IZS PB 05/21 RC

Sviluppo di una tecnica "user-friendly" per l'identificazione rapida di nitriti nel tonno e studi combinati di sicurezza alimentare

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Dr.ssa MARILENA MUSCARELLA

Relatore Convegno Ricerca e Territorio 2025 IZSPB: Dr.ssa Simona Summa

Il presente progetto di ricerca ha affrontato lo studio di una tematica emergente e molto importante per la sicurezza alimentare, ovvero i trattamenti illegali con nitriti delle carni di tonno rosso (*Thunnus thynnus*). Tali trattamenti sono volti a ripristinare e stabilizzare il colore rosso intenso proprio delle suddette specie anche dopo diversi giorni di conservazione. Si tratta tuttavia di azioni che potrebbero implicare notevoli rischi per la salute dei consumatori, vista la ben nota tossicità dei nitriti, a cui si aggiunge la possibile formazione di *N*-nitrosammine, sostanze pro-cancerogene dovute alla combinazione dei nitriti stessi con ammine secondarie. Inoltre, i prodotti così adulterati potrebbero nascondere uno stato di degradazione caratterizzato dalla possibile presenza di ammine biogene (in particolare istamina, sostanza in grado di provocare forti reazioni allergiche), e carica microbica elevata. Il progetto di ricerca ha dunque indagato l'evoluzione dei parametri chimico-microbiologici di campioni di tonno trattati con soluzioni a basi di nitrito al fine di alterarne le proprietà organolettiche e prolungarne illecitamente la shelf-life, producendo dati di interesse sanitario a tutela della salute dei consumatori.

Il lavoro ha previsto una fase iniziale relativa alla messa a punto di un protocollo sperimentale ottimizzato di simulazione del trattamento dei campioni di tonno rosso con soluzioni di nitriti, prendendo spunto dalla bibliografia disponibile sull'argomento [1], seguita dall'esecuzione delle analisi chimiche e microbiologiche sui suddetti campioni. In particolare, sono stati determinati i seguenti parametri chimici: istamina, azoto basico volatile, ammine biogene, nitriti/nitrati, acido ascorbico e solfiti; mentre per quanto concerne le analisi microbiologiche è stata effettuata la conta microbica totale a 30 °C, l'enumerazione di *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, Stafilococchi coagulasi-positivi, *Salmonella* ed *Escherichia coli*. Le determinazioni sono state eseguite sui campioni di tonno appena prelevati, e dunque non sottoposti ad alcun trattamento, confrontando poi i valori ottenuti con quelli acquisiti per i campioni sottoposti al trattamento con nitriti, dopo 5 giorni di conservazione in regime di refrigerazione a 4 °C. Il trattamento di simulazione standardizzato a cui si è giunti dopo aver testato diverse procedure prevede iniezioni multiple nel campione di una soluzione di composizione pari allo 0.4% (p/v) di $NaNO_2$ e 10% (p/v) di NaCl (Fig. 1).

Il progetto ha portato all'esecuzione di un totale di 186 determinazioni analitiche: 114 di tipo chimico e 72 analisi di tipo microbiologico, cui si sono aggiunte una serie di prove supplementari effettuate a seguito di contaminazione volontaria dei campioni con Salmonella e Morganella.



Fig. 1 – Campioni trattati come da protocollo definito dopo 5 gg di conservazione a 4 °C (trattato a sinistra, non trattato a destra)

I campioni di tonno fresco (*Thunnus thynnus*) sono stati forniti da rivenditori locali, e su tutti è stato preliminarmente dosato l'acido ascorbico e verificata l'assenza di agenti solfitanti. Tutte le determinazioni analitiche sono state condotte tramite procedure validate ed accreditate [2,3] o metodi di riferimento normati. La tabella 1 riporta, a titolo di esempio, i risultati ottenuti a seguito di uno dei quattro campionamenti effettuati complessivamente, relativamente alle determinazioni chimiche e microbiologiche di campioni di tonno rosso trattati con nitriti.

Dalla indagine è emerso che i campioni trattati con nitriti, sebbene dopo 5 giorni a 4 °C conservino caratteristiche visive simili al prodotto fresco, possono tuttavia essere caratterizzati da aumenti dei livelli di istamina, azoto basico volatile e carica microbica totale, in particolare anche fino a 24 volte per l'istamina, 20 volte per l'ABVT e 10 volte per la carica microbica totale. Per quanto concerne, tuttavia, l'aspetto della sicurezza alimentare, i valori in questione sono ancora abbondantemente all'interno dei range consentiti dai regolamenti europei, e perciò tali da non costituire un rischio per la salute dei consumatori. Le ripercussioni di carattere sanitario importanti riguardano, invece, proprio la persistenza nei campioni di residui di nitriti a concentrazioni elevate, e la conseguente possibile formazione di *N*-Nitrosammine, soprattutto in considerazione degli elevati livelli di ammine libere caratteristici di prodotti quali il tonno rosso.

Gli esperimenti condotti su prodotti contaminati volontariamente con *Salmonella* e *Morganella* (istaminogeno), non hanno ugualmente mostrato incrementi significativi sia

Determinazioni chimiche										
Nitriti residui = 152.1 mg/kg **Acido ascorbico = 290.8 mg/kg** **Solfiti = assenti**										
	Istamina mg/kg	**Nitriti mg/kg**	**Nitrati mg/kg**	**Trimetil ammina mg/kg**	**Cadaverina mg/kg**	**Putrescina mg/kg**	**Spermina mg/kg**	**Spermi-dina mg/kg**	**BAI Index**	**ABVT mg/100 g**
t_0 non trattato	**7.4**	**0**	**0**	**2.8**	**0**	**0**	**7.2**	**2.2**	**0.71**	**0**
t_0 trattato	**6.9**	**180.0**	**15.0**	**3.6**	**0**	**0**	**4.7**	**1.2**	**1.00**	**0**
t_{5gg} non trattato	**24.1**	**0**	**1.2**	**24.1**	**0**	**0**	**3.8**	**1.3**	**3.95**	**11.9**
t_{5gg} trattato	**10.4**	**152.1**	**76.0**	**2.4**	**0**	**0**	**5.1**	**1.8**	**1.32**	**10.9**
Determinazioni microbiologiche										
	Carica micro-bica totale	**Entero bacte-riaceae**	**Stafilo cocchi**	***Esche-richia Coli***	***Salmonella***	***Vibrio***				
t_0 non trattato	**> 10^3 ufc/g**	**> 10^3 ufc/g**	**< 10 ufc/g**	**assente**	**assente**	**assente**				
t_0 trattato	**> 10^3 ufc/g**	**> 10^2 ufc/g**	**< 10 ufc/g**	**assente**	**assente**	**assente**				
t_{5gg} non trattato	**> 10^5 ufc/g**	**> 10^4 ufc/g**	**< 10 ufc/g**	**assente**	**assente**	**assente**				
t_{5gg} trattato	**> 10^5 ufc/g**	**> 10^3 ufc/g**	**< 10 ufc/g**	**assente**	**assente**	**assente**				

Tabella 1 - Campionamento 1: determinazioni chimiche e microbiologiche

di contaminanti (in particolare istamina) che del patogeno e dell'istaminogeno in questione.

Per quanto concerne lo sviluppo del metodo basato sull'analisi di immagine per l'identificazione di campioni di tonno rosso trattati con nitriti, la valutazione dei dati ottenuti ha consentito di individuare correlazioni matematiche tra lo spettro dei campioni nel vicino infrarosso (N.I.R.) e il livello di nitriti presente nei campioni stessi, evidenziando particolari regioni del N.I.R. che potrebbero essere diagnostiche per i campioni trattati con nitriti (Fig. 2).

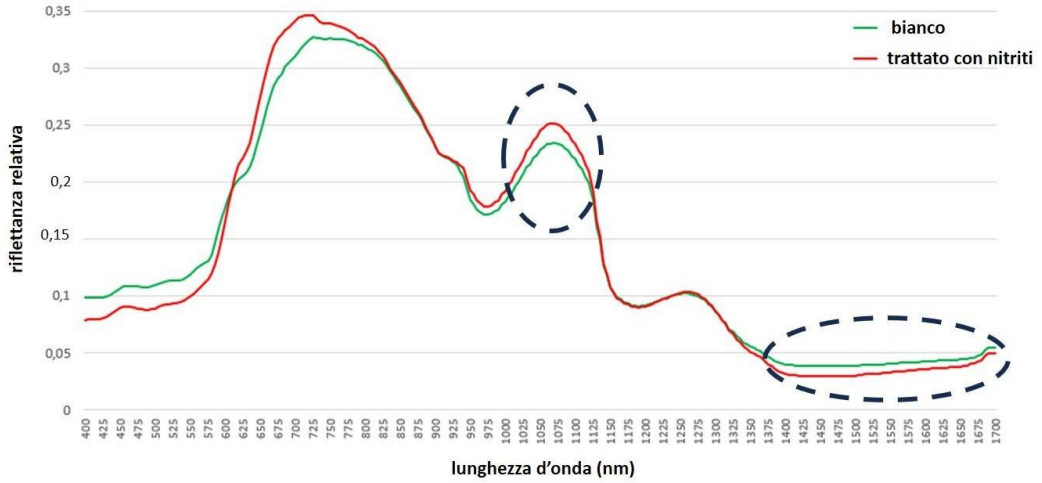


Fig. 2 – Spettri acquisiti su due campioni di tonno: trattato con NaCl 10% e nitriti 0.4% e non trattato

La natura non distruttiva di tale metodo induce a pensare che è possibile sviluppare un'apposita tecnologia «user-friendly», in grado di individuare i trattamenti fraudolenti direttamente in campo, cioè presso gli stessi stabilimenti di trasformazione dei prodotti, consentendo di bloccare repentinamente l'immissione sul mercato di partite sospette di tonno rosso, e scongiurando in tal modo tutti i problemi sanitari connessi nonché i danni economici per chi commercializza i suddetti prodotti. A tal fine, la fase finale del progetto è stata dedicata alla realizzazione di una sorta di validazione del metodo stesso, definendone in particolare i limiti di determinazione (LOD/CCβ) mediante confronto con le quantificazioni dei nitriti ottenute mediante cromatografia ionica con rivelazione conduttimetrica. Il metodo sviluppato mediante analisi di immagine si è dimostrato assolutamente affidabile per l'identificazione di campioni di tonno rosso trattati con nitriti, e le prove sperimentali ci hanno permesso di attestare che la tecnica è in grado di rilevare il trattamento illegale del tonno con soluzioni di nitriti fino ad una concentrazione pari a 50 mg/kg.

Riferimenti bibliografici

[1] Niederer M., Lang S., Roux B., Stebler T., Hohl C. (2019). Identification of nitrite treated tuna fish meat via the determination of nitrous oxide by head space-gas chromatography/mass spectrometry. F1000Research, 8, 711.

[2] Lo Magro S., Summa S., Iammarino M., D'Antini P., Marchesani G., Chiaravalle A. E., Muscarella M. (2020). A 5-years (2015-2019) control activity of an EU laboratory: contamination of histamine in fish products and expo-sure assessment. Appl. Sci., 10, 8693.

[3] Palermo C., Muscarella M., Nardiello D., Iammarino M., Centonze D. (2013). A multiresidual method based on ion-exchange chromatography with conductivity detection for the determination of biogenic amines in food and beverages. Anal. and Bioanal. Chem., 405(2-3), 1015-1023.

[4] Summa S., Iammarino M., Lo Magro S., D'Antini P., La Salandra G., Basanisi M.G. Nobili G., Berardi G., Langianese M.E., La Bella G., Muscarella M. (2025) Illegal Nitrite Treatment of Red Tuna and Prolonged Storage: What About Other Food Safety Risks? Appl. Sci., 15, 3975.