

Università degli studi "Federico II" Napoli
Dipartimento di Farmacia



Chimica e Tossicologia dei Nutraceutici

Contaminanti Emergenti
in Alimenti e Nutraceutici

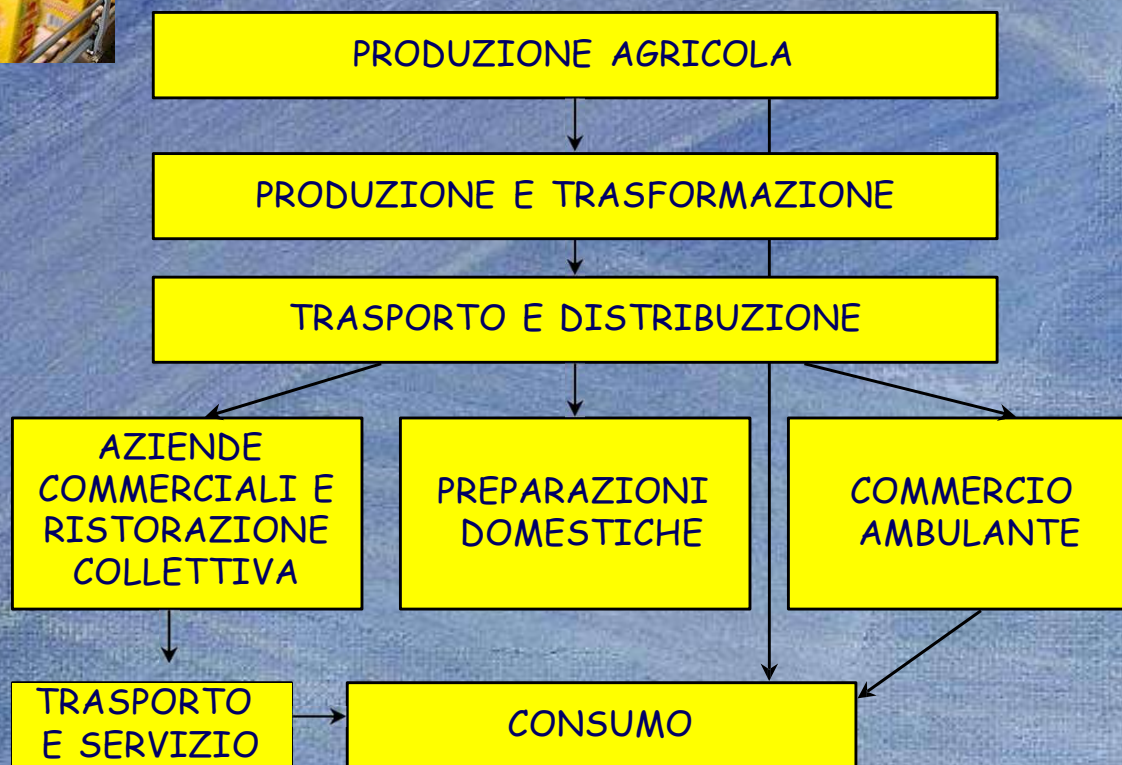
Prof. Gian Carlo Tenore

a.a. 2024-2025

I livelli di contaminazione alimentare



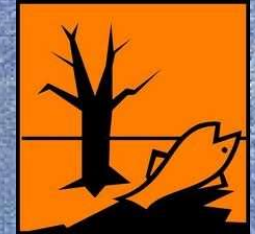
La filiera produttiva



I livelli di contaminazione alimentare



L'ambiente acquatico



Scarichi industriali ed acque reflue (farmaci, cosmetici, droghe illecite, ...)

Persistenti, liposolubili e bioaccumulano: i POPs

Sostanze che persistono nei sedimenti [pesci, molluschi, crostacei]

Alchilfenoli, polibromodifenileteri, composti perfluorici

Impianti di potabilizzazione

Direttiva 2000/60: Standard di qualità per l'ambiente acquatico per tutte le sostanze pericolose prioritarie di cui alla Decisione 2455/2001/EC del 20 Novembre 2001 e per quelle di cui alla Direttiva 76/464/EC.

Stabilisce le concentrazioni massime ammissibili definite come media annua³ dei rilevamenti.

I livelli di contaminazione alimentare



Produzione e Trasformazione



Tecniche di preparazione industriali e domestiche

Tecniche di conservazione

Additivi alimentari

Residui della lavorazione



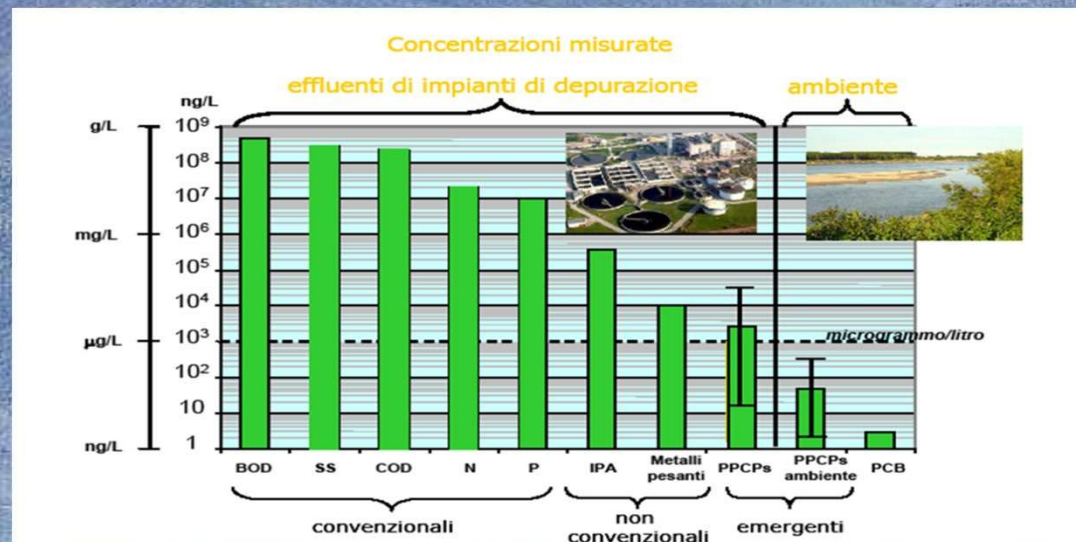
Nuovi contaminanti, "contaminanti emergenti": cosa sono ?

Contaminanti degli alimenti di origine ambientale

"Emergenti" per l'aumento di attenzione

"Nuovi" perché non ancora inclusi nei programmi di controllo negli alimenti

Limiti di sensibilità



Contaminanti emergenti: studi tossicologici

Italia: dati scarsi

Europa: studi indicano un'esposizione non trascurabile e una capacità di bioaccumulo



LA SUSCETTIBILITA' DELL'INFANZIA

Vulnerabilità generale:

maggiore consumo di alimenti/acqua, ritmo respiratorio

contatto col suolo, immaturità dei sistemi metabolici

minore cognizione dei rischi

suscettibilità specifica

maturazione di organi e sistemi:

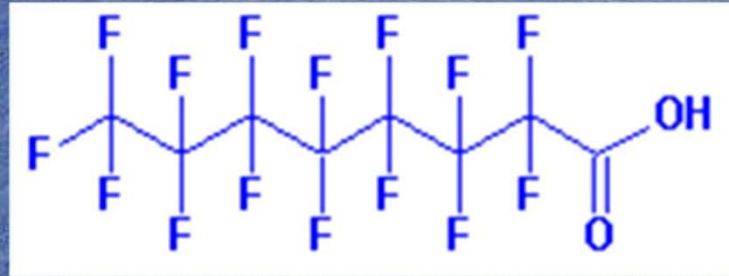
nervoso, immunitario, endocrino, riproduttivo



Contaminanti Chimici Emergenti

- Composti perfluorici
- Semicarbazide
- Acrilamide
- Furano

Composti Perfluorici (PFCs)



Famiglia caratterizzata da molecole costituite da catene di atomi di carbonio di varia lunghezza a cui sono fortemente legati atomi di fluoro

- Acido perfluorooctanico (PFOA)
- Solfato di perfluorooctano (PFOS)

Composti Perfluorici (PFCs)

Utilizzazioni

proprietà antiaderenti

- numerosissime applicazioni industriali (pentole, confezioni alimentari, etc),

Proprietà surfattanti

- refrigeranti, tensioattivi, schiume antiincendio, lubrificanti, adesivi, cosmetici, farmaci, insetticidi, rivestimenti per superfici e tappeti, vernici, detergenti, cere, pellicole fotografiche, ecc.)
- PFOA utilizzato per politetrafluoroetilene = Teflon, e Goretex

Proprietà isolanti

- Scatole pizza, patatine fritte

Composti Perfluorici (PFC)

Teflon

- Teflon marchio registrato della resina tetrafluoretilene (C8) scoperta per caso nel 1941 da Plunkett
- Costi di produzione molto elevati uso militare
- 1967 Du Pont inizio produzione (abbasamento dei costi)
- Inerzia chimica
- Polvere bianca insolubile in solventi organici ed in acqua dove galleggia in acqua.
- Ottime qualità elettriche
- Resistenza al fuoco
- Non propaga la fiamma
- Ottima scorrevolezza superficiale
- Antiaderenza
- Struttura cristallina a 327°C resina amorfa semiliquida, modellabile per iniezione o estrusione
- 500°C decomposizione con liberazione di gas fluorurati
- Uso iniziale isolamento fili elettrici, cavi, guarnizioni e impiegato per altre applicazioni dell'industria chimica. Successivamente rivestimento antiaderente per le pentole.



Composti Perfluorici (PFC)

Prodotti realizzati con il politetrafluoretilene (Teflon)

Lampade per il riscaldamento, Stufe portatili, Piastre dei ferri da stiro, Rivestimenti per tavole da stiro, Bruciatori dei fornelli, Bollitori, Piastra di cottura, Alcuni utensili per cucinare, Woks (pentole cinesi per saltare verdure e carni), Piastre elettriche/non-elettriche per cialde, Piastre elettriche per la carne, Friggitrici, Macchine per fare il popcorn, Caffettiere, Macchine per fare il pane in casa, Matterello non aderente, Stampi per ghiaccioli, Cavatappi, Acciaio non aderente, Pentole per fare il brodo, Casseruole per arrostiti, Stampi antiaderenti per il pan pepato, Teglie per pizza



Composti Perfluorici (PFC)

- Resistenti al calore, allo stress chimico, repellenti all'acqua ed ai grassi
- Altamente persistenti e bioaccumulabili
- Bioaccumulo nell'ambiente
- Almeno 15 differenti PFC riscontrati nel sangue umano
- Emivita nell'uomo: 1-9 anni
- Classificati POPs

Composti Perfluorici (PFC)

- Nel 1951 primo caso di intossicazione negli uccelli
- Attualmente esistono studi che indicano che anche un riscaldamento del polimero (Teflon) a 285° può causare la morte ad un uccello
- 2001-2003 riscontro PFOS, PFOA e PFHxS (composto correlato) in: delfini, balene, tonno, pesce spada e cormorani del Mediterraneo; foche, aquile del mare e salmoni del Baltico; specie ittiche, volati e mammiferi dell'Artico, Antartide, Canada, Giappone, etc
- Nel mediterraneo ed in particolare nei mari Tirreno ed Adriatico sono stati riscontrati in grandi predatori (soprattutto cetacei e pesci spada) livelli fino a 1 ppm su peso fresco
- Lipofili con accumulo nel fegato

Composti Perfluorici (PFC)

Sono stati classificati come cancerogeni per gli animali

Inducono alterazioni del sistema endocrino (ipotiroidismo) del sistema immunitario, dell'apparato riproduttivo, epatopatie e pancreatiti e teratogenicità

Teflon

Collegato a riduzione del peso nei nascituri.

In uno studio del sangue di 300 neonati è emerso che tanto più le donne gravide erano esposte a PFOA, tanto inferiore era il loro peso alla nascita e tanto più piccole le misure della loro testa.

Composti Perfluorici (PFC)

Secondo uno studio americano pubblicato dalla rivista Human Reproduction, i perfluorinati (PFC) possono essere incriminati come causa di problemi nel concepimento.

I ricercatori hanno trovato livelli elevati di PFC nel sangue di 1.240 donne.

Lo studio ha analizzato i campioni del sangue di donne che programmavano una gravidanza. I livelli di PFC variavano da 6,4 ng/mL di sangue a 106,4 ng/mL. Le donne sono state poi seguite per vedere se effettivamente riuscivano a restare incinte. Hanno così osservato che quelle con le maggiori concentrazioni di PFC avevano più difficoltà di concepimento o dovevano ricorrere alla fecondazione artificiale.



Determinazione dei composti perfluorici

Metodo cromatografico:

- Estrazione della matrice con soluzione acida
- Solid phase extraction (SPE)
- HPLC UV o IR
- Luna C18 100 mm x 2 mm, 5- μ m
- Gradiente
Solvente A: 10 mmol/L Ammonium phosphate
Solvente B: MeOH
10% B per 2 min, 98% B in 8 min, iso per 6.5 min, 10% B in 0.5 min.

... ma anche:

HPLC-MS MS



GC-FID/ECD

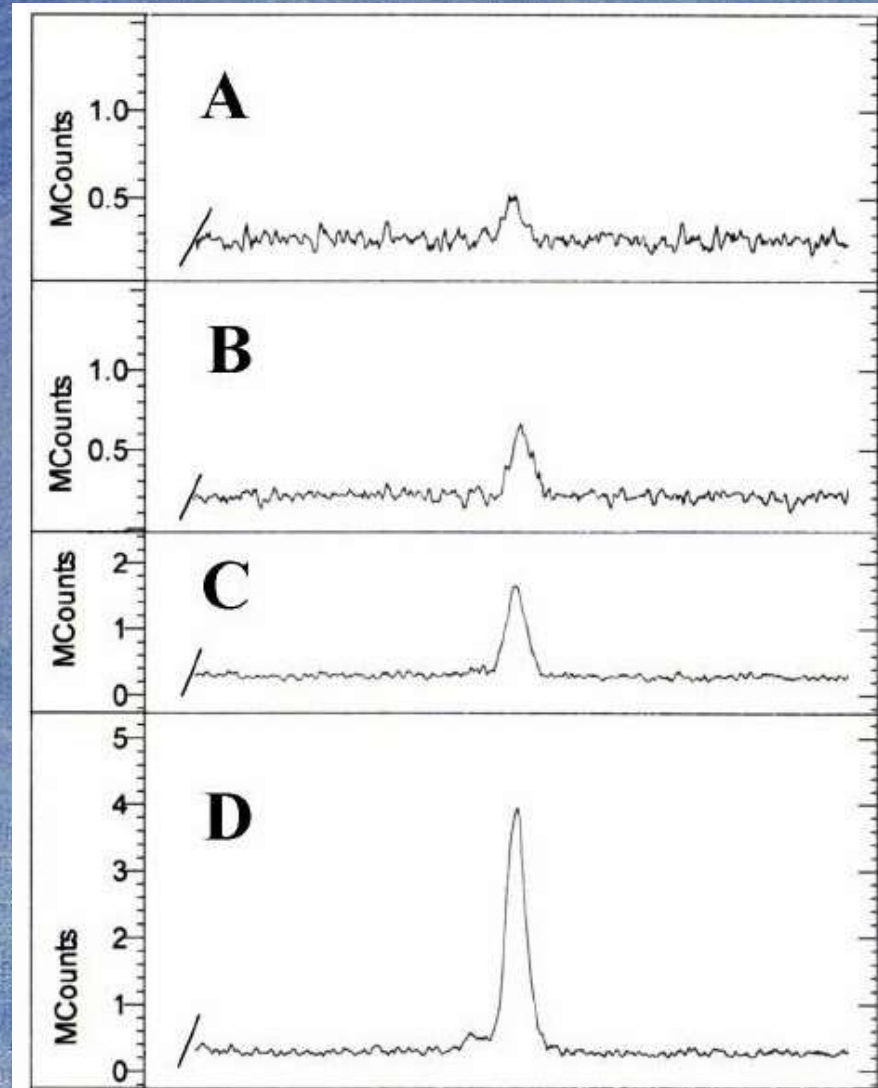


Determinazione dei composti perfluorici

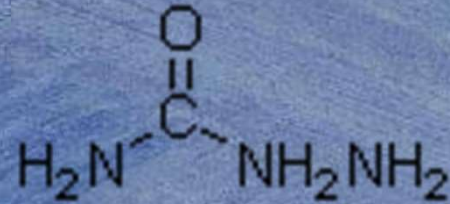
Total ion current chromatogram of PFOA by LC/MS/MS

Padella 16 cm diam.

Padella 20 cm diam.



Semicarbazide (SEM)



- 2003: Semicarbazide in Baby Food
 - SEM levels up to 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were found in baby food
- Exposition
 - Infant, 4 months
 - Not worst case: 0,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (daily intake of 190 g jar food (= 1 glass jar), contaminated with 15 ppb SEM of a 6 kg weight baby)
 - Worst case: 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight (daily intake of 360 g jar food (= 3 glass jar), contaminated with 20 ppb SEM of a 6 kg weight baby)
 - Adults
0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight



Semicarbazide (SEM)

- Exposition

Age-specific exposures to SEM

(according to the intake of commercial baby food and assuming a contamination level of 20 ppb in all products)

Age (months)	Body weight (BW) (kg)	Average Intake ($\mu\text{g}/\text{infant}/\text{day}$)
3	5,8	0,23 \pm 0,22
6	7,8	0,50 \pm 0,29
9	8,8	0,53 \pm 0,29
12	9,8	0,42 \pm 0,29

Semicarbazide (SEM)

Tossicologia

Genotoxicity	Hayatsu et al., 1966	In vitro	SEM binds to cytosine residues
	Toth et al., 1975	Mice (0.625 g SEM/L drinking water)	Causes cancer in female mice
	Parodi et al., 1981	Mice (in vivo)	No measurable DNA damage
	Parodi et al., 1981	Salmonella (TA 1535)	Little mutagenic activity without addition of S9 mix
	Hirakawa et al., 2003	DNA (in vitro)	Damage at thymine and cytidine residues in presence of Cu(II) (involvement of carbamoyl radicals in mutagenicity)

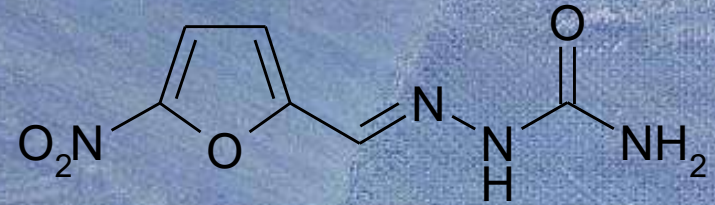
Teratogenicity	Steffek et al., 1972	Rats, 25-100 mg SEM/day	Embryo fetal death, cleft palate in surviving fetuses (no effects at 5-10 mg/day)
	De La Fuente, 1986	Wistar Rats, 17mg SEM/kg by intraperi-toneal injection	Malformation of brain and kidney, haemorrhages

Per l'uomo: dati quali-quantitativamente non attendibili

Semicarbazide (SEM)

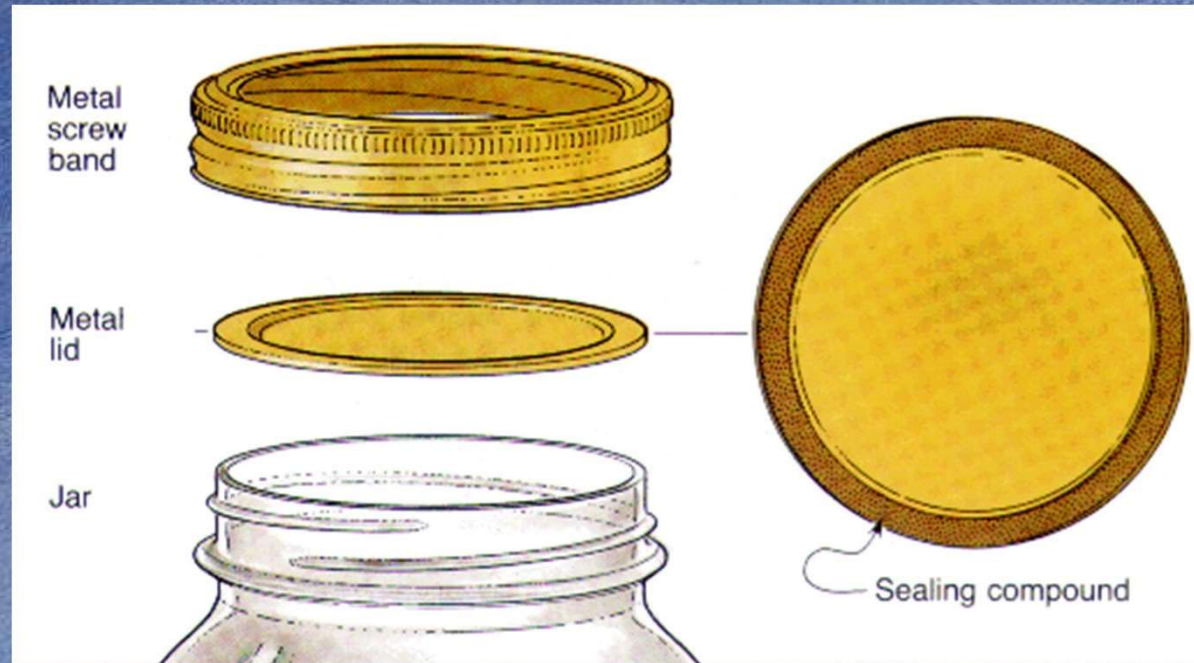
- 2003 individuata in omogeneizzati come metabolita proteico del nitrofurazone (vietato nella UE dal 1995 - "zero-tolerance" 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ alimento)

- Guarnizione dei tappi per omogeneizzati
Livelli di 1 - 7 mg SEM/kg guarnizione
(migrazione per acqua di condensa?
Reazione con l'alimento?)



Nitrofurazone (antibiotico)

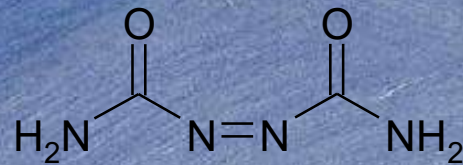
Semicarbazide (SEM)



PVC resin	40 - 60 %
Plasticizer	30 - 40 %
Erucamide, Oleamide wax	2 - 4 %
Silicon Oil	1 - 2 %
Titanium dioxide	0,5 - 1 %
Ca/Zn-stearate	0,5 - 1 %
Azodicarbonamide	0,2 - 0,5 %

Semicarbazide (SEM)

Impiego dell'ADC

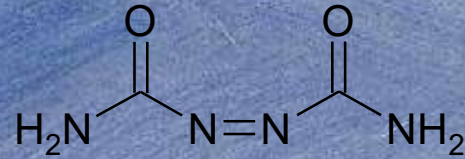


Agente schiumogeno e di rigonfiamento

- è aggiunto alle plastiche per formare minuscole celle gassose nelle maglie del polimero
- spesso sono aggiunti sali metallici per favorire le proprietà di rigonfiamento e rallentare la decomposizione
- stabile in un ampio range di temperature
- assicura un'elevata impermeabilità

Semicarbazide (SEM)

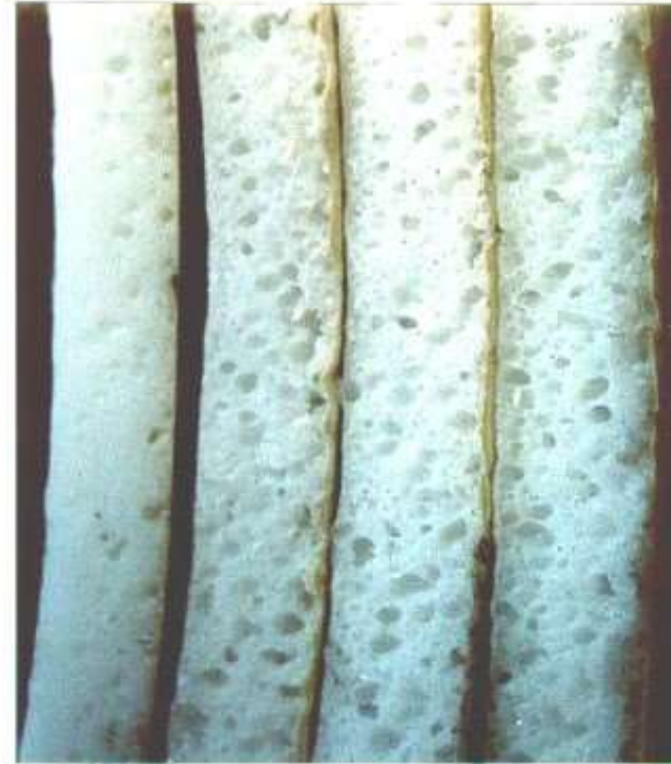
Impiego dell'ADC



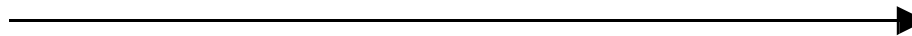
Sodium bicarbonate



Azodicarbonamide

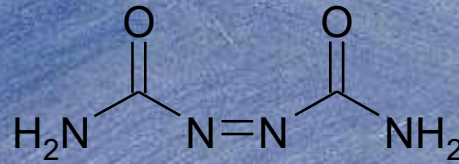


TEMPERATURA



Semicarbazide (SEM)

Sottoprodotti dell'ADC



- SEM impurezza della sintesi dell'ADC, grandi quantità dopo trattamento termico dell'ADC

Pastorizzazione: produzione accettabile

Sterilizzazione: produzione 50 volte (80% dei prodotti sul mercato)

Direttiva 2004/1/CE

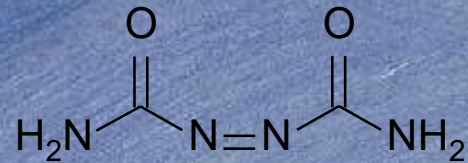
- 2005 Divieto di uso di azodicarbonammide nei materiali plastici utilizzati come materiali a contatto con alimenti

- Formazione di etil carbammato per contatto con soluzioni alcoliche (cancerogeno per uomo e animali)

Decisione dello Scientific Committee on Food (SCF) (2003)
sull'Azodicarbonamide: *divieto all'uso per la formulazione di materiali destinati a venire in contatto con alcol*

Semicarbazide (SEM)

Sottoprodotti dell'ADC



Decomposizione di azodicarbonamide usata nelle farine come agente migliorativo dell'impasto (vietato, EFSA 2003)

Semicarbazide

Altre fonti

- Azione ipoclorito (residuo pulizia materiali o residuo produzione additivi) su:

1 carragenina

2 albume d'uovo in polvere

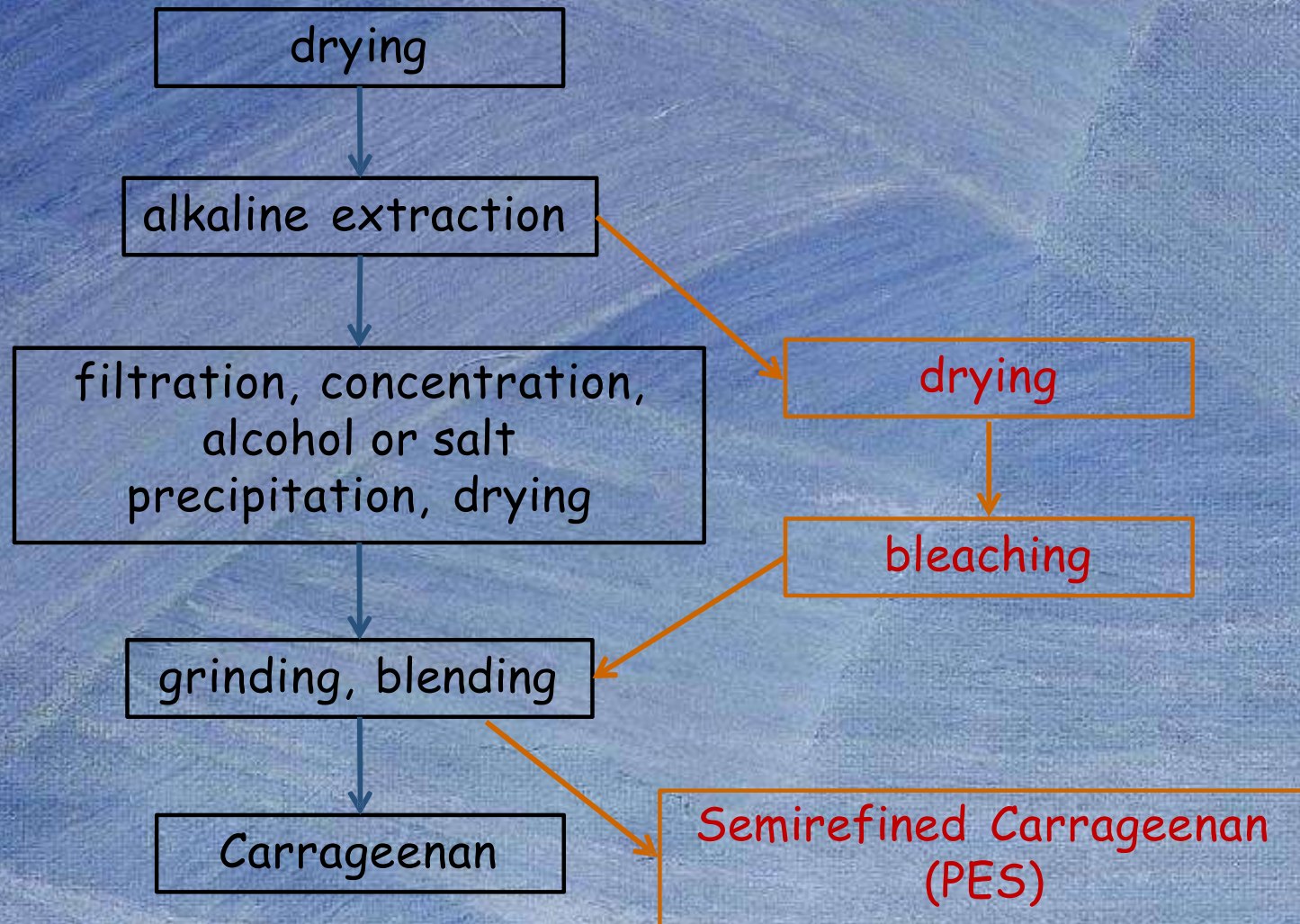
Semicarbazide

Carragenina

- Polisaccaride estratto da alghe
- Additivo alimentare (E 407):
agente addensante
- Applicazioni
 - Insaccati
 - Cioccolato
 - Gelati, yoghurt, budini
 - Gelatine, marmellate
 - Dentifrici, gel

Semicarbazide

Processo di estrazione e raffinazione della carragenina

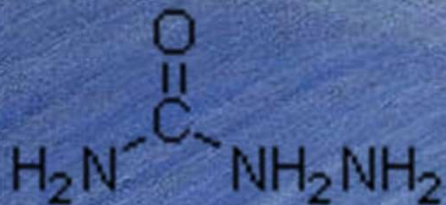


Semicarbazide

Contenuto di SEM nella lavorazione della carragenina

- Alga grezza (fw): 0.2 ppb
- Alga grezza (dw): 2 ppb
- Carragenina semiraffinata prima dello sbiancamento: 7 - 9 ppb
- Carragenina raffinata dopo sbiancamento: 10 - 100 ppb

Determinazione semicarbazide (SEM)



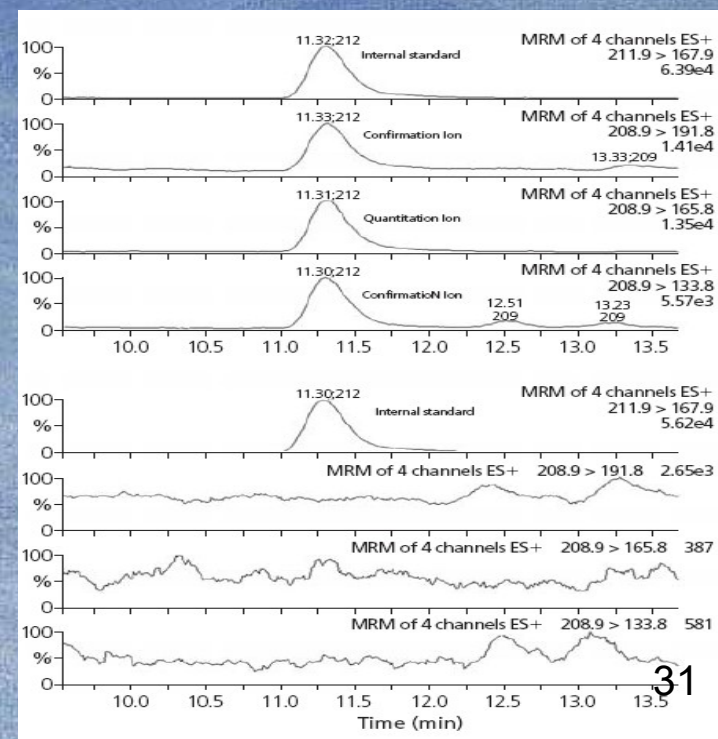
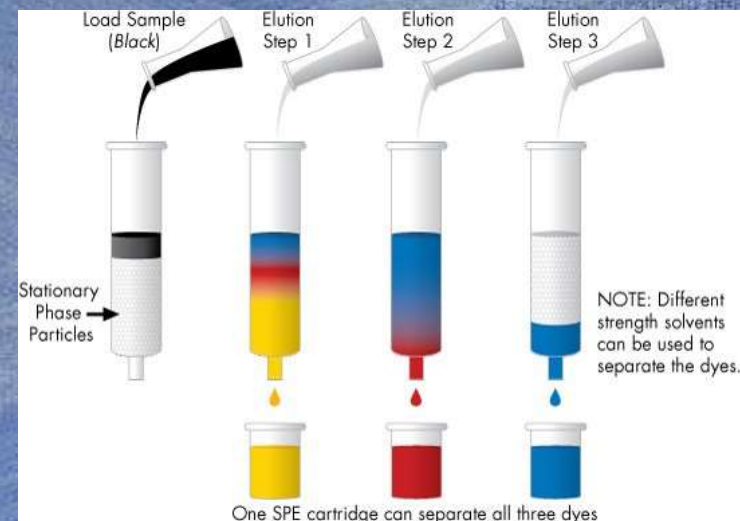
Semicarbazide libera e totale

Estrazione con HCl 0.2 M

Derivatizzazione con 2-nitrobenzaldeide e neutralizzazione

SPE ed eluizione con etil acetato

HPLC-MS MS con interfaccia ESI



Acrilammide



* Produzione poliacrilammide (purificazione acque, in associazione ad erbicidi)

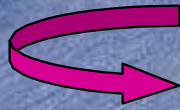
Aprile 2002 evidenza rischio

```
graph LR; A[Aprile 2002 evidenza rischio] --> B[Alimenti];
```

Alimenti

Acrilammide

- 1997 costruzione del tunnel di Hallandsas in Svezia



Forte contaminazione ambientale

- 1999 studio epidemiologico per valutare gli effetti sui lavoratori interessati



Presenza inattesa nel sangue di soggetti controllo

- 2002-2003 conferma della presenza anche ad alte concentrazioni (fino a 35 $\mu\text{g}/\text{kg}$)



Livelli 4 volte il limite massimo OMS per l'acqua potabile (10 $\mu\text{g}/\text{l}$)

- 2002 prima osservazione di acrilammide neofornata negli alimenti

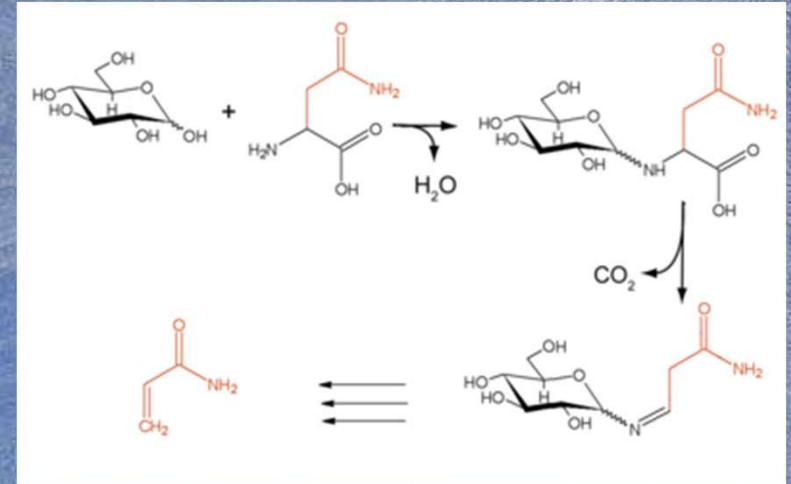


Alimenti a base amidacea cotti ad alte temperature (patate fritte, crackers, biscotti, pane, caffè)

Acrilammide

Meccanismi di formazione ipotizzati

- **Reazione di Maillard**
- **Glicosammine come precursori**
 - Eliminazione CO_2 e rottura del C-N eterociclico
 - Rilascio dell'aldeide di Strecker
 - Riduzione
 - Disidratazione
 - Formazione di acrilammide
- **Via radicali liberi**



Acrilammide

Parametri critici per la formazione:

Materie prime



- Composizione chimica
- Stato di conservazione

Precursori



- Zuccheri riducenti
- aa liberi (asparagina)
- Composti dicarbonilici

Tecnologia di
produzione



- Tempo/temperatura
- Umidità
- Pressione
- pH

Acrilammide: tossicità

Acrilamide

• Neurotossico di accumulo dimostrato da studi in vivo su animali ed epidemiologici sull'uomo (degenerazione nervosa)

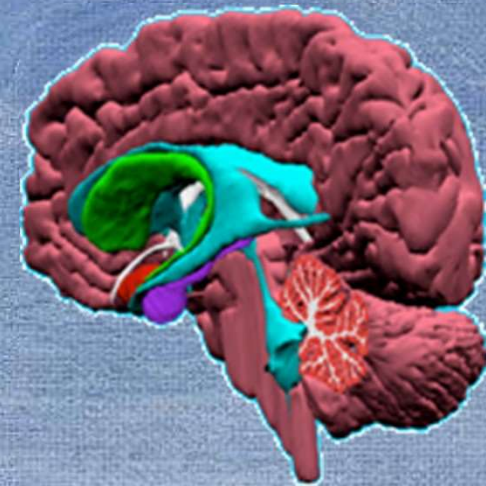
Perdita selettiva della porzione distale dei nervi sensitivi e motori. Vengono interessati prima gli assoni più grossi.

Clinica: parestesie, astenia

• Disregolazione ormonale (endocrina): sistema riproduttivo e sviluppo

In corso studi avviati da FDA

NOEL 2,0 mg/kg/die



Acrilammide: tossicità

Via ossidazione microsomiale: Acrilamide → Glicidamide

- Genotossica: azione su cellule germinali (addotti al DNA) con danni ereditari

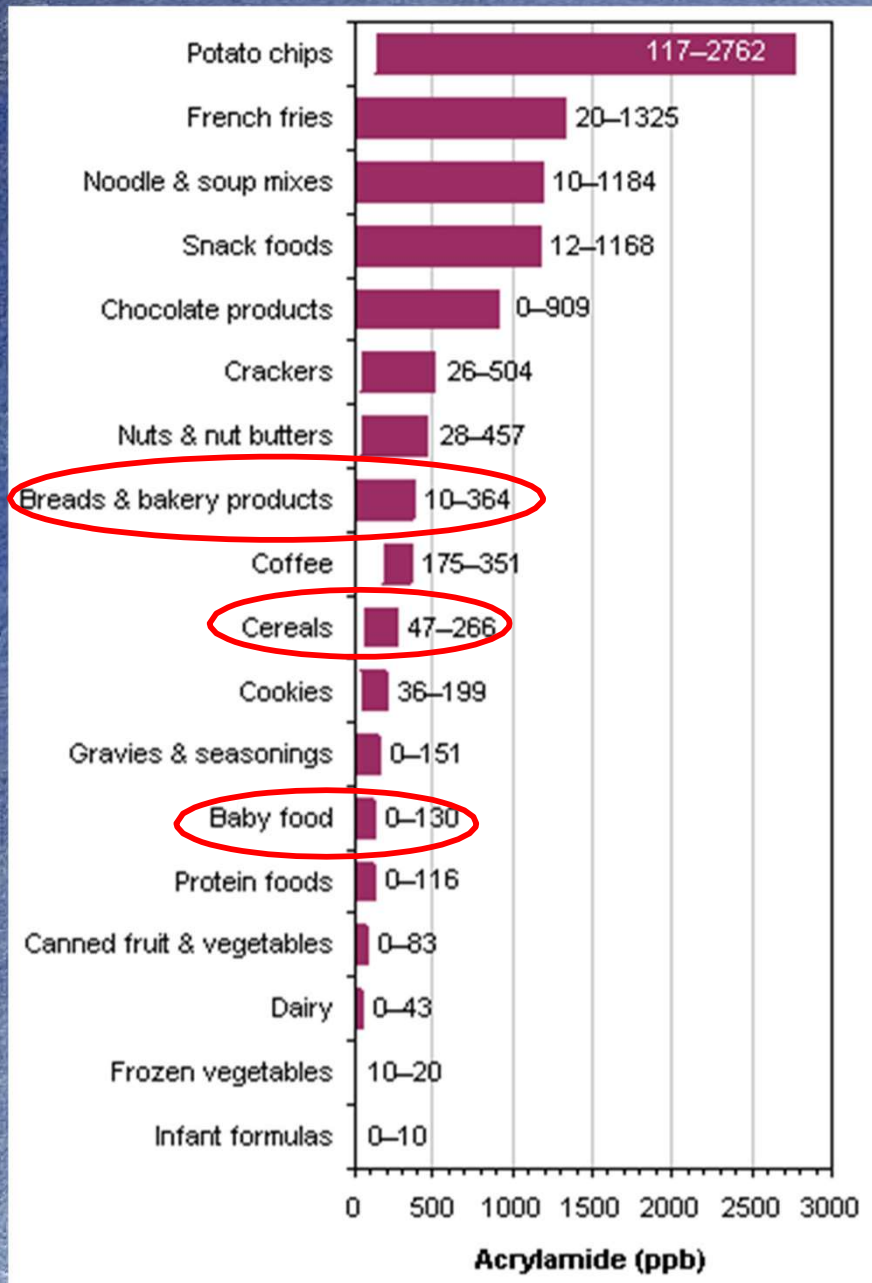
- Cancerogena

animale: mesotelioma peritoneale, cancro tiroide, polmone, testicolo, mammella, SNC, cavità orale, utero, clitoride

uomo: incrementi, non significativi, mortalità per cancro del pancreas;

Probabile cancerogeno per l'uomo (2A) (studi epidemiologici non conclusivi)

Acrilammide: contenuti in $\mu\text{g}/\text{kg}$



70 - 430 ppb



30-1400 ppb



3500-12000 ppb

Acrilammide: esposizione in Italia

Stima FAO/OMS:

0,3-0,8 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$

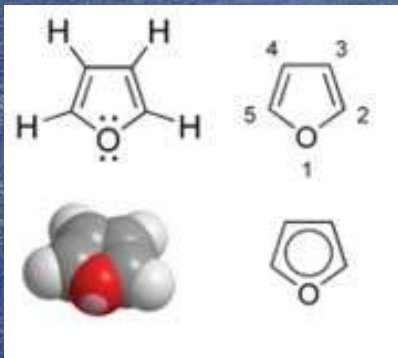
Stima ISS:

- 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$ per adulti (>16 anni)
- 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$ per adolescenti (10-16 anni)
- 0,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$ per infanzia (6-10 anni)

Determinazione acrilamide (SEM)

- 1) Il campione è omogeneizzato e sottoposto ad eliminazione della matrice grassa
- 2) Estrazione del residuo con 2-propanolo
- 3) Filtrazione
- 4) Analisi GC-MS

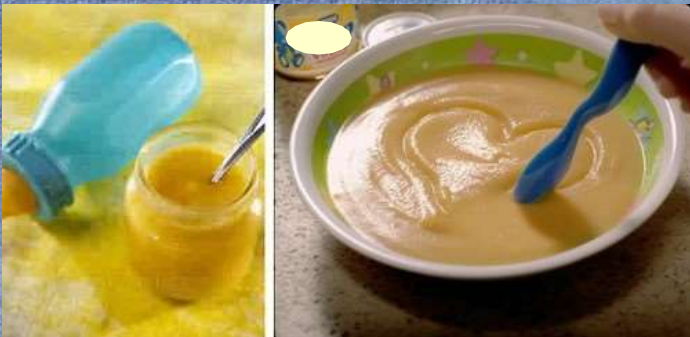




Furano



- 2004 FDA pubblicazione studio su presenza in cibi in scatola ed in contenitori sottoposti a trattamento termico
- Presenza in: alimenti per l'infanzia, salse, conserve, caffè, etc
- Alimenti per l'infanzia: ~ 0-112 $\mu\text{g}/\text{kg}$



Furano

Campioni analizzati



(5 campioni)
52.5-89.1 ppb



(3 campioni)
70.3-84.2 ppb



(7 campioni)
73.4-110.3 ppb



(4 campioni)
78.7-85.6 ppb



(6 campioni)
58.3-93.1 ppb



(3 campioni)
79.8-112.9 ppb

Furano

Fonti accertate o presunte

- Degradazione termica dei glicidi
- Reazione di Maillard
- Decomposizione ac. ascorbico, deidroascorbico ed isoascorbico
- Perossidazione e ciclizzazione di ac grassi

Furano

Metabolismo

- Assorbimento rapido da polmoni ed intestino
- Metabolismo veloce tramite enzimi P-450
- **Metabolita principale cis-2-butene-1,4-diolo**
- Concentrazioni tissutali limitate (fegato, rene)
- Escrezione:
 - 40% espirato
 - 20% urine
 - 22% feci

Furano: tossicità

- Cancerogeno in ratti e topi (adenomi e carcinomi epatocellulari, colangiocarcinomi epatici) (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006 Vural Gokmen and Hamide Z. Senyuva)
- Assenza di studi su tossicità riproduttiva e dello sviluppo
- Assenza studi nell'uomo
- Possibile meccanismo genotossico
- Potenziale cancerogeno nell'uomo 2B



Furano: tossicità considerazioni

- Manifestazioni cliniche osservabili sui topi: 15 mg/kg peso
- Patate dolci: 100 ppb
- Adulto di 70 kg → intake giornaliero di oltre 10 tonnellate di patate!
- Assoluta mancanza di dati per l'uomo

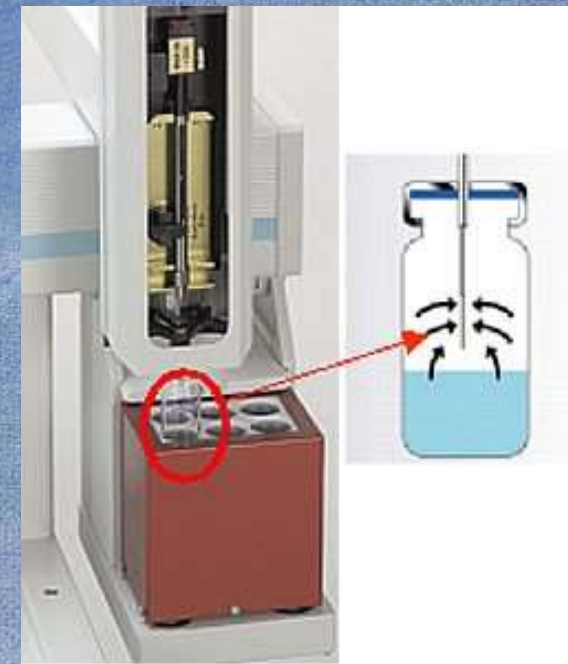


Furano

Analisi

FDA: determinazione quali-quantitativa GC-MS metodo *headspace* (permesso FID, no HPLC).

- provetta ermeticamente chiusa, 80°C per almeno 30 minuti.
- adsorbimento via ago con fibra di polidimetilsilossano
- desorbimento in camera di iniezione del GC
- separazione in 30 minuti con gradiente lineare fino a 225 °C



Conclusioni

In sintesi:

- ... ancora tanti illustri sconosciuti
- Tecniche analitiche non sensibili
- Assenza di studi su tossicità cronica
- Forte esposizione

Come difenderci?

- Evitare cibi troppo sofisticati
- Variare

