

S. MORET, G. PURCARO,
L.S. CONTE

Valutazione della presenza di inquinanti, dello stato di ossidazione e caratterizzazione della frazione volatile nei prodotti della filiera della carne suina

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 2, 69-80, 2008

TITLE

Evaluation of contaminants, oxidation status and characterisation of volatile fraction in transformed swine meat chain

KEY WORDS

Swine meat chain, contaminants, PAHs, oxidation status, hexanal, volatiles, HPLC, SPME, GC

PAROLE CHIAVE

Filiera carne suina, contaminanti, IPA, stato di ossidazione, esanale, sostanze volatili, HPLC, SPME, GC

Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Udine

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof. Sabrina Moret
Dipartimento di Scienze degli Alimenti
Università di Udine
Via Marangoni 97
33100 - Udine

Summary

Nowadays the quality of food is a multifactorial concept, which include safety, nutritional and edonistic aspect. Concerning the safety problems, it is important to assess the presence of undesirable compounds, which can affect negatively the normal organism physiology. The sources of these substances can be exogenous (environmental pollution) or endogenous (related to degradation of some components). The aim of this paper was to investigate on PAH contamination of 4 different types of feeds (and corresponding ingredients) and possible transfer of PAH contamination to the meat of 4 groups of pigs (of 8 pigs each) fed with the 4 different formulations. Among feed ingredients, the most contaminated resulted to be tender wheat bran and soybean (BaP mean amounts of 0,248 and 0,153, respectively), while barley and corn showed the lowest contamination levels. All the meat samples showed similar and very low contamination levels, to confirm the fact that PAHs ingested with feeds are rapidly metabolised. The volatile fraction was assessed on feed, raw material and meat. Particular attention was paid for marker of secondary oxidation, like hexanal. The results obtained showed a low amount of hexanal, between not detectable (<0.2 µg/kg) and 20 µg/kg. Among the raw material, soybean presented the lowest amount (from <0.5 to 0.6 µg/kg), instead the quantity in barley was variable. The feeds showed high amount of hexanal: control fodder had 134 ± 69 µg/kg of hexanal, fodder + oil + vitamin E had 146 ± 72 µg/kg, fodder + sunflower oil had 182±32 µg/kg, fodder + vitamin E had 161 ± 67 µg/kg. The meat samples presented hexanal, eptanale, octanale, nonanale, butanoic acid and hexanoic acid, but in lower amount than feed.

Riassunto

La definizione della qualità di un alimento è oggi un concetto multifattoriale che riunisce aspetti di sicurezza, valori nutrizionali ed edonistici. Dal punto di vista della salubrità, è importante valutare la presenza di sostanze indesiderabili in quanto capaci di interagire negativamente con la normale funzionalità biologica dell'organismo consumatore. Le sostanze "indesiderabili" possono derivare da fonti esogene (inquinanti ambientali) o endogene (legate alla degradazione di alcuni componenti). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare i livelli di contaminazione con IPA di 4 dif-

ferenti tipologie di mangimi (e relativi ingredienti) e studiare il possibile trasferimento della contaminazione con IPA nella carne di 4 gruppi di maiali (di 8 maiali ciascuno), alimentati con le 4 diverse tipologie di mangime. I mangimi analizzati hanno presentato livelli di contaminazione con benzo[a]pirene (BaP) compresi tra 0,037-0,107 ppb. Le materie prime più contaminate sono risultate essere la crusca di grano tenero e la soia (con livelli massimi di BaP rispettivamente di 0,248 e 0,0,153 ppb), mentre orzo e mais sono risultati meno contaminati. In tutti i campioni di carne sono stati ritrovati livelli paragonabili e comunque molto bassi di IPA, a conferma del fatto che gli IPA ingeriti con i mangimi vengono rapidamente metabolizzati. La frazione volatile è stata valutata sia sui mangimi e materie prime che sulla carne, con particolare attenzione alla presenza di marker di ossidazione lipidica secondaria, quali l'esnale. I risultati ottenuti hanno evidenziato contenuti di esnale molto bassi, compresi tra non dosabile ($< 0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$) e $20,0 \mu\text{g}/\text{kg}$. I campioni di soia sono risultati quelli con minore contenuto (da $< 0,5$ a $0,6 \mu\text{g}/\text{kg}$), mentre la granella di orzo ha evidenziato una situazione molto variabile. A differenza delle materie prime, i mangimi presentano contenuti di esnale rilevanti (tutti espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$): mangime di controllo 134 ± 69 , mangime + olio + vitamina E 146 ± 72 , mangime + olio di girasole 182 ± 32 , mangime + vitamina E 161 ± 67 . I campioni di carne hanno evidenziato la presenza di esnale, etanolo, ottanale, nonanale, acido esanoico e butanoico, ma sempre a livelli inferiori a quanto rilevato nei mangimi

Introduzione

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono inquinanti ambientali generati da processi di combustione incompleta di sostanza organica. Vengono distinti in leggeri e pesanti a seconda del numero di anelli benzenici presenti nella molecola. Gli IPA pesanti tra cui ricordiamo il benzo[a]pirene (BaP) sono sicuramente più pericolosi dal punto di vista tossicologico in quanto cancerogeni. Nell'atmosfera vengono ri-

versati grandi quantità di IPA in seguito ad attività vulcaniche e incendi di foreste; a questa fonte naturale, negli ultimi decenni, si sono aggiunte anche altre fonti quali processi di combustione per la produzione di energia, incenerimento di rifiuti, attività industriali, emissioni di autoveicoli. Attraverso il "fall-out" atmosferico gli IPA presenti nell'atmosfera possono contaminare le colture. Cereali e altri vegetali utilizzati per la formulazione dei mangimi vengono contaminati

attraverso la deposizione di particolato atmosferico e, in misura maggiore, attraverso processi di essiccaamento che prevedono il contatto diretto con i fumi di combustione. I grassi utilizzati nei mangimi possono essere contaminati con livelli di IPA elevati data la natura lipofila di questi contaminanti (1-3).

Gli studi relativi al passaggio degli IPA lungo catena alimentare sono molto scarsi e, anche se la maggior parte di questi indicano che non vi è un evidente accumulo nei tessuti

adiposi degli animali in quanto gli IPA introdotti con la dieta vengono rapidamente metabolizzati, altri hanno evidenziato livelli di contaminazione superiori rispetto ai “livelli di fondo” nei tessuti e nel latte di animali allevati in zone fortemente inquinate (4).

I metodi tradizionali per la determinazione degli IPA prevedono spesso lunghi passaggi di preparazione del campione che nel caso ad esempio delle matrici a base proteica prevedono quasi sempre una saponificazione del campione che, secondo alcuni ricercatori, risulta necessaria per liberare gli IPA che si trovano legati covalentemente alle proteine. Segue una fase di purificazione che tradizionalmente viene effettuata su colonne impaccate di diverso materiale adsorbente o mediante GPC. Più recentemente l'impiego di queste colonne impaccate è stato sostituito dalla SPE.

Segue analisi HPLC abbinata a rivelazione spettrofluorimetrica o GC-MS. Accanto ai metodi tradizionali di estrazione del campione si stanno affermando recentemente metodi innovativi semi-automatizzati quali l'accelerated solvent extraction (ASE) e la microwave assisted extraction (MAE) che sfruttano le alte temperature e pressioni per migliorare l'efficienza di estrazione riducendo tempi e quantità di solvente utilizzate.

Lo scopo principale di questo lavoro è stato quello di valutare il livel-

lo di contaminazione con IPA nella filiera della carne suina e di verificare se gli IPA assunti dagli animali attraverso la dieta, possano in qualche misura accumularsi nel grasso intramuscolare andando a costituire una fonte di esposizione per l'uomo. A tal fine, dopo aver messo a punto delle procedure analitiche idonee basate sulla MAE, sono stati analizzati i livelli di contaminazione con IPA nei mangimi impiegati per l'alimentazione degli animali, nelle singole materie prime utilizzate per la formulazione degli stessi mangimi e nella carne cruda. Infine, si è voluto anche verificare i livelli di contaminazione apportati da diversi trattamenti termici (cottura in padella e alla griglia).

Mentre gli IPA sono prodotti indesiderabili di derivazione esogena, i sistemi naturali insaturi, e quindi anche le carni, possono presentare sostanze indesiderabili che derivano da irrancidimento lipidico. L'aumentata coscienza dei consumatori indirizza verso la ricerca di prodotti carnei la cui qualità oltre che nutrizionale riguardi anche l'aspetto sensoriale. Molti studi (5-12) hanno messo in evidenza una correlazione tra la presenza di prodotti secondari di ossidazione e la dieta dell'animale. A fronte di ricerche (13) focalizzate sulla valutazione e prevenzione della degradazione ossidativa delle carni, si registra ancora una certa carenza nello sviluppo

di metodi rapidi ed economici per determinarla e ancora oggi viene ampiamente applicato il test dell'acido tiobarbiturico, che risulta oneroso in termini di tempo e con una serie di limitazioni.

La misura dei prodotti secondari di ossidazione, in particolare esanale, è stata applicata con successo per la valutazione della ossidazione lipidica nel caso della carne cotta mediante campionamento dello spazio di testa statico (14-16) e dinamico (17). Altri autori hanno documentato l'utilità del monitoraggio dell'esanale anche in periodi brevi (1-6 giorni) nella carne cotta. Nelle applicazioni più recenti è stata usata la tecnica SPME (18, 19), che tuttavia non risulta ancora applicata sulla carne cruda.

Lo scopo del presente lavoro è stato pertanto di verificare l'applicabilità della tecnica SPME, finalizzata alla valutazione di prodotti secondari di ossidazione, sia a campioni di carne cruda, sia ai mangimi utilizzati nell'allevamento degli animali considerati.

Materiali e metodi

Campionamento

Per la formulazione dei mangimi somministrati agli animali della sperimentazione sono state impiegate le seguenti materie prime: mais in granella (GM), orzo in gra-

nella (GO) (entrambe di produzione aziendale), crusca di grano tenero (GT), farina di estrazione di soia (SS) (acquistate già macinate in sacchi) e olio di girasole ad alto contenuto di acido oleico (OG).

In tabella 1 sono indicate le composizioni percentuali della formulazione di controllo (mangime convenzionale senza aggiunta di grassi) e di quella addizionata di olio (mangime convenzionale addizionato del 3% di olio di girasole ad alto oleico). A loro volta queste 2 formulazioni sono state suddivise in 2: una tal quale e una addizionata di 250 ppm di vitamina E. I mangimi sperimentali sopra descritti sono stati utilizzati per alimentare 64 suini suddivisi in 4 gruppi (8 maschi castrati e 8 femmine intere ciascuna), sulla base della 4 diverse formulazioni con cui sono stati alimentati.

In tabella 2 è riportato il piano di campionamento relativo agli animali dai quali sono state ricavate le bracioline di carne utilizzate per le successive analisi degli IPA e della frazione volatile.

Le bracioline di carne di maiale sono state disossate e una quantità rappresentativa di ogni braciolina (200 g) è stata finemente omogeneizzata con un cutter. In seguito il campione è stato congelato a -20°C , liofilizzato e ridotto in polvere finissima con un macina-caffè.

Tabella 1 - Composizione percentuale dei mangimi utilizzati per la sperimentazione

	1° lotto da 50 a 90 kg		2° lotto da 90 a 120 kg		3° lotto da 120 a 160 kg	
	Controllo	Olio	Controllo	Olio	Controllo	Olio
Mais	55,00	53,00	55,00	53,00	55,00	53,00
Orzo	17,35	18,08	18,92	19,51	20,44	21,07
Crusca di grano tenero	10,00	6,00	10,00	6,00	10,00	6,00
Soia	14,50	16,50	13,00	15,00	11,50	13,50
Olio	0,00	3,00	0,00	3,00	0,00	3,00
Altro	3,15	3,42	3,08	3,49	3,06	3,43

Tabella 2 - Campioni di carne

Campione	Sesso	Tipo di mangime
C1-C4	Femmina	Controllo
C5-C8	Maschio	Controllo
CE1-CE4	Femmina	Controllo + vit E
CE5-CE8	Maschio	Controllo + vit E
CO1-COE4	Femmina	Controllo + olio girasole
CO5-COE8	Maschio	Controllo + olio girasole
COE1-COE4	Femmina	Cont. + olio g + vit E
COE5-COE8	Maschio	Cont. + olio g + vit.E

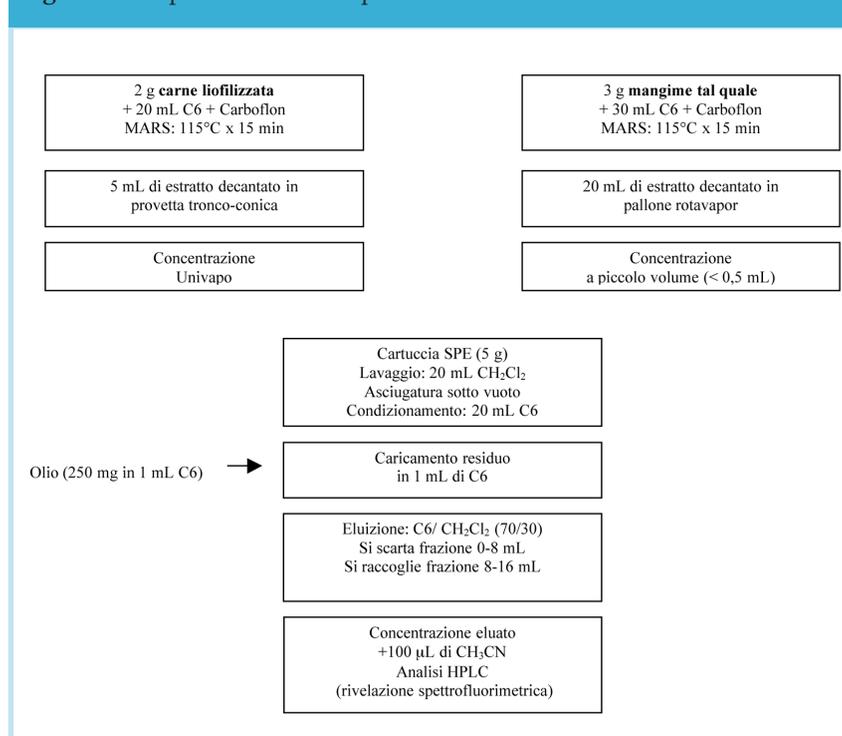
Analisi degli IPA

In figura 1 è riportata la procedura di estrazione ottimizzata che prevede di partire da 2 g di campione liofilizzato che vengono pesati direttamente nel vaso di estrazione e addizionati di 20 mL di esano in presenza di una barretta in Carboflon (assorbitore secondario di microonde) che permette di riscaldare il solvente apolare altrimenti trasparente alle microonde. I vasi di estrazione opportunamente sigillati vengono posti a 115°C per 15 min.

Per i campioni di mangime la procedura risulta analoga con la differenza che si parte dal campione tal quale (finemente macinato) e si preleva, dopo raffreddamento, una quantità maggiore di estratto esanico decantato al fine di migliorare la sensibilità di analisi senza superare la capacità della cartuccia silice.

L'estratto esanico così ottenuto contiene i trigliceridi. Al fine di eliminare questi interferenti si è impiegato un metodo già messo a punto per la determinazione degli IPA in oli vegetali che prevede un passaggio di purificazione SPE su

Figura 1 - Preparazione del campione



una cartuccia di silice (5 g) seguito da analisi HPLC su colonna C18 (Supelcosil LC-PAH, 250 x 3 mm d.i.) utilizzando un gradiente binario costituito da acetonitrile e acqua e rivelazione spettrofluorimetrica (20).

Analisi dei volatili

A causa della differente struttura della matrice esaminata, si è reso necessario sviluppare protocolli analitici dedicati per i mangimi e le materie prime e per la carne.

Per le materie prime ed i mangimi, si è proceduto macinando, quando necessario, il campione, immediatamente prima dell'analisi, mentre nel caso dei campioni di carne si sono realizzate alcune prove preliminari per valutare la possibilità di lavorare sul campione tal quale e al

fine di minimizzare la disomogeneità di distribuzione dei differenti componenti, i campioni sono stati finemente macinati come sopra descritto.

Un'aliquota di campione pari a $3,0 \pm 0,01$ g esattamente pesata è stata introdotta in un "vial" da 10 mL, chiuso con setto di teflon e ghiera. Il campione è stato condizionato a bagno maria per 30 minuti a 40°C, quindi nello spazio di testa è stata introdotta la fibra ed il campionamento è stato effettuato per altri 30 minuti, trascorsi i quali la fibra è stata desorbita nell'iniettore del gas cromatografia 280°C per 4 minuti.

L'iniezione è avvenuta con modalità splitless, con un ritardo di 4 minuti nell'apertura della valvola parzializzatrice; la colonna utilizzata era in silice fusa, 30 m x 0,32 mm i.d.,

0,20 µm di spessore di fase (Supelcowax 20 M); la temperatura del forno era programmata da 40°C a 280°C, con una isoterma iniziale di 4 minuti ed una successiva rampa di 5°C/min; la temperatura del rivelatore (FID) era di 280°C. Nel caso della GC-MS, le condizioni di iniezione e di corsa cromatografica erano identiche, la temperatura della transfer line era di 280°C e l'energia di ionizzazione di 70 eV.

Preparazione delle rette di calibrazione

La retta di taratura per la determinazione dell'esanale è stata realizzata aggiungendo ad un campione di mangime e di carne con livelli di esanale al di sotto dei limiti di rilevanza, quantità crescenti di soluzione di esanale in squalene.

Risultati e discussioni

Ottimizzazione della procedura di estrazione assistita con le microonde

La prima parte di questa ricerca ha riguardato la messa a punto di metodiche MAE rapide e semplici per la determinazione degli IPA nelle matrici di interesse. In particolare il sistema utilizzato è in grado di processare contemporaneamente fino a 14 campioni.

I campioni di carne sono stati preliminarmente liofilizzati in quanto in

presenza di elevate quantità di acqua viene infatti ostacolata la penetrazione del solvente apolare nella matrice e quindi viene ridotta l'efficienza di estrazione.

Per ottimizzare l'estrazione degli IPA dalla matrice carne sono state effettuate delle prove su un campione di Pitina, contaminato con apprezzabili livelli di IPA. Si tratta di un salume (originario delle valli a nord di Pordenone) di carne suina ed ovina, triturrata e condita con sale, spezie e altre erbe aromatiche; la carne viene pressata manualmente per formare una polpetta, passata nella farina di mais e affumicata tradizionalmente con fumo di legno di faggio.

I principali parametri ottimizzati per l'estrazione, sono: tipo di solvente, rapporto quantità campione/volume di solvente, temperatura di estrazione e tempo di estrazione. I risultati di questo confronto sono oggetto di un lavoro inviato per una

pubblicazione (21) e le condizioni ottimali di estrazione sono quelle riportate in materiali e metodi.

Rispetto all'estrazione con gli ultrasuoni (sonicazione), già utilizzata da alcuni autori per l'estrazione di IPA da carne affumicata liofilizzata (22), la MAE, come si vede nella figura 2, permette di migliorare l'efficienza di estrazione.

Utilizzando l'estrattore a microonde è possibile effettuare una saponificazione rapida in presenza di KOH metanolica satura e una contemporanea estrazione dell'insaponificabile con esano, con notevoli vantaggi in termini di tempo e consumo di solventi rispetto alla saponificazione condotta con metodi tradizionali (23). L'applicazione di questo approccio analitico ai mangimi oggetti di studio ha portato a risultati comparabili in termini di efficienza di estrazione a quelli ottenuti applicando la procedura MAE ottimizzata.

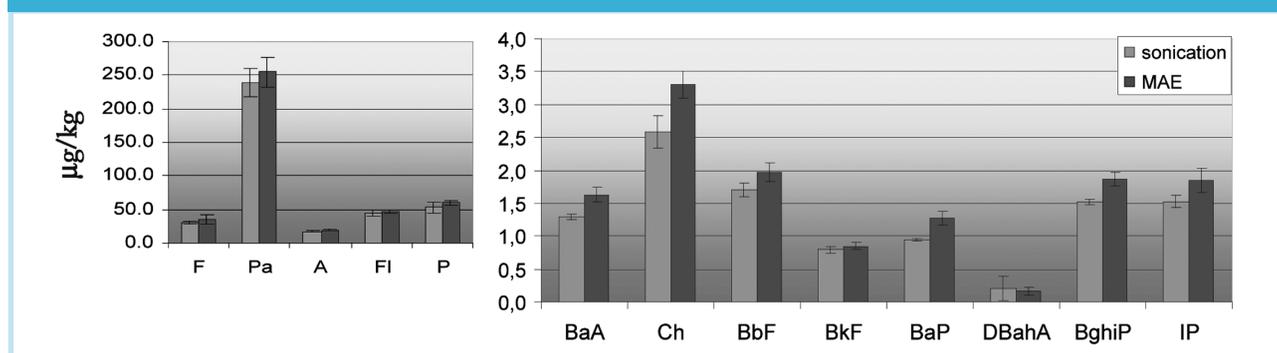
Calibrazione e quantità minima rilevabile

In tabella 3 sono riportati i dati di calibrazione, i coefficienti di correlazione (r^2) e i limiti di rilevanza (LOD) espressi come concentrazione di analita in grado di dare un segnale (picco) di altezza pari a 3 volte il segnale del rumore di fondo.

Ripetibilità e recupero

In tabella 4 vengono riportati i dati relativi alla ripetibilità testata su un campione di Pitina e su un mangime di controllo. Per il mangime si sono ottenuti CV% più elevati ma comunque soddisfacenti, tenuto conto dei bassi livelli di concentrazione presenti in questo campione. Anche i recuperi (calcolati su un campione fortificato) sono risultati buoni in entrambe le matrici e generalmente compresi tra l'80 e il

Figura 2 - Confronto fra estrazione con sonicatore e MAE. I dati sono la media di 4 repliche e le barre indicano i valori di deviazione standard



100% con coefficienti di variazione inferiori al 10%.

Assunzione di BaP attraverso la dieta

Sulla base dei dati relativi al consumo di mangime e al contenuto di BaP riscontrato nei mangimi, è stato possibile calcolare a posteriori i ng di BaP assunti giornalmente dai maiali per Kg di p.c. Poiché i maiali sono stati alimentati con i mangimi a partire da un peso di 50 kg, fino al raggiungimento dei 160 kg in media, si è considerato, per il calcolo, il peso medio raggiunto dai suini a metà del periodo di ingrasso (105 kg). Come riportato in tabella 5 si tratta di livelli di assunzione bassi se confrontati con quelli che secondo recenti stime (JEF-CA, 2005) vengono assunti mediamente dall'uomo attraverso la dieta (4 ng BaP/kg p.c./gg) e che rappresenterebbero un basso livello di preoccupazione per il rischio cancerogeno.

Contenuto di IPA nei campioni di mangime e materie prime

Come appare evidente dai dati riportati in tabella 6, i mangimi addizionati di olio sono risultati mediamente più contaminati rispetto a quelli non addizionati. In tabella 7 sono riportati i dati relativi al contenuto di IPA delle materie prime utilizzate per la formulazione dei mangimi.

Tabella 3 - Linearità e limite di rilevabilità (LOD)

	Intervallo di calibrazione (ng)	r ²	LOD (µg/kg)	
			Carne	Mangimi materie prime
F	0,02-3,96	0,999	0,02	0,005
Pa	0,01-1,94	0,999	0,02	0,005
A	0,01-1,98	0,999	0,00	0,000
Fl	0,02-3,96	0,999	0,04	0,010
P	0,01-1,95	0,999	0,10	0,025
BaA	0,01-1,98	0,999	0,01	0,003
Ch	0,01-1,98	0,999	0,03	0,008
BbF	0,02-3,97	0,999	0,02	0,005
BkF	0,01-1,99	0,999	0,01	0,003
BaP	0,01-1,99	0,998	0,01	0,003
DBahA	0,02-3,87	0,999	0,01	0,003
BghiP	0,02-3,96	0,999	0,02	0,005
IP	0,01-1,99	0,999	0,05	0,013

Tabella 4 - Ripetibilità analitica

	Carne			Mangime		
	Media* (µg/kg)	DS	CV (%)	Media* (µg/kg)	DS	CV (%)
F	35,2	6,3	17,8	0,73	0,07	9,3
Pa	273,3	24,5	9,0	3,26	0,52	16,1
A	20,1	1,5	7,4	0,20	0,03	17,0
Fl	49,8	2,7	5,4	0,75	0,13	17,8
P	63,0	3,6	5,7	1,65	0,29	17,6
BaA	1,5	0,1	3,7	0,02	0,01	23,0
Ch	3,3	0,2	7,0	0,36	0,07	19,0
BbF	2,1	0,2	7,4	0,16	0,03	21,6
BkF	0,9	0,0	5,1	0,04	0,01	20,0
BaP	1,2	0,1	7,6	0,04	0,01	15,6
DBahA	0,5	0,1	16,6	0,04	0,01	27,7
BghiP	2,0	0,2	9,1	0,11	0,03	27,3
IP	1,8	0,2	10,1	0,08	0,011	14,1

* I dati sono la media di 6 repliche

Il mais e l'orzo sono risultati gli ingredienti più "puliti", mentre livelli di contaminazione più elevati sono stati riscontrati per la soia, ma soprattutto per la crusca di grano tenero (come evidenziato dai tracciati

HPLC di questi campioni in figura 3). Inoltre, va sottolineato che, mentre orzo e mais erano di produzione aziendale, ci sono stati forniti in granella e sono stati macinati in laboratorio adottando tutte le at-

tenzioni del caso per evitare contaminazioni, la farina di soia e la crusca di grano tenero sono state acquistate sul mercato già macinate. Anche l'olio di girasole è risultato contaminato con livelli mediamente bassi. La maggior contaminazione riscontrata nei formulati addizionati di olio non può quindi essere spiegata attraverso l'apporto proveniente dall'olio di girasole utilizzato nella formulazione, che presentava livelli di BaP inferiori a 0,2 ppb e che comunque entrava nella composizione del formulato in piccola percentuale (3%).

Sia nei mangimi che nelle materie prime gli IPA pesanti maggiormente rappresentati sono risultati essere crisene e benzo[b]fluorantene. Mentre per quanto riguarda gli IPA leggeri sono risultati presenti in quantità maggiore fenantrene, fluorene e/o pirene.

Contenuto di IPA nei campioni di carne

Tutti i campioni di carne hanno mostrato livelli di IPA pesanti spesso al di sotto del LOD con livelli dei singoli IPA leggeri inferiori a 0,2 µg/kg, fatta eccezione per il fenantrene (massimo 0,96 µg/kg). Anche se risulta difficile fare dei confronti, visti i bassissimi livelli di contaminazione riscontrati, non si sono osservate differenze apprezzabili in relazione al sesso o alla appartenenza ai diversi gruppi di suini

Tabella 5 - Assunzione giornaliera di BaP attraverso il mangime

Mangime	Kg mang./maiale/gg	ng BaP/kg p.c./gg
C	2,80	1,0
CE	2,79	1,1
CO	2,70	2,8
COE	2,67	2,0

Tabella 6 - Contenuto medio di IPA (ppb) dei campioni di mangime

	C	CE	CO	COE
F	0,560	0,634	0,516	0,696
Pa	2,261	2,321	2,007	2,225
A	0,122	0,123	0,165	0,168
Fl	0,542	0,514	0,632	0,677
P	1,199	1,326	1,410	1,420
BaA	0,012	0,028	0,067	0,043
Ch	0,299	0,367	0,322	0,317
BbF	0,115	0,121	0,171	0,152
BkF	0,043	0,049	0,062	0,066
BaP	0,037	0,043	0,107	0,079
DBahA	0,017	0,064	0,015	0,038
BghiP	0,066	0,059	0,141	0,153
IP	0,061	0,064	0,096	0,083

C = mangime di controllo, CE = mangime con vit E; C O = mangime con olio di girasole, COE = mangime di controllo

alimentati con le 4 tipologie di mangime. I bassi livelli di contaminazione riscontrati nella carne cruda confermano i dati di letteratura secondo i quali gli IPA vengono rapidamente metabolizzati e quindi non si accumulano nei tessuti adiposi come accade per altri xenobiotici apolari quali i PCB. I profili medi degli IPA nei campioni di carne e mangime sono risultati molto simili, con la sola differenza che il mangime presenta concentrazioni di IPA circa 6 volte più alte rispetto alla carne, pur avendo un contenuto in grasso 10 volte più basso. Questo fatto sembra confer-

mare che l'origine degli IPA nelle 2 matrici sia la stessa, ossia l'inquinamento ambientale derivato dalla manipolazione del campione.

Come si può osservare dai dati riportati in tabella 8, il processo di cottura in padella non porta ad apprezzabili aumenti del livello di contaminazione con IPA. I 2 campioni di carne cotti alla griglia (nelle stesse condizioni) presentano invece livelli di contaminazioni elevati e, nel caso del campione di salsiccia, addirittura superiori al limite di 5 ppb recentemente posto per il BaP dalla normativa comunitaria. Il livello di IPA più elevato ritrovato

Tabella 7 - Contenuto medio di IPA (ppb) dei campioni di materie prime

	SS	GT	GO	GM	OG
F	1,025	1,002	0,606	0,507	4,063
Pa	2,617	2,955	0,794	1,612	12,482
A	0,261	0,169	0,026	0,195	0,371
Fl	1,652	1,290	0,264	0,089	3,758
P	1,441	1,471	0,173	0,834	6,749
BaA	0,211	0,205	0,016	0,016	0,429
Ch	0,437	0,635	0,217	0,215	0,612
BbF	0,255	0,417	0,049	0,035	0,254
BkF	0,078	0,128	0,029	0,013	0,098
BaP	0,153	0,248	0,041	0,011	0,185
DBahA	0,074	0,054	0,022	0,008	0,000
BghiP	0,330	0,271	0,070	0,028	0,394
IP	0,094	0,184	0,035	0,013	0,254

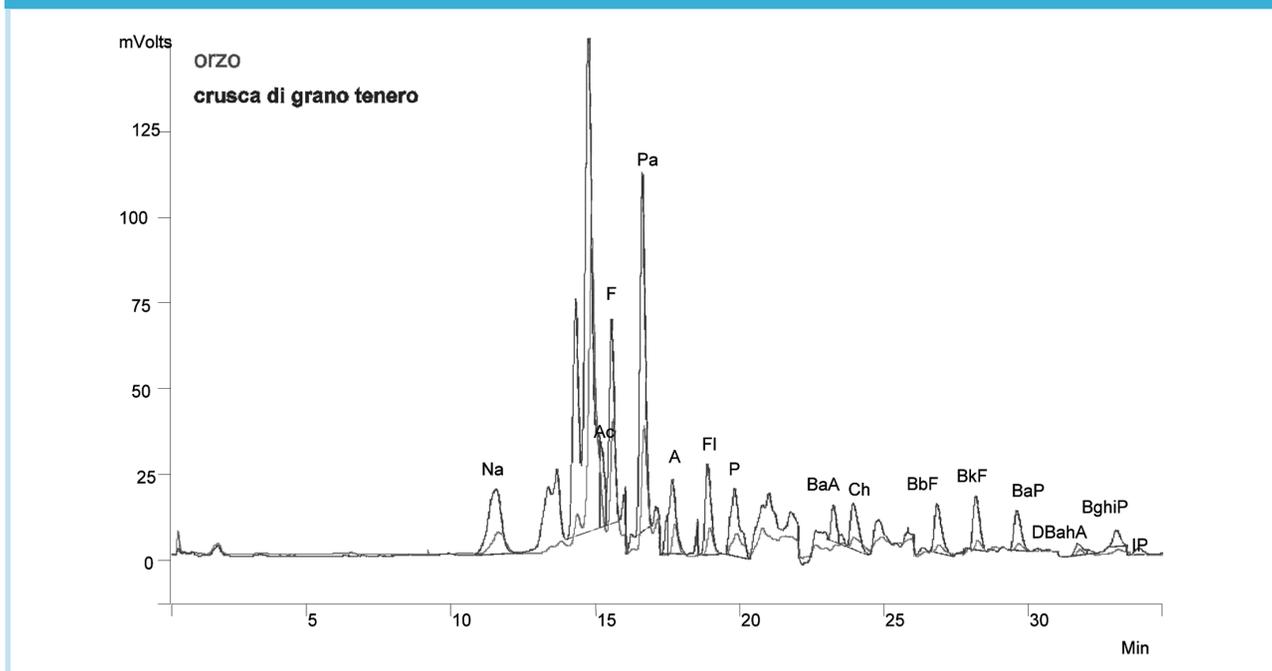
SS = farina di soia, GT = crusca di grano tenero, GO = granella di orzo, GM = granella di mais, OG = olio di girasole

nella salsiccia, rispetto alla braciola di maiale, può essere spiegato con il fatto che la salsiccia presenta un contenuto di grasso più elevato. Come è noto, durante la grigliatura il grasso che cola e cade sulla brace pirolizza ad alte temperature producendo elevati quantitativi di BaP e altri IPA cancerogeni, che vengono depositati sulla superficie della carne dal fumo che sale.

Frazione volatile

La retta di taratura ottenuta per i campioni di mangime presentava la seguente equazione:
 $y = 1125580,83x + 3984796,61$ con $R^2 = 0,94$.

Figura 3 - Confronto tra il cromatogramma ottenuto da un campione di orzo e uno ottenuto da crusca di grano tenero



Nel caso dei campioni di carne, dopo avere valutato la possibilità di lavorare sul campione tal quale, a causa della disomogeneità di distribuzione dei differenti componenti, si è optato per la macinazione. Al fine di verificare su un sistema modello semplificato l'affidabilità dell'approccio analitico ipotizzato, i campioni macinati sono stati fortificati con soluzioni a titolo noto di esanale, tuttavia non è stato possibile ottenere un'omogenea dispersione dell'esanale nel campione, con conseguenze negative sulla ripetibilità della determinazione analitica. Analogamente la tecnica di disperdere i campioni in acqua, precedentemente applicata a campioni di conserve di carne (pancetta affumicata), non ha dato esiti positivi, né ha giovato, in entrambi i casi, la tecnica del salting out, indipendentemente dalla quantità a natura del sale aggiunto. In matrici complesse con struttura proteica, la natura del sale è importante in quanto non si tratta solo di legare l'acqua in maniera più o meno forte, ma anche di modificazioni della struttura di alcune proteine, con conseguente rilascio della frazione aromatica dell'alimento stesso. Si è quindi optato per liofilizzare i campioni macinati: in questo modo è stato possibile migliorare notevolmente ripetibilità dell'analisi e linearità di risposta.

La valutazione della frazione volatile delle materie prime ha messo in

Tabella 8 - Contenuto di IPA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) dei campioni di carne cruda e cotta

	Macinato di maiale (crudo)	Macinato di maiale (cotto)	Braciola grigliata	Salsiccia grigliata
F	1,0	1,3	1,8	1,5
Pa	6,9	7,9	17,6	16,3
A	0,2	0,2	2,6	2,4
Fl	2,9	3,6	13,3	20,1
P	5,7	6,7	23,9	39,9
BaA	0,1	0,2	1,3	4,1
Ch	0,4	0,6	2,6	4,1
BbF	0,1	0,1	2,0	6,7
BkF	0,0	0,0	0,8	2,6
BaP	0,0	0,0	3,1	10,9
DBahA	0,0	0,0	0,3	2,5
BghiP	0,0	0,0	2,2	10,2
IP	0,0	0,0	1,6	7,9

evidenza contenuti di esanale molto bassi, compresi tra non dosabile ($< 0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$) e $20,0 \mu\text{g}/\text{kg}$. I campioni di soia sono risultati quelli con minore contenuto (da $< 0,5$ a $0,6 \mu\text{g}/\text{kg}$), mentre la granella di orzo in un campione ha presentato un contenuto pari a $20,0 \mu\text{g}/\text{kg}$, in uno pari a $7,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ e nel terzo non dosabile. Il ridotto contenuto di esanale per campioni di farina di soia conservata al buio era stato peraltro già riportato da Lee et al. (24). La crusca di grano tenero ha mostrato in un caso un contenuto di esanale di $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, mentre negli altri casi l'esanale era presente in quantità non dosabile. Anche la granella di mais si è dimostrata molto disomogenea, con livelli di esanale compresi tra $1,5$ e $8,2 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Per quanto riguarda le altre sostanze volatili, si sono ottenuti tracciati gas cromatografici ricchi di picchi; si è preferito esprimere i dati ottenuti come composizione percentuale, considerando solo quelli la cui

identificazione fosse stata sostenuta, oltre che dallo spettro di massa, anche da indicazioni bibliografiche (25). I composti identificati sono stati: aldeidi (esanale, benzaldeide), acidi (acetico, propionico, pentanoico, esanoico), alcoli (1-eptanolo, 3-ottanolo, 3-metil-2-butanolo, 1,2-propandiol) e metilpirazina.

La distribuzione dei suddetti composti non risulta omogenea nei differenti substrati: su base percentuale relativa, l'esanale risulta sempre preponderante (33-41% in soia, 17-43% nel grano tenero, 41-56% nell'orzo, 65-87% nel mais), mentre la metilpirazina è il componente preponderante nel grano tenero (29-36%) ma risulta poco rappresentata in orzo e mais (0-6% e 0-8%, rispettivamente), l'acido acetico, secondo componente per quantità relativa nella soia (13-17%), presenta concentrazioni molto variabili nel grano tenero (0-26%), orzo (4-21%) e mais (3-13%). Elevate risultano le concentrazioni di 3-ottanale

in tutti i campioni (5-12% soia, sino a 16% grano tenero, 22-25% orzo, 2-14% mais). L'acido propionico è essenzialmente presente solo nella soia (4-11%), assente in orzo e mais, non superiore al 5% in grano tenero.

A differenza delle materie prime, i mangimi presentano contenuti di esanale rilevanti (tutti espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$): mangime di controllo 134 ± 69 , mangime + olio + vitamina E 146 ± 72 , mangime + olio di girasole 182 ± 32 , mangime + vitamina E 161 ± 67 . Il 2-pentil furano, la cui origine, come per l'esanale è da mettere in relazione alla decomposizione dell'idroperossido dell'acido linoleico, è il secondo componente come concentrazione relativa, e le sue concentrazioni variano nei 3 lotti in maniera casuale. L'analisi HS (Head Space)-SPME dei campioni di carne è stata realizzata con due tipi di fibra: trifasica e bifasica, come riportato anche da altri autori su carne di maiale (26, 27), sia per via GC-FID che per GC-MS. In ogni caso, non ha portato a risultati apprezzabili: mediante GC-MS SIM è stato possibile mettere in evidenza la presenza di esanale, etanolo, ottanale, nonanale, acido esanoico e butanoico, ma sempre a livelli inferiori a quanto rilevato nei mangimi e comunque inferiori alla concentrazione rilevabile al FID. Si è evidenziata la presenza costante di limonene che sembra un evidente effetto della formulazione. Ad

esempio il 1° lotto presenta un valore di 2-pentilfurano di circa $7 \mu\text{g}/\text{kg}$ contro i 18 e 17 rispettivamente del campione addizionato di vitamina E e di olio di girasole, mentre il 2° lotto presenta valori identici per controllo e campione addizionato di vitamina E, e valori dello stesso ordine di grandezza anche se leggermente inferiori per gli altri 2 campioni. Considerazioni analoghe valgono per eptanale, ottanale e nonanale, questi ultimi 2 presenti a basse concentrazioni o assenti.

Conclusioni

I metodi messi a punto sono risultati idonei alla determinazione di IPA e composti volatili nei campioni analizzati.

I mangimi sono risultati contaminati con livelli di IPA generalmente inferiori a $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$. La crusca di grano tenero e la soia sono risultate le materie prime più contaminate. I bassissimi livelli di contaminazione riscontrati nella carne cruda mostrano, come non vi sia alcun accumulo a livello del tessuto adiposo dell'animale. Gli IPA riscontrati nella carne sembrano derivare più da inquinamento ambientale, come comprovato dalla somiglianza tra i profili medi degli IPA riscontrati nella carne e nei mangimi.

Il rischio più importante di contaminazione con IPA nella filiera della carne è sicuramente rappresenta-

to dalla cottura che, se effettuata in condizioni non idonee (grigliatura, affumicatura tradizionale), può portare a livelli di contaminazione elevati con livelli di BaP superiori a $5 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Relativamente all'indagine sui problemi di irrancidimento ossidativo della frazione lipidica delle carni, eventualmente "indotto" da livelli di ossidazione della frazione lipidica dei mangimi, i risultati ottenuti sembrerebbero fare escludere la sussistenza di tale correlazione. Dai risultati relativi ai mangimi, invece, si possono trarre le seguenti conclusioni: 1) i lotti forniti non risultano omogenei sulla base della composizione quali-quantitativa della frazione volatile; 2) la implementazione di vitamina E, di olio di girasole addizionato o meno di vitamina E non sembra differenziare lo stato di ossidazione rispetto a quello riscontrato per i campioni di controllo che, anzi, in taluni casi risultano più poveri di composti attribuibili ad ossidazione lipidica.

Bibliografia

1. Moret S, Conte LS. Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J Chromatogr A* 2000; 882: 245-53.
2. European Commission. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of polycyclic aromatic hydrocarbons in food. 4 December 2002. European Commission, Brussels.

3. Dennis MJ, Massey RC, Cripps G, Venn I, Howarth N, Lee G. *Food Addit Contam* 1991; 8: 517-30.
4. Husain A, Naemi E, Dashti B, Omirah H, Zenki S. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food products originate from locally reared animals in Kuwait. *Food Addit Contam* 1997; 14: 295-9.
5. Gokalp HY, Ockerman HTW, Plimpton RF, Harper WJ. Fatty acids of neutral and phospholipids, rancidity scores and TBA values as influenced by packaging and storage. *J Food Sci* 1983; 48: 829-34.
6. Brewer MS, Ikins WG, Harbers CAZ. TBA values, sensory characteristics, and volatiles in ground pork during long-term frozen storage: Effects of packaging. *J Food Sci* 1992; 57: 558-63.
7. Larick DK, Turner BE, Schoenherr WD, Coffey MT, Pilkington DH. Volatile compound content and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet. *J Animal Sci* 1992; 70: 1397-403.
8. Nielsen JH, Sørensen B, Skibsted LH, Bertelsen G. Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Sci* 1997; 46: 191-7.
9. Hartman AD, Costello WJ, Libal GW, Wahlstrom RC. Effect of sunflower seeds on performance, carcass quality, fatty acids and acceptability of pork. *J Animal Sci* 1985; 60: 212-9.
10. St. John LC, Young CR, Knabe DA, et al. Fatty acid profiles and sensory and carcass traits of tissues from steers and swine fed an elevated monounsaturated fat diet. *J Animal Sci* 1987; 64: 1441-7.
11. Larick DK, Turner BE, Schoenherr WD, Coffey MT, Pilkington DH. Volatile compound content and fatty acid composition of pork as influenced by linoleic acid content of the diet. *J Animal Sci* 1992; 70: 1397-403.
12. Melton SL. Effects of feeds on flavor of red meat: A review. *Journal of Animal Science* 1990; 68: 4421-35.
13. Decker EA, Xu Z. Minimizing rancidity in muscle foods. *Food Technol* 1998; 52: 54-9.
14. Shahidi F, Yun J, Rubin LJ, Wood DF. The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavour acceptability in cooked ground pork. *Can Inst Food Sci Technol J* 1987; 20: 104-6.
15. Shahidi F, Pegg RB. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *J Food Lipids* 1994; 1: 177-86.
16. Shahidi F, Pegg RB. Hexanal as an indicator of the flavor deterioration of meat and meat products. In Ho CT, Hartman TG (Eds.), *Lipids in food flavors*. Washington, DC: American Chemical Society, 1994: 256-79.
17. Vercellotti JR, Kuan JCW, Liu RH, Legendre MG, St. Angelo AJ, Dupuy HP. Analysis of volatile heteroatomic meat flavor principles by purge-and-trap/gas chromatography-mass spectrometry. *J Agricod Chem* 1987; 35: 1030-5.
18. Nielsen JH, Sørensen B, Skibsted LH, Bertelsen G. Oxidation in pre-cooked minced pork as influenced by chill storage of raw muscle. *Meat Sci* 1997; 46: 191-7.
19. Brunton NP, Cronin DA, Monahan FJ, Durcan R. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) fibers for measurement of hexanal and pentanal in cooked turkey. *Food Chem* 2000; 68: 339-45.
20. Moret S, Conte LS. A rapid method for polycyclic aromatic hydrocarbon determination in vegetable oils. *J Sep Sci* 2002; 25: 96-100.
21. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science*, submitted for publication.
22. García Falcón MS, Gonzáles Amigo S, Lage Yusty MA, López de Alda Villazán MJ, Simal Lozano J. Enrichment of benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1996; 753: 207-15.
23. Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MA, Garcia-Montelongo FJ. Optimization of the microwave-assisted saponification and extraction of organic pollutants from marine biota using experimental design and artificial neural networks. *Chromatographia* 2006; 63: 155-60.
24. Lee JY, Min S, Che EO, Min DB. Formation of volatile compounds in Soy flour by singlet oxygen oxidation during storage under light. *J Food Sci* 2003; 68: 1933-7.
25. Monsoor MA, Proctor A. Volatile component analysis of commercially milled head and broken rice. *J Food Chemistry and Toxicology* 2004; 69, 8: 632-6.
26. Stephen Elmore J, Mottram DS, Hierro E. Two-fibre solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile aroma compounds in cooked pork. *J Chromatog A* 2000; 905: 233-40.
27. Lakdas N, Fernando EP, Bergb, Ingolf UGr. Quantitation of hexanal by automated SPME for studying dietary influences on the oxidation of pork. *J Food Comp Anal* 2003; 16: 179-8.