

DETERMINAZIONE DI OSSIDI DI COLESTEROLO IN ALICI (*ENGRAULIS ENCRASICOLUS*) TRATTATE CON UNA MISCELA COMMERCIALE DI ACIDO CITRICO, ACIDO TRISODICO E PEROSSIDO D'IDROGENO

Determination of cholesterol oxides in anchovies (Engraulis encrasicolus) treated with a commercial mixture of citric acid, trisodium acid and hydrogen peroxide

Marrone Raffaele^{1*}, Smaldone Giorgio¹, Palma Giuseppe², Romano Raffaele³, Bortone Domenico¹, Anastasio Aniello¹

*Corresponding author. Tel: (+39) 081 2536464; Fax: (+39) 081 458683. E-mail: raffaele.marrone@unina.it

¹Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli alimenti, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia.

²Federpesca, Roma, Italia.

³Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia.

ABSTRACT

A new additive formulation containing hydrogen peroxide, citric acid and trisodium acid is illegally used in fishery products due its whitening and antioxidant features. Aim of this study was to evaluate the possible presence of COPs and their role as markers of illegal treatment in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) stored at different temperatures. Sensory analysis was also performed by the specific QIM test. The quantitative determinations (%) of cholesterol oxides (COPs) showed changing amounts during storage. Not always The COPs measured in the treated samples were significantly higher than control samples. Considering the volatility of hydrogen peroxide and the poor repeatability of COPs analyses, as shown in the present study, it is crucial to intensify the control by the Authorities.

Keywords: Hydrogen peroxide, COPs, *Engraulis encrasicolus*.

INTRODUZIONE

L'esigenza di conservare gli alimenti è una necessità che da sempre contraddistingue la storia dell'uomo. Accanto ai classici metodi di conservazione l'industria alimentare utilizza additivi in grado di svolgere diverse funzioni negli alimenti, ivi compreso il miglioramento delle caratteristiche organolettiche. Nel comparto dei prodotti della pesca la qualità è strettamente connessa allo stato di freschezza, a sua volta correlata alla valutazione sensoriale dei caratteri organolettici. Per i prodotti ittici, in particolare, la freschezza rappresenta un requisito molto importante in quanto ne condiziona anche la valutazione di mercato. Frequenti sono pertanto frodi di vario tipo, tra le quali quelle che prevedono l'impiego di alcuni composti, di uso commerciale e non, in aggiunta ad additivi consentiti e/o a coadiuvanti, al fine di

intensificare o addirittura simulare i caratteri di freschezza. L'allungamento, anche solo di alcuni giorni, della shelf-life di un alimento così deperibile come il pesce, risulta utile sia per i produttori, che hanno la possibilità di razionalizzare l'aspetto logistico, sia per i distributori che possono gestire con maggiore tranquillità il prodotto nel punto vendita.

Tra i prodotti maggiormente utilizzati per prolungare la conservabilità dei prodotti ittici una problematica emergente è rappresentata da un additivo di recente formulazione, contenente perossido di idrogeno. L'industria degli additivi, al fine di ottimizzare le proprietà "brillantanti" e "sbiancanti" del perossido, ha messo a punto un prodotto in cui l'azione di questo composto è sinergizzata e potenziata da altri additivi. Il suo utilizzo, che conferisce un'apparente freschezza al pescato, costituisce una frode difficile da indivi-

duare nel prodotto trattato poiché, a contatto con l'acqua e il ghiaccio l'additivo evapora.

Questa miscela, avendo un potenziale potere ossidativo, potrebbe determinare l'induzione di fenomeni chimici a carico della componente grassa della matrice alimentare, colesterolo in particolare, con la formazione di ossidi del colesterolo (COPs). Diversi studi (Guardiola *et al.*, 1996; Gray *et al.*, 1996; Paniangvait *et al.*, 1995) hanno dimostrato il possibile ruolo di questi prodotti di ossidazione nella formazione delle placche aterosclerotiche e la loro potenziale tossicità. Alla luce del probabile utilizzo illecito della soluzione additivante contenente perossido di idrogeno, acido citrico e trisodio citrato, scopo di questo studio è stato quello di valutare la formazione di ossidi di colesterolo (COPs), quali markers di avvenuto trattamento, in alici (*Engraulis encrasicolus*) stoccate a differenti temperature.

MATERIALI E METODI

Campionamento e trattamento delle alici

Nel periodo compreso tra febbraio e maggio 2011, presso il laboratorio di ricerca sito al Mercato Ittico all'ingrosso di Pozzuoli (NA), sono state effettuate 3 sperimentazioni, ognuna utilizzando circa 5 Kg di alici (*Engraulis encrasicolus*) provenienti dall'areale di pesca prospiciente il golfo di Napoli. In ogni sperimentazione, a poche ore dalla pesca, sono state costituite 2 aliquote da 2,5 Kg. La prima aliquota (T) è stata immersa in una soluzione sperimentale composta da acqua e ghiaccio in scaglie, con un rapporto di 2:1, ad una concentrazione di soluzione additivante formata da perossido di idrogeno, acido citrico e citrato trisodico allo 0,7% seguendo le indicazioni della ditta produttrice. La seconda aliquota (C), di controllo, è stata immersa semplicemente in una soluzione 2:1 di acqua e ghiaccio in scaglie. Nella prima sperimentazione i due lotti sono stati conservati in frigorifero domestico per simulare le usuali pratiche di stoccaggio, a temperature oscillanti tra 4° e 5,8°C. Nella seconda e nella terza sperimentazione, invece, è stato utilizzato un frigorifero da laboratorio dotato di termografo e l'andamento della temperatura è stato monitorato mediante data logger. Le temperature massime rilevate sono state, rispettivamente, 3,1°C e 3°C.

Analisi chimiche

Le alici controllo e quelle trattate sono state analizzate contemporaneamente, con cadenza giornaliera, fino al 5° giorno dalla cattura per la valutazione delle caratteristiche organolettiche attraverso l'applicazione del QIM test specifico (Pons-Sanchez-Cascado *et al.*, 2006) e la determinazione della frazione lipidica secondo la metodica di Folch *et al.* (1957). Successivamente sui cam-

pioni di grasso è stata effettuata la determinazione qualitativa e quantitativa (%) di alcuni ossidi di colesterolo (COPs). In particolare sono stati ricercati, utilizzando la metodica di Menedez *et al.* (2008), i seguenti COPs:

1. 5,6 alfa-epossicolesterolo
2. 5,6 beta-epossicolesterolo
3. 25-idrossicolesterolo
4. 7 alfa-idrossicolesterolo
5. 7 beta-idrossicolesterolo
6. 19-idrossicolesterolo
7. 7-chetosterolo

RISULTATI

Analisi sensoriale

Nella prima sperimentazione le alici trattate hanno mostrato caratteri organolettici buoni fino al 5° giorno dalla cattura, presentando colore ancora abbastanza vivace e brillante, buona consistenza e odore e aroma gradevoli. Il giudizio delle alici controllo, invece, è variato in senso negativo già a partire dal 3° giorno in quanto l'odore risultava meno gradevole e si notavano una progressiva perdita della livrea dorsale caratteristica, un sbiadimento del colore generale nonché una perdita della consistenza delle carni. Nella seconda e nella terza sperimentazione, nel corso delle quali il regime di refrigerazione è stato continuamente controllato e impostato su temperature mai superiori a 3°C, al di là di un migliore aspetto della livrea non sembravano apprezzarsi differenze significative tra il controllo e l'aliquota trattata.

Determinazione degli ossidi di colesterolo

I risultati relativi alla determinazione dei COPs sono riportati nella Figura 1. Nella prima sperimentazione l'ossido 5,6-alfa-epossicolesterolo è stato rilevato nelle alici trattate al 4° e 5° giorno dalla cattura, con valori simili, mentre nelle alici controllo è stato evidenziato già a partire dal 3° giorno, con valori variabili in quelli successivi. Il 5,6-beta-epossicolesterolo, invece, sia nelle alici controllo che in quelle trattate, ha mostrato incrementi più consistenti solo a partire dal 4° giorno e non ha mai superato, rispettivamente, lo 0,0087% e lo 0,0047%. Il 25-idrossicolesterolo è stato rilevato, sia nelle alici trattate che in quelle controllo, soltanto nell'ultimo giorno di campionamento, con valori di 0,05% nelle prime e di 0,015% nelle seconde mentre il 7-coloesterolo è stato evidenziato solo nelle alici trattate al 4° e 5° giorno dalla cattura.

Nella seconda sperimentazione l'ossido 5,6-alfa-epossicolesterolo è stato rilevato, sia nelle alici trattate che in quelle controllo, a partire dal primo giorno di campionamento, con valori compresi rispettivamente tra 0,028 e 0,042 e tra 0,028 e 0,1%.

Anche il 5,6-beta-epossicolesterolo è stato riscontrato in ambedue i lotti e sin dal primo giorno ha mostrato discreti valori nelle due diverse aliquote durante tutta la sperimentazione. Nelle alici trattate il contenuto di è aumentato progressivamente fino al 5° giorno fino a raggiungere valori intorno allo 0,1%. Un andamento similare, ma con valori più contenuti, è stato riscontrato nelle alici controllo. Il 25-idrossicolesterolo non è stato evidenziato per tutta la durata della sperimentazione sia nelle alici trattate che in quelle di controllo.

Nella terza sperimentazione i valori del 5,6 alfa-epossicolesterolo sono progressivamente aumentati sia nell' aliquota controllo che in quella trattata fino ad arrivare a valori di 0,1% e di 0,08% rispettivamente. Il 5,6 beta-epossicolesterolo è stato rilevato solo nel lotto controllo, al primo giorno di analisi, con valori inferiori a 0,04%. Sia il 7-chetosterolo che il 25 OH-colesterolo non sono stati rilevati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dal punto di vista organolettico le alici trattate con la soluzione additivante, analizzate durante la prima sperimentazione, con una temperatura di stoccaggio compresa tra 4 e 5,8 °C, hanno mostrato maggiori differenze rispetto alle alici controllo, conservando pressoché inalterati i caratteri di freschezza per 2 giorni in più. Nelle successive sperimentazioni, in cui lo stoccaggio a regime di refrigerazione è risultato costantemente controllato, e a temperatura più bassa ($3\pm 1^\circ\text{C}$), le alici trattate hanno mantenuto caratteri organolettici ottimali solo per un giorno in più rispetto al controllo. Questo risultato potrebbe essere dovuto al differente comportamento e alla maggiore efficacia che il perossido di idrogeno mostra di possedere a temperature di stoccaggio più elevate. Dalle analisi condotte si evince che quantità variabili di ossidi di colesterolo sono state riscontrate nel corso di tutte le sperimentazioni, sia nelle alici controllo che in quelle trattate. Inoltre i COPs presenti nei campioni trattati non sempre sono risultati significativamente maggiori rispetto ai campioni controllo. Un ossido che potrebbe svolgere le funzioni di marker di avvenuto trattamento è il 7-chetosterolo, rinvenuto solo nelle alici trattate sia nella prima che nella terza sperimentazione. I livelli di quest'ossido sembrano comunque essere indipendenti dal giorno di conservazione: sia nella 1° che nella 3° sperimentazione sono risultati infatti più elevati al quarto giorno rispetto al quinto.

In accordo con recenti ricerche effettuate da autori spagnoli su cefalopodi, emerge l'estrema variabilità dei risultati (presenza di COPs in alici trattate e non) e la loro scarsa ripetibilità (alcuni COPs non sono stati rilevati costantemente nelle diverse sperimentazioni).

Dal punto di vista normativo la nota del Ministero

della Salute (DGSAN) num. 0013093 del 29/04/2010, avente come oggetto il divieto di utilizzo del perossido di idrogeno a contatto con il pesce destinato al consumo alimentare umano, ha ribadito il divieto di utilizzo come additivo alimentare del perossido di idrogeno, autorizzato soltanto come presidio medico chirurgico. La nota precisa che tale sostanza non può essere utilizzata né a contatto con il pesce fresco né mediante diluizione in soluzione acquosa. Diversa situazione si registra, invece, in Spagna dove il Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) nel 2011 ha ritenuto che, sulla base dei dati forniti da diversi studi relativi all'impiego di perossido di idrogeno come coadiuvante nella lavorazione di molluschi cefalopodi, non sussista alcun rischio per il consumatore, in virtù di un aumento non statisticamente significativo ($P \leq 0,05$) degli ossidi di colesterolo a seguito del trattamento. L'additivazione con perossido d'idrogeno potrebbe creare comunque problematiche negli scambi commerciali. Alla luce della volatilità del perossido di idrogeno, e considerata la scarsa ripetibilità dei risultati del nostro studio nell'evidenziare alcuni COPs quali potenziali markers di avvenuto trattamento, è indispensabile intensificare la vigilanza da parte delle autorità competenti, e migliorare l'informazione e la formazione sia degli operatori coinvolti nella filiera dei prodotti della pesca sia delle figure professionali responsabili dell'applicazione delle procedure di Controllo Qualità Aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Folch J., Less M., Stanley S.A. 1957. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497.
2. Gray J.I., Gomaa E.A., Buckley D.J. 1996. Oxidative quality and shelf life of meats. *Meat Sci.* 43:S111-S123.
3. Guardiola F., Codony R., Addis P.B., Rafecas M., Boatella J. 1996. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem. Toxicol.* 34:193-211.
4. Menendez-Carreno M., Garcia-Herreros C., Astiasaran I., Ansorena D. 2008. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. *J. Chromatogr. B* 864:61-68.
5. Paniangvait P., King A.J., Jones A.D., German B.G. 1995. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J. Food Sci.* 60:1159-1174.
6. Pons-Sanchez-Cascado S., Vidal-Carou M.C., Nunes M.L., Veciana-Nogues M.T. 2006. Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasiolus*) stored in ice. *Food Control* 17:564-569.

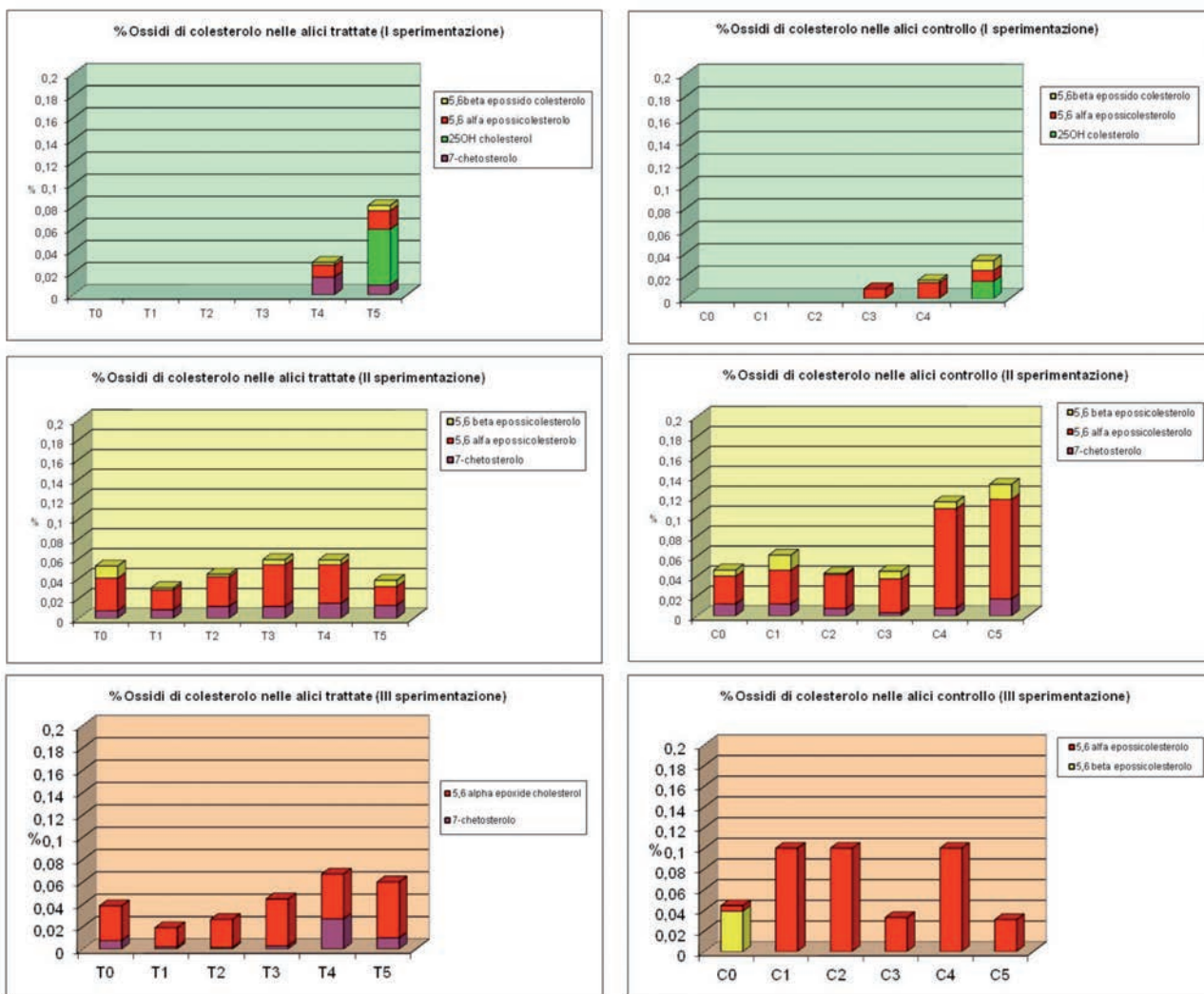


Figura 1. Andamento delle quantità di ossidi di colesterolo espresse in % nella I, II e III sperimentazione durante lo stoccaggio.