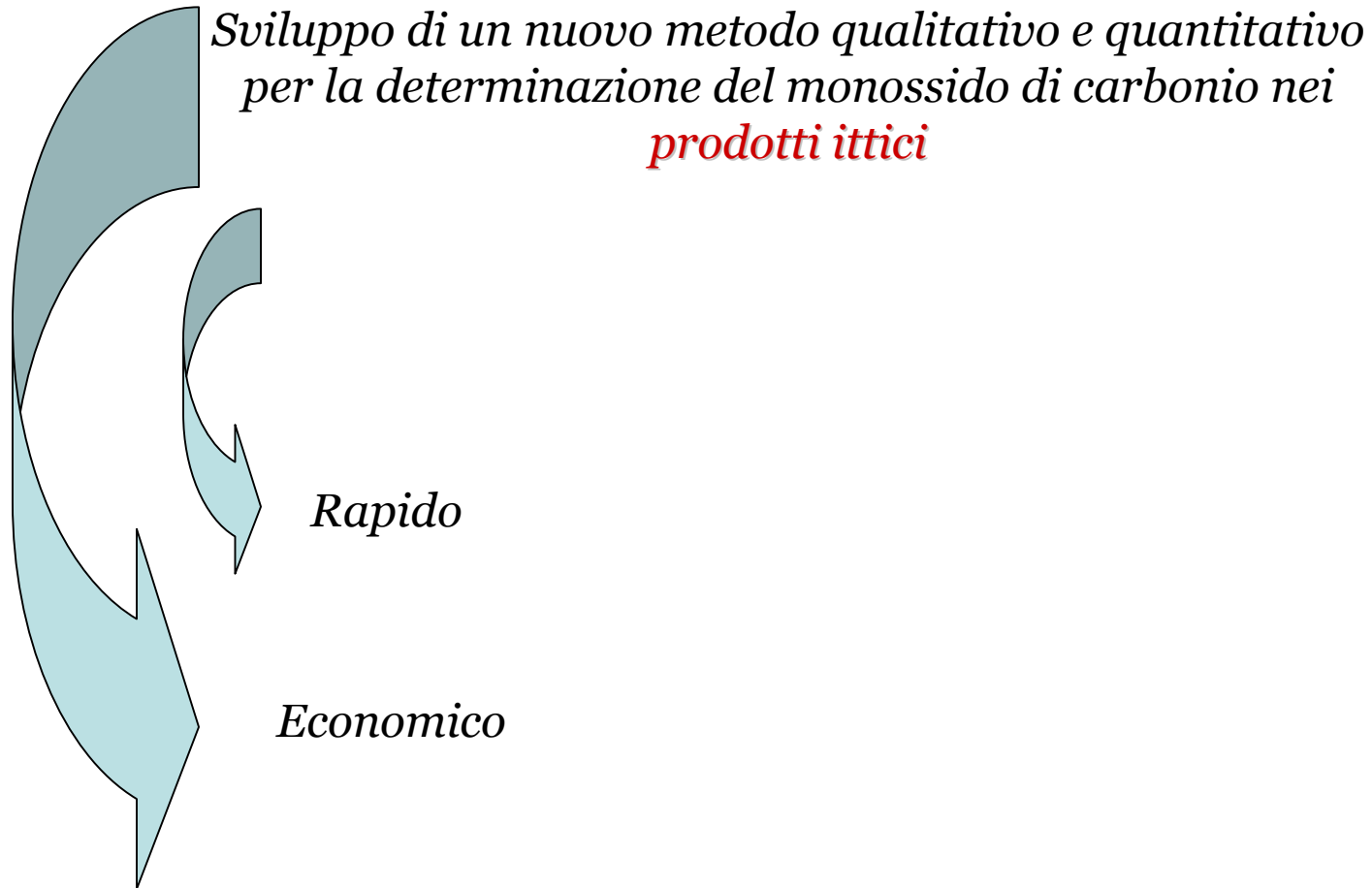
Applicato ai prodotti ittici.



Si distrugge la parte organica
con acido solforico e si
analizza il CO liberato in
GC- MS



OBIETTIVO DELLE RICERCHE



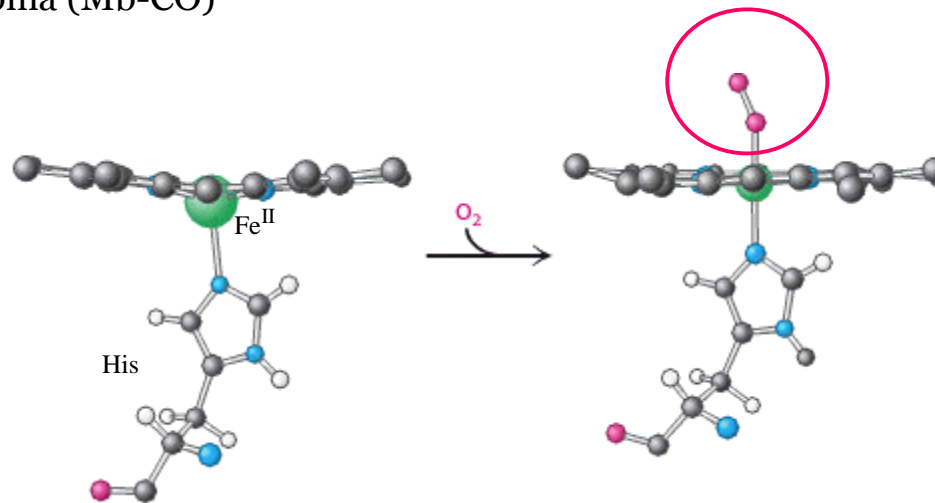
PRINCIPIO del METODO

L'atomo di FeII dell'eme della mioglobina forma 6 legami : 4 con la protoporfirina IX, 1 con l'istidina della globina ed 1 con:

H₂O (o libera) → deoxy mioglobina (deoxy-Mb)

O₂ → oxy mioglobina (Mb-O₂)

CO → Carbossi mioglobina (Mb-CO)



Geometria di coordinazione del ferro del gruppo EME con l'ossigeno
(cit. "Biochemistry fifth ed." <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>).

A seconda del legame della mioglobina si hanno spostamenti nelle principali bande degli spettri UV Vis



METODO di ANALISI

Step 0

Dal campione di pesce o carne, conservato congelato e mantenuto al riparo dalla luce, viene prelevato materiale percolato contenente mioglobina, oppure tessuto muscolare che viene omogeneizzato all'ultraturrax



Step 1

Diluizione in tampone fosfato 0.1 M pH 7.0±0.2



Step 2

Analisi UV-Vis.
Acquisizione dello spettro tra 350 e 700 nm con una velocità di scansione di 40 nm/sec.



METODO di ANALISI

Step 3

Riduzione con ditionito di sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
10 μl di una soluzione 20 mg/ml di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ previamente mantenuto in atmosfera degasata con N_2 sono aggiunti direttamente nella cuvetta usando una siringa gastight.

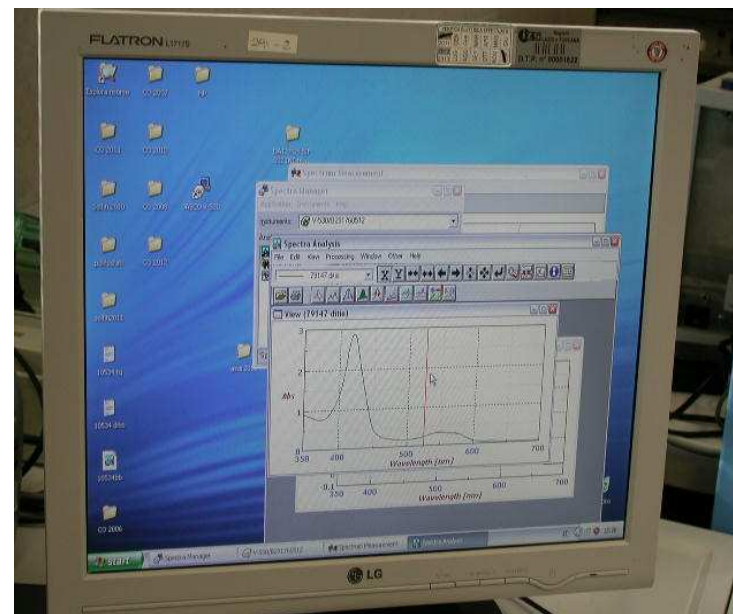
Azoto



Rappresentazione
schematica del
degasaggio

Step 4

Analisi UV-Vis.
Acquisizione dello spettro tra 350 e 700 nm con
una velocità di scansione di 40 nm/sec.

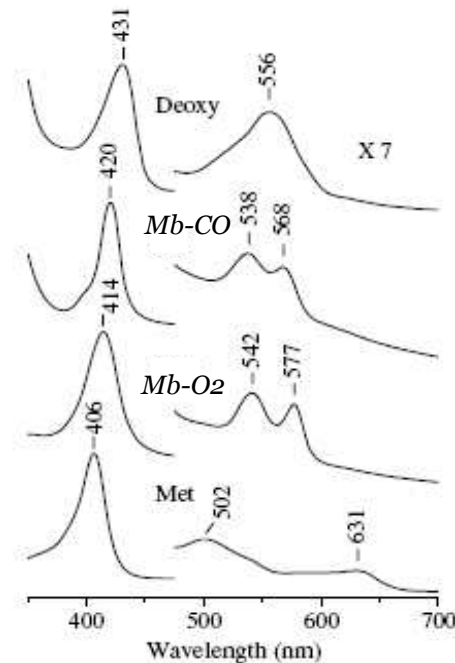


ANALISI QUALITATIVA

Interpretazione degli spettri UV Vis

Massimi di assorbimento (nm) delle bande Soret e delle bande Q0 e Qv osservati nelle emoproteine

Met	Fe ^{III}
Deoxy	Fe ^{II}
Mb-O ₂	Fe ^{II} - O ₂
Mb-CO	Fe ^{II} - CO



Spettri di assorbimento UV-Vis delle varie forme di mioglobina (Smulevich, G., et al *Food Chem* 101 (2007) 1071-1077)

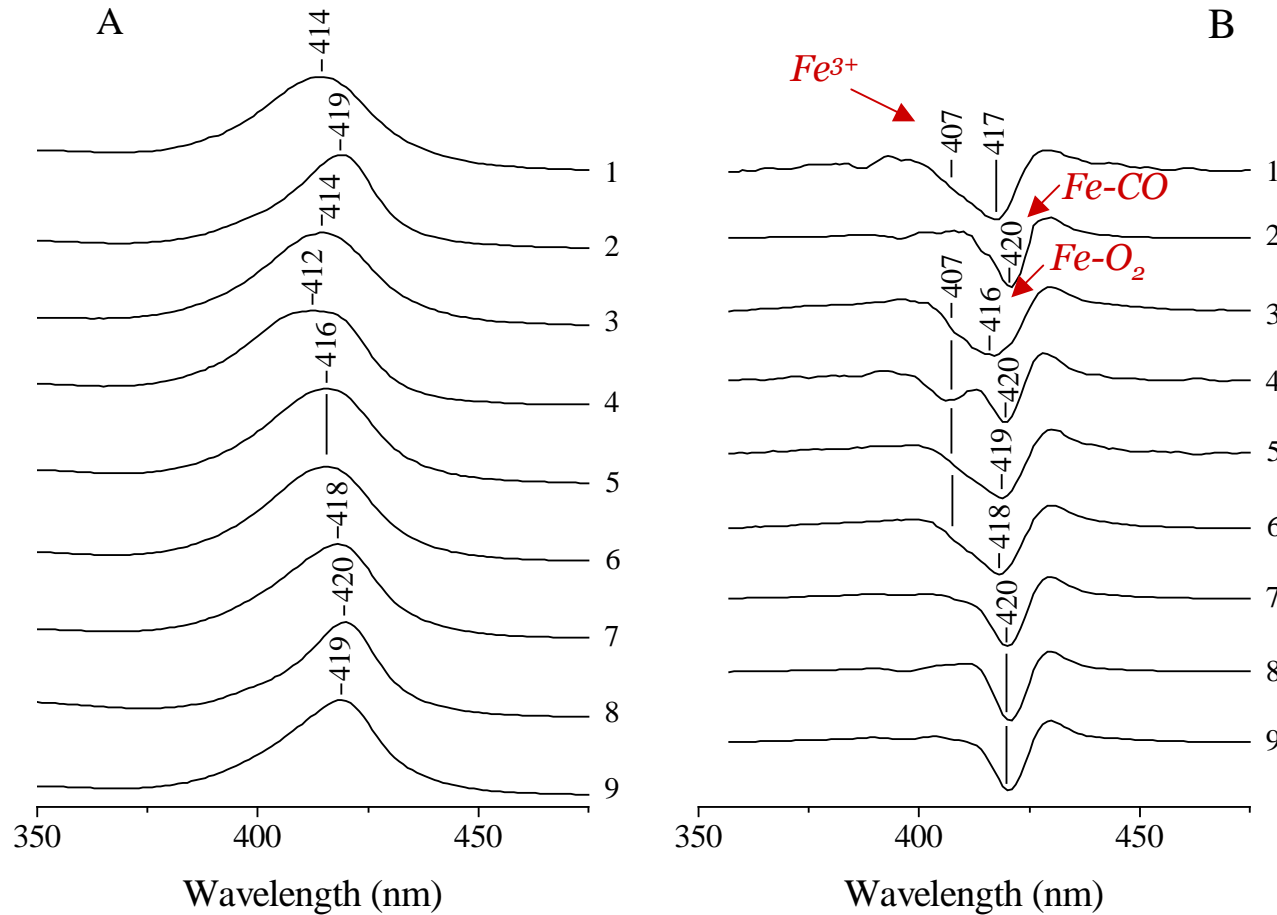
Si confrontano i massimi di assorbimento del campione con quelli riportati in figura.



ANALISI QUALITATIVA

Interpretazione degli spettri UV Vis

Spettri ottenuti allo Step 2



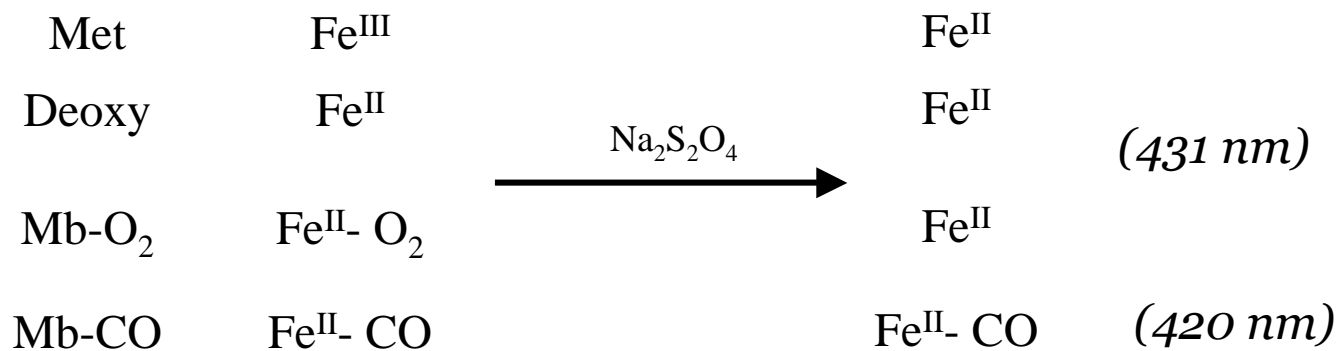
- A. Spettri di assorbimento di 9 campioni di tonno decongelato diluiti in tampone fosfato
- B. Derivata seconda degli spettri A.



ANALISI QUALITATIVA

Interpretazione degli spettri UV Vis

STEP 3: aggiunta del ditionito



$$y_B = A(420)/A(431)$$

\nearrow
 >0.89 presenza di CO

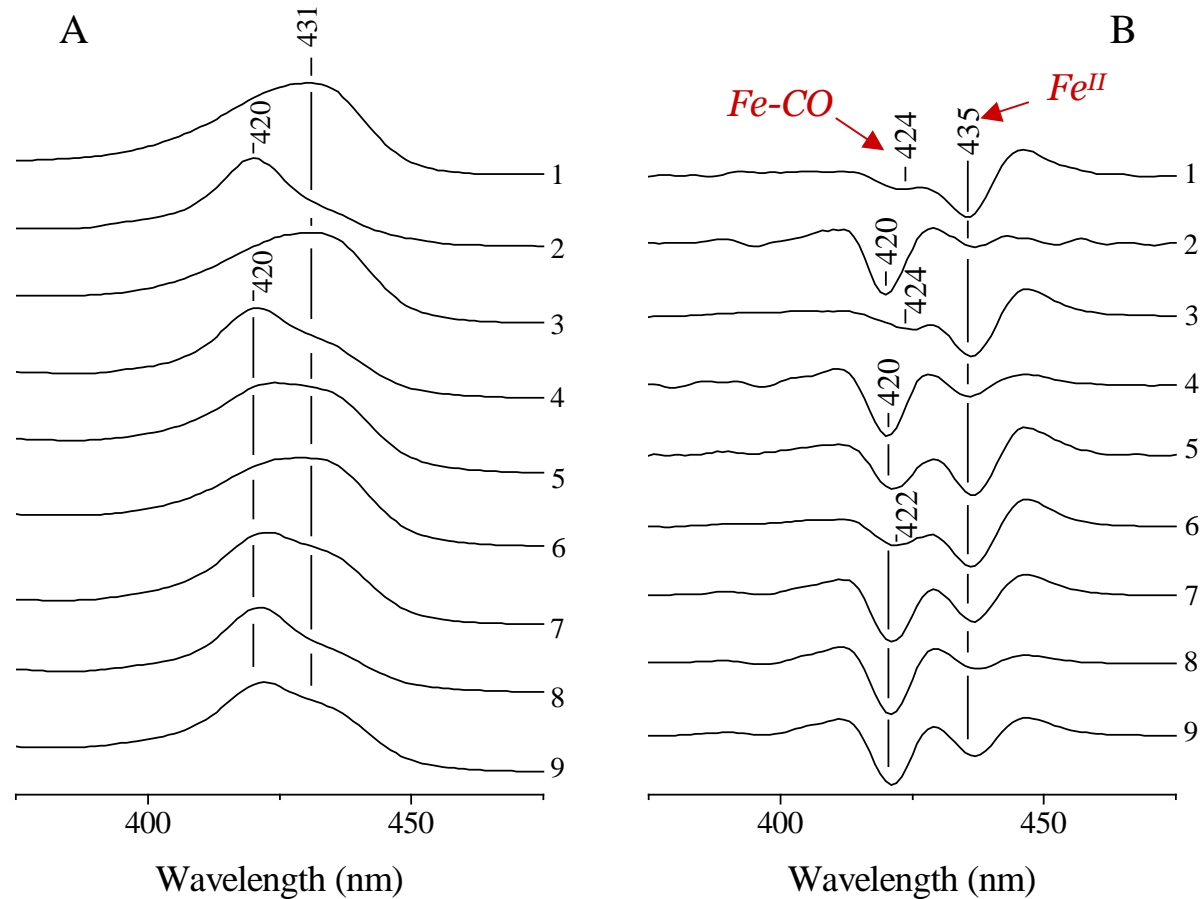
\searrow
 <0.89 assenza di CO



ANALISI QUALITATIVA

Interpretazione degli spettri UV Vis

Spettri ottenuti allo Step 4



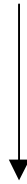
- A. Spettri di assorbimento dei 9 campioni di tonno scongelato diluiti in tampone fosfato dopo aggiunta di ditionito
- B. Derivata seconda degli spettri A.



ANALISI QUANTITATIVA

Rette correlate alle curve di titolazione

Prodotti ittici



$$C_{CO}(\mu M) = C_{Mb} \times (0.890 \chi_{CO} + 0.019)$$

$$C_{Mb} = A(427) / \epsilon(427^*)$$

$$\epsilon(427) = 119$$

$$\chi_{CO} = \left[\frac{0.78 \times A(420) - 0.67 \times A(431)}{0.32 \times A(420) + 0.55 \times A(431)} \right]$$

Prodotti carnei



$$C_{CO}(\mu M) = C_{Mb} \times (0.953 \chi_{CO} + 0.025)$$

$$C_{Mb} = A(429) / \epsilon(429^*)$$

$$\epsilon(429) = 123$$

$$\chi_{CO} = \left[\frac{1.04 \times A(423) - 0.80 \times A(435)}{0.60 \times A(423) + 0.78 \times A(435)} \right]$$

$$C_{CO}(\mu g/kg) = C_{CO}(\mu M) \times 28 \times D$$

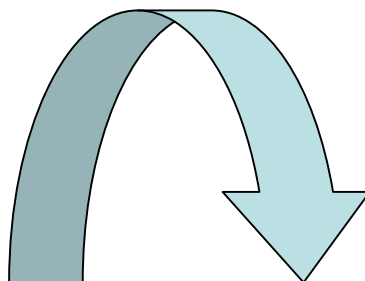
**valori al punto isosbestico*



ANALISI QUANTITATIVA

$$C_{CO}(\mu M) = C_{Mb} \times (0.890 \chi_{CO} + 0.019)$$

NR	A(420)	A(431)	A(427)	χ_{CO} (dall'articolo)	C_{Mb} (μM) (dalla epsilon)	C_{CO} (μM) (dalla curva)	D	C_{CO} (ng/g)	U (ng/g)



NR	A(420)	A(431)	A(427)	χ_{CO} (dall'articolo)	C_{Mb} (μM) (dalla epsilon)	C_{CO} (μM) (dalla curva)	D	C_{CO} (ng/g)	U (ng/g)
	0,56	0,33	0,43	0,62	3,58	2,03	10,00	567,0	170,1



DATI DI VALIDAZIONE

		<i>Prodotti ittici</i>	<i>Prodotti carnei</i>
LOD (μgKg)	Dai bianchi campione	0.7	4
LOQ (μgKg)		30	30
R _{medio} (%)	6 livelli di fortificazione.	98.1	103.5
RSD _{medio} (%)	10 repliche per ciascun livello	2.0	4.1
Incertezza di misura estesa (U (%))	Calcolata al punto equivalente della titolazione	30	34



Confronto fra i due metodi

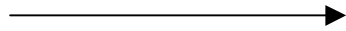
Gas Cromatografico e spettrofotometrico

	GC MS	UV-VIS
Selettività	Determina il CO che si libera dopo trattamento con H_2SO_4	Determina il CO legato al gruppo eme
Curva di calibrazione	Necessaria, da farsi utilizzando bombole di CO	Non necessaria
Tempo di esecuzione prova	Circa 2 giorni	Poche ore
Costo	>>50 euro	< 50 euro
	QUALITATIVO QUANTITATIVO	QUALITATIVO QUANTITATIVO



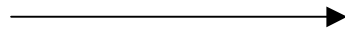
ACCREDITAMENTO

DAL 2007



*Prova accreditata come
metodo qualitativo*

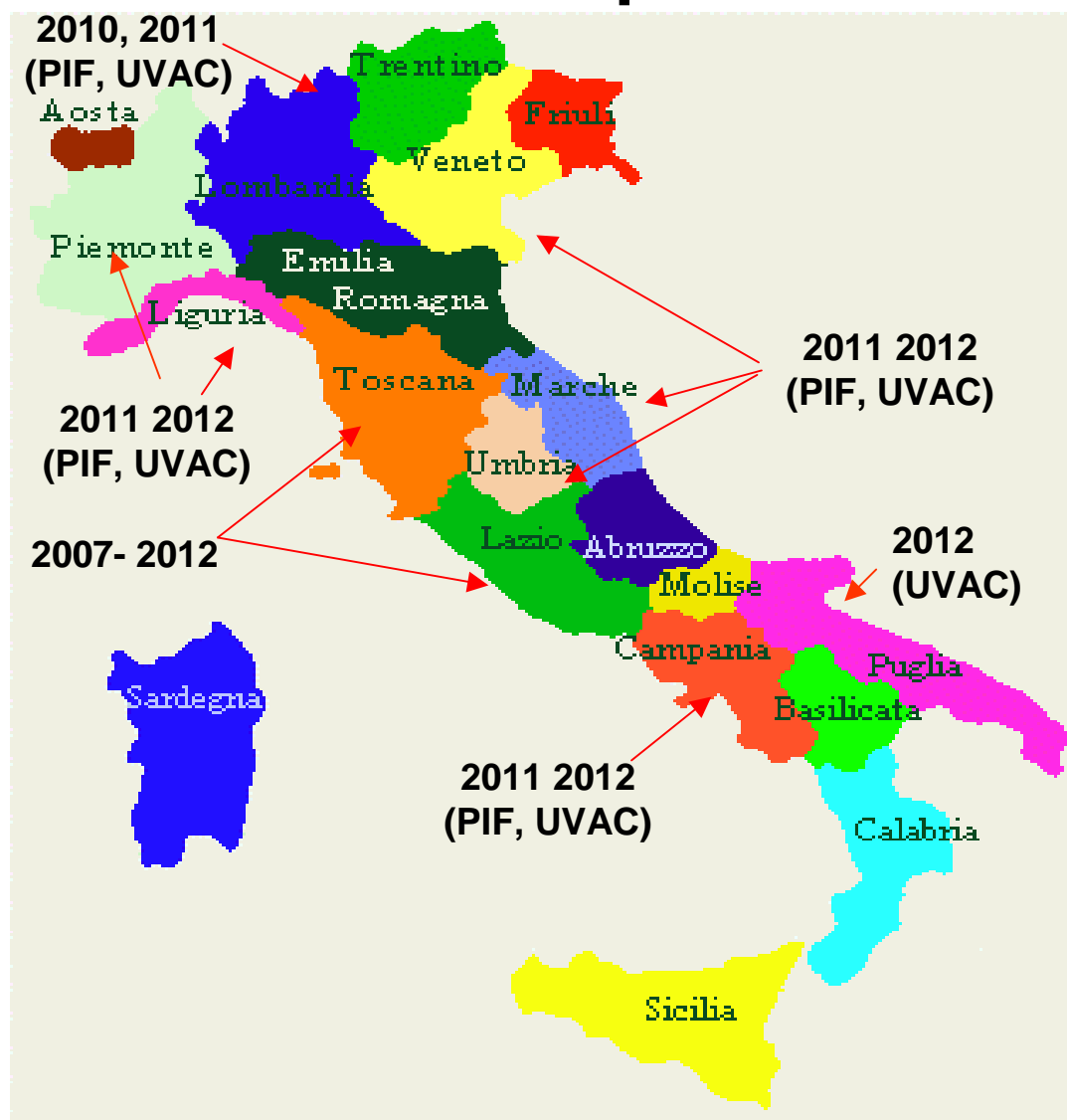
DAL 2011



*Prova accreditata come
metodo quantitativo*



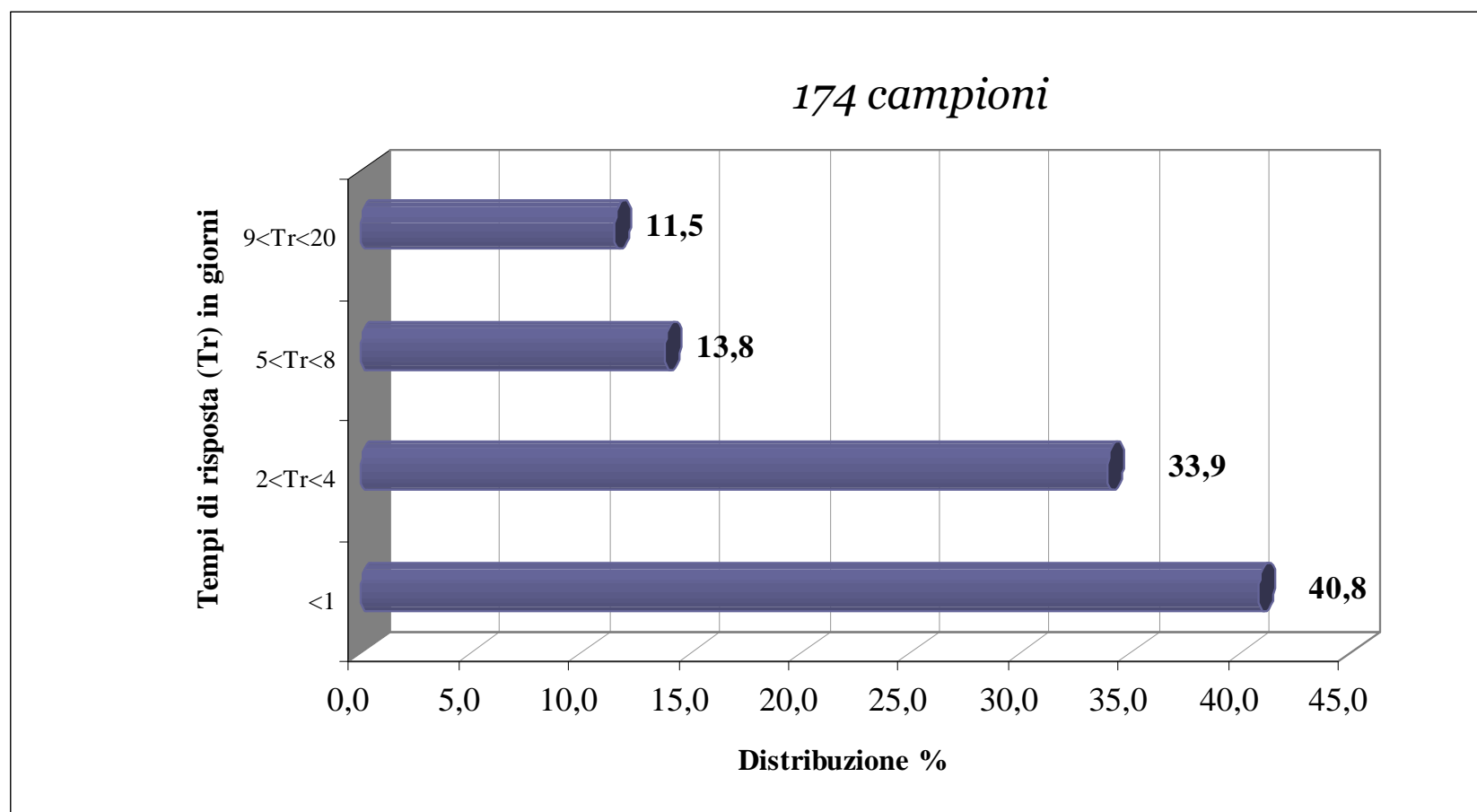
Campioni 2007- 2012



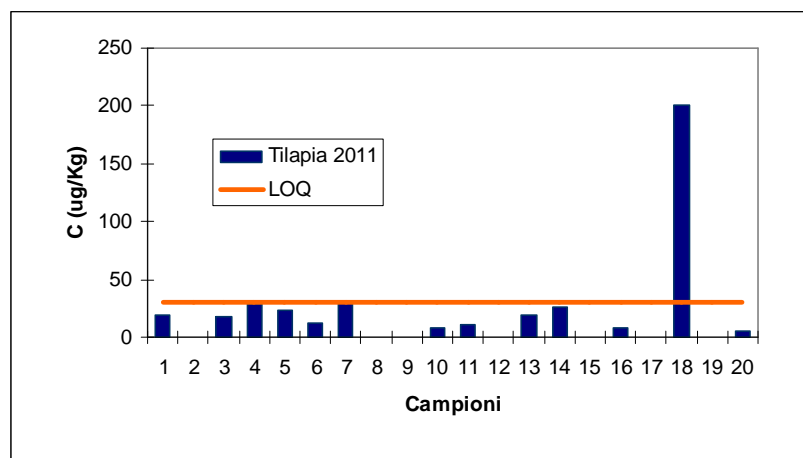
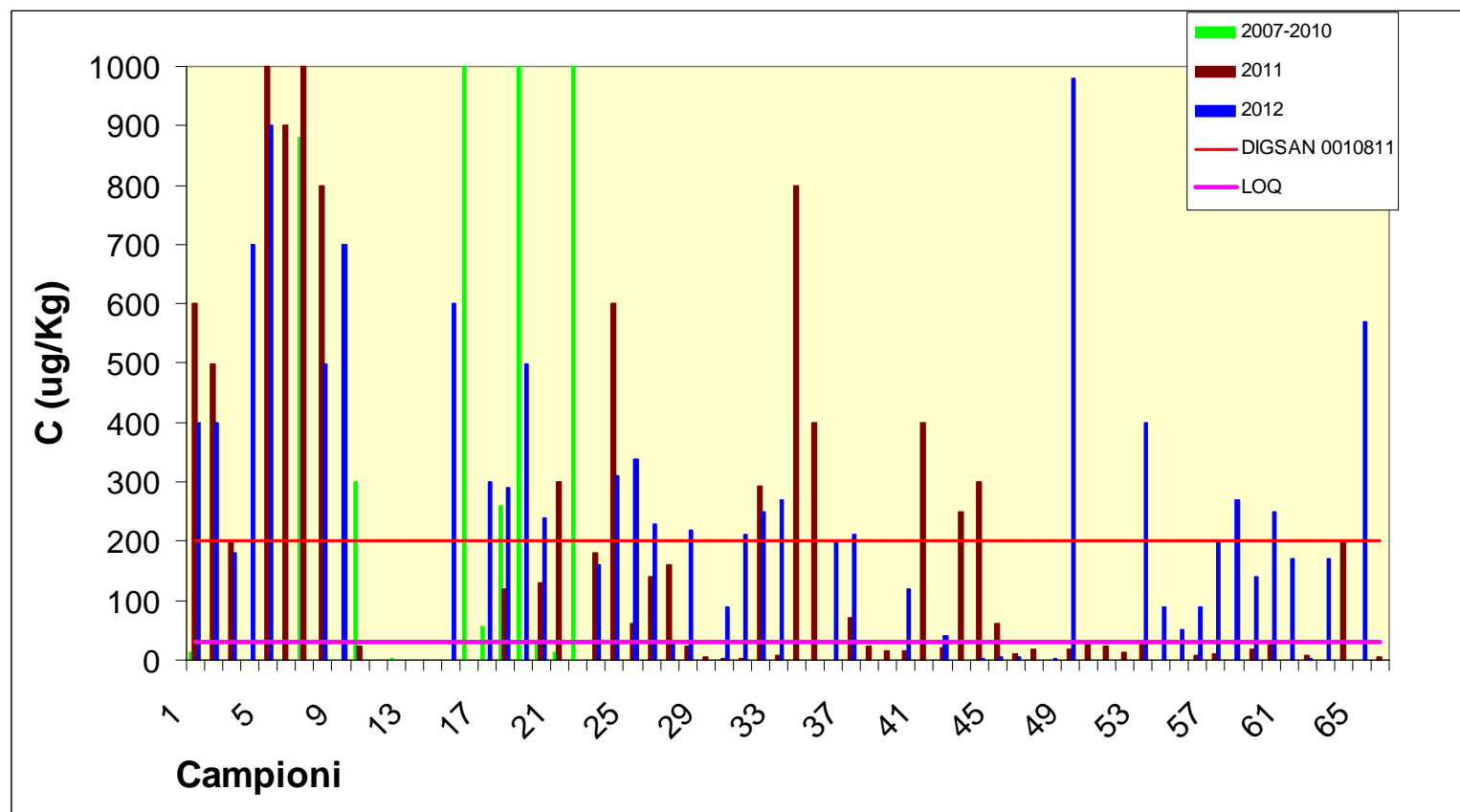
		PIF	UVAC	campioni ufficiali	
2007	11		5	6	
2008	3		1	2	
2009	16	1	6	9	
2010	10	1	2	7	
2011	68	34	10	24	
2012	66	12	29	25	
totale	174	48	53	73	



Campioni 2007 2012 tempi di risposta (data preaccettazione- emissione referto)



Risultati
ottenuti
dal
2007-
2012
su prodotti
ittici



*MINISTERO Della SALUTE
DGISAN*

0010811-P-30/03/2012:

*“tra 50 e 200 ppb il prodotto è sospetto;
Oltre 200 il prodotto è non conforme”*

