ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA PUGLIA E DELLA BASILICATA

BANDO RICERCA FINALIZZATA 2013 - Progetto Giovani Ricercatori: "*DEVELOPMENT OF INNOVATIVE ANALYTICAL METHODS FOR MEAT PRODUCTS SAFETY AND QUALITY ASSURANCE*"

Codice Progetto: GR-2013-02358862

SINTESI

Il Documento n. 240, pubblicato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro nel 2015, ha classificato le carni rosse nel Gruppo 2A, ovvero come "probabili cancerogene per l'uomo", sulla base della limitata evidenza nell'induzione di cancro nell'uomo, ma comprovata evidenza meccanicistica a supporto di tale induzione. Le carni processate, invece, sono state classificate nel Gruppo 1A, ovvero come "sicure cancerogene per l'uomo", in quanto vi è sufficiente evidenza che il consumo di carni processate può causare il cancro del colon-retto.

Tuttavia, il consumo di carni, soprattutto quelle avicole, è in costante aumento, in particolare nei paesi in via di sviluppo.

Il Progetto "Development of Innovative analytical methods for meat products safety and quality assurance" (MPSQA) ha avuto dunque l'obiettivo di approfondire alcuni importanti aspetti relativi alla sicurezza ed alla qualità dei prodotti a base di carne.

I tre centri di ricerca coinvolti, gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali di Puglia/Basilicata e della Lombardia/Emilia Romagna ed il Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente dell' Università degli Studi di Foggia, hanno messo a disposizione del Progetto le proprie specifiche abilità ed esperienze per sviluppare metodi analitici innovativi, più efficienti rispetto a quelli attualmente disponibili, per l'identificazione di carni meccanicamente separate (CSM) e la determinazione di nitrosammine e di additivi alimentari (coloranti) nei prodotti carnei. Dunque, il Progetto si è sviluppato seguendo questi tre filoni di ricerca.

Linea di ricerca 1): Metodi innovativi per l'individuazione di CSM: il progetto ha permesso di sviluppare complessivamente 6 metodi alternativi: 1) Determinazione ICP/MS di 43 elementi in

traccia ed analisi multivariata; 2) Determinazione di 4 parametri chimici (^{90}Sr, ^{88}Sr, Ca e ceneri) ed analisi multivariata; 3) Analisi in risonanza elettronica di spin dopo irraggiamento del campione; 4) Analisi TXRF dopo opportuna preparazione del campione; 5) Determinazione di Ca e Mg mediante cromatografia ionica; 6) Osservazione al microscopio ottico di preparati secondo due procedure alternative. La prima tra tutte le tecniche elencate è risultata assolutamente precisa ed attendibile per questo tipo di identificazione. Le altre cinque tecniche elencate sono molto utili quali metodi di screening.

Linea di ricerca 2): Metodi innovativi per la determinazione di nitrosammine nei prodotti carnei: il progetto ha permesso di sviluppare due metodi alternativi: 1) Determinazione di 6 nitrosammine mediante SPME-GC-NCD; 2) determinazione di 10 nitrosammine mediante SPE-HPLC-UV/DAD. Tra i due metodi, il primo è stato giudicato più performante in quanto consente le determinazioni delle nitrosammine a livelli molto bassi (nell'ordine dei pochi ppb) ed è molto selettivo. Questo metodo è stato impiegato per valutare sia i tipi di prodotto a base di carne che la specifica tecnica di cottura che possono causare il maggiore sviluppo di nitrosammine. Tale indagine ha consentito di concludere che la cottura su piastra può causare un aumento di composti tossici nel prodotto, in particolare, la comparsa di NDBA, l' aumento dei nitrati, nonché la scarsa diminuzione dei nitriti se paragonata alle altre tecniche di cottura. Inoltre, è stato effettuato uno studio sulla risposta amperometrica delle nitrosammine. Tale studio ha permesso di concludere che la rivelazione amperometrica pulsata in acido metansolfonico e rivelazione a potenziale costante in soluzioni acquose tamponate in miscela con solventi organici mostra ottime potenzialità per lo sviluppo di una ulteriore specifica tecnica di analisi mediante cromatografia ionica.

Linea di ricerca 3): Metodo multianalita per la determinazione di coloranti rossi nei prodotti carnei/monitoraggio: è stato sviluppato, ottimizzato e validato un nuovo metodo analitico mediante HPLC-UV-DAD per la determinazione di 12 coloranti (autorizzati e non) nei prodotti carnei. I coloranti studiati sono stati: Amaranth S, Ponceau 4R, Carmine, Ponceau SX, Ponceau 3R, Allura Red AC, Carmoisine, Erythrosine, Sudan I, Sudan II, Sudan III e Sudan IV. Il metodo è stato anche accoppiato alla tecnica MEPS, ottenendo un significativo aumento della sensibilità di risposta. Questo metodo, totalmente validato in accordo con quanto richiesto dalle normative comunitarie in materia di convalida dei metodi chimici di analisi, è stato impiegato per monitorare l'impiego di tali additivi nelle preparazioni di carni fresche e nei prodotti carnei. 130 campioni (65 preparazioni di carni fresche e 65 prodotti carnei) sono stati analizzati. Ponceau 4R e Carmine sono stati gli unici coloranti identificati nel corso del monitoraggio. Ad eccezione di un campione di salame, tali additivi erano regolarmente indicati in etichetta e le loro concentrazioni rientravano nei rispettivi limiti di legge. Il Carmine è stato quantificato in 3 campioni di preparazioni di carni fresche (nei quali l'impiego di

coloranti non è consentito dall'attuale normativa). Per quanto concerne la valutazione del rischio associato, l'apporto giornaliero risulta inferiore all'1% della DGA per entrambi i coloranti.

Metodi analitici sviluppati grazie al progetto "MPSQA"

- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante determinazione ICP/MS di 43 elementi in traccia ed analisi multivariata (validato);
- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante determinazione di 4 parametri chimici (^{90}Sr, ^{88}Sr, Ca e ceneri) ed analisi multivariata;
- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante irraggiamento del campione e successiva analisi in risonanza elettronica di spin (validato);
- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante analisi di diffrazione totale ai raggi X;
- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante determinazione di Ca e Mg mediante cromatografia ionica con rivelazione conduttimetrica (validato);
- Metodo per l'identificazione di carne separata meccanicamente mediante doppia procedura di preparazione del campione ed osservazione al microscopio ottico;
- Metodo multianalita per la determinazione di 6 nitrosammine nelle carni mediante microestrazione in fase solida ed analisi gascromatografica con rivelazione a chemiluminescenza di azoto;
- Metodo multianalita per la determinazione di 10 nitrosammine nelle carni mediante estrazione in fase solida ed analisi HPLC con rivelazione UV/DAD (validato);
- Metodo multianalita per la determinazione di 12 coloranti nei prodotti carnei mediante HPLC e rivelazione UV/DAD (validato).
- Metodo di pre-concentrazione MEPS per la determinazione di 8 coloranti mediante HPLC-UV-DAD.

Principali pubblicazioni scientifiche prodotte grazie al progetto "MPSQA"

- Marchesani G., Trotta G., De Felice P., Bortone N., Damiano R., Nicolini M., Accettulli R., Chiaravalle A.E., Iammarino M. (2021). Fast and sensitive radiochemical method for Sr-90 determination in food and feed by chromatographic extraction and liquid scintillation counting. Food Analytical Methods, accepted, *in press*.
- Mentana A., Palermo C., Iammarino M., Chiaravalle A.E., Centonze D. (2021). Electroanalytical characterisation of nitrosamines in different mobile phases as supporting electrolytes. Microchemical Journal, 171, 106885.
- Berardi G., Albenzio M., Marino R., Teresa D'Amore, Di Taranto A., Vita V., Iammarino M. (2021). Different use of nitrite and nitrate in meats: A survey on typical and commercial Italian products as a contribution to risk assessment. LWT, 150, 112004.
- D'Amore T., Di Taranto A., Berardi G., Vita V., Marchesani G., Chiaravalle A.E., Iammarino M. (2020). Sulfites in meat: Occurrence, activity, toxicity, regulation, and detection. A comprehensive review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety, 19, 2701-2720;

- Iammarino M., Haouet N., Di Taranto A., Berardi G., Benedetti F., Di Bella S., Chiaravalle A.E (2020). The analytical determination of polyphosphates in food: a point-to-point comparison between direct ion chromatography and indirect photometry. Food Chemistry, 325, 126937;
- Iammarino M. (2020). Recent advances in meat products quality & safety improvements and assurance: Editorial. International Journal of Food Science and Technology, 55, 917-918;
- Iammarino M., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E. (2020). Anion exchange polymeric sorbent coupled to high-performance liquid chromatography with UV diode array detection for the determination of ten N-nitrosamines in meat products: a validated approach. International Journal of Food Science and Technology, 55, 1097-1109;
- Iammarino M., Miedico O., Petrella A., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E. (2020). Innovative approaches for identifying a mechanically separated meat: evaluation of radiostrontium levels and development of a new tool of investigation.Journal of Food Science and Technology, 57(2), 484-494;
- Iammarino M., Mentana A., Centonze D., Palermo C., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E. (2020). Dye use in fresh meat preparations and meat products: a survey by a validated method based on HPLC-UV-diode array detection as a contribution to risk assessment. International Journal of Food Science and Technology, 55, 1126-1135;
- Tomaiuolo M., Chiaravalle A.E., Mangiacotti M., Petrella A., Di Taranto A., Iammarino M. (2019). Innovative techniques for identifying a mechanically separated meat: sample irradiation coupled to electronic spin resonance. European Food Research and Technology, 2019, 245(10), 2331-2341;
- D'Amore T., Di Taranto A., Vita V., Berardi G., Iammarino M. (2019). Development and Validation of an Analytical Method for Nitrite and Nitrate Determination in Meat Products by Capillary Ion Chromatography (CIC). Food Analytical Methods, 12(8), 1813-1822;
- Iammarino M., Mentana A., Centonze D., Palermo C., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E. (2019). Simultaneous determination of twelve dyes in meat products: Development and validation of an analytical method based on HPLC-UV-diode array detection. Food Chemistry, 285, 1-9;
- Iammarino M., Mentana A., Centonze D., Palermo C., Mangiacotti M., Chiaravalle A.E. (2019). Chromatographic determination of 12 dyes in meat products by HPLC-UV-DIODE array detection. MethodsX, 6, 856-861;
- Iammarino M., Miedico O., Fasanella A., Tarallo M., Chiaravalle A.E. (2019). An innovative analytical method by inductively coupled mass spectrometry for the identification and characterisation of equine meat. Italian Journal of Animal Science, 18 (Suppl.1), 195;
- Dalipi R., Berneri R., Curatolo M., Borgese L., Depero L.E., Sangiorgi E. (2018). Total reflection X-ray fluorescence used to distinguish mechanically separated from non-mechanically separated meat. Spectrochimica Acta Part B, 148, 16–22;
- Iammarino M., Di Taranto A., Centonze D. (2017). Determination of Sulphiting Agents in Raw and Processed Meat: Comparison Between a Modified Monier-Williams Method and the Direct Analysis by Ion Chromatography with Conductometric Detection. Food Analytical Methods, 10(12), 3956-3963;
- Iammarino M., Ientile A.R., Di Taranto A., (2017). Sulphur dioxide in meat products: 3-year control results of

an accredited Italian laboratory Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance, 10(2), 99-104;

- Iammarino M., Marino R., Albenzio M. (2017). How meaty? Detection and quantification of adulterants, foreign proteins and food additives in meat products. International Journal of Food Science and Technology, 52(4), 851-863 **(Invited Review)**;

- Miedico O., Iammarino M., Tarallo M., Chiaravalle A.E. (2017). Application of inductively coupled plasma–mass spectrometry for trace element characterisation of equine meats. International Journal of Food Properties, 20(12), 2888-2900.

Ulteriori 4 articoli scientifici, prodotti durante le attività del progetto "MPSQA", sono in fase di completamento e sottomissione per la pubblicazione su riviste internazionali.

Durante le attività del progetto, inoltre, il P.I. ha avuto modo di pubblicare, con specifici riferimenti al progetto "MPSQA", la Monografia dal titolo "*Simplified Guidelines for Chromatographic Methods Validation*" (LAP Lambert Academic Publishing) (pubblicata in 8 lingue), nonchè n.21 comunicazioni scientifiche, presentate nell'ambito di Congressi nazionali ed internazionali.

Si sottolinea, inoltre, che la metodica per la determinazione di solfiti nei prodotti carnei, sviluppata dal gruppo di ricerca, è attualmente al vaglio dell'UNI (Ente Italiano di Normazione) per il riconoscimento quale "Specifica tecnica" normata, e si auspica che lo stesso iter possa essere avviato al più presto anche per il metodo sviluppato per le determinazione dei coloranti nelle carni.

Lo Special Issue

La rete di collaborazioni instaurate durante il corso delle attività progettuali ha consentito al P.I. del progetto di proporre e seguire le attività di editorship, in collaborazione con la rivista internazionale International Journal of Food Science and Technology (Wiley), per uno Special Issue interamente dedicato al tema del Progetto "MPSQA". Il titolo dello Special Issue, pubblicato nel mese di marzo 2020, è stato "Recent advances in meat products quality & safety improvement and assurance". Lo Special Issue ha riunito 31 articoli scientifici firmati da ricercatori di 18 Paesi diversi, con tematiche che spaziano dalla formulazione di nuovi prodotti carnei mediante impiego di particolari ingredienti che li rendono più sicuri dal punto di vista igienico sanitario e nutrizionale, allo sviluppo di nuove tecniche di conservazione e stoccaggio, alla ottimizzazione di nuove tecniche analitiche per la tracciabilità dei prodotti e per la determinazione di additivi e contaminanti, ecc. Si evidenzia in particolare, tra tutti gli articoli, la review dal titolo "Red meat (beef and sheep) products for an ageing population: a review", firmata, tra gli altri, dall'Editor-in-Chief della prestigiosa rivista "Meat Science" (Elsevier), Prof. David Hopkins.

Il Principal Investigator

Dr. Marco Iammarino