

INSERTO

lab

• **Origano, sfruttare i residui di pesticidi come marcatori di adulterazione**

66

• **Tossinfezioni e intossicazioni alimentari, punti critici nella filiera alimentare**

74



Origano, sfruttare i residui di pesticidi come marcatori di adulterazione

Gabriella Carcassola

DMV, PhD

L'origano rientra nel gruppo dei prodotti più a rischio di frode alimentare. Ma le piante utilizzate per "diluire" l'origano essiccato possono contaminarlo con residui di pesticidi ed aumentare così i rischi per la salute dei consumatori. Tuttavia, proprio i pattern di residui di pesticidi presenti nell'origano adulterato rispetto a quelli caratteristici dell'origano genuino potrebbero permettere l'individuazione dei campioni sospetti.

66

Erbe e spezie sono prodotti alimentari di alto valore e, negli ultimi decenni, il loro mercato è cresciuto considerevolmente, tanto che entro il 2019 potrebbe raggiungere un valore stimato di 16,6 miliardi di dollari. Ovviamente, la popolarità e il costo, nonché la complessità delle catene di approvvigionamento, espongono questi prodotti a un elevato rischio di adulterazione accidentale o intenzionale, come l'aggiunta di additivi artificiali, foglie di altre piante o di specie estranee.

Il genere *Origanum* comprende diverse specie di origine mediterranea e messicana. Tuttavia, in Europa, sono considerati "veri" origani solo alcune specie (*Origanum vulgare L.* ssp. *hirtum* e *Origanum onites L.*) e il

prodotto finale destinato al consumo deve sottostare a ben precise restrizioni in termini di impurità (materiali estranei non superiori al 2%). In altri mercati, invece, sono accettate le foglie di tutte le piante del genere *Origanum* e il prodotto deve rispettare le limitazioni specificate nelle norme ISO 7925 e ASTA (American Spice Trade Association).

ORIGANO ADULTERATO, LE ANALISI

L'origano adulterato è stato oggetto di numerosi studi in cui sono stati utilizzati altrettanti metodi per poterlo individuare. Per l'identificazione di adulteranti nell'origano

essiccato sono stati impiegati i marcatori SCAR (*Sequence-Characterized Amplified Region*)², mentre per individuare la presenza di foglie di ulivo quali adulteranti dell'origano macinato si è ricorso alla cromatografia liquida o alla gascromatografia associate alla spettrometria di massa (*Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS; *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS)³. Più recentemente è stato invece descritto un metodo basato sulla spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (*Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, FTIR) e sulla cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione (*Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry*, LC-HRMS). Questi studi hanno individuato, in qualità di adulteranti, foglie di ulivo, mirto, sommacco, cisto e nocciolo. E tali "impurità" di diversa origine, oltre a influire sulla qualità del prodotto finale, possono apportare pesticidi, alcuni dei quali, tra l'altro, potrebbero non essere registrati per il trattamento delle piante di origano, il tutto a discapito della sicurezza chimica del prodotto.

Il regolamento CE n. 396/2005⁴ e le successive modifiche stabiliscono livelli rigorosi per le concentrazioni di residui di pesticidi nelle erbe come l'origano, che nella maggior parte dei casi sono pari a 0,01 mg/kg se non sono stati fissati LMR (Livelli Massimi di Residui). Ciò nonostante, i dati relativi ai livelli di residui di antiparassitari nelle erbe sono scarsi, soprattutto per quanto riguarda l'origano, in quanto la complessità della matrice di tali prodotti, contenenti miscele di oli essenziali, fitosteroli, pigmenti e molte altre sostanze che interferiscono con le analisi cromatografiche, rappresenta ancora una sfida per molti laboratori.

Per ovviare a questi inconvenienti, sono state messe a punto diverse strategie di preparazione del campione, quali l'estrazione liquido-solido (*Liquid-Solid Extraction*, LSE), l'estrazione assistita con microonde (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE), la dispersione della matrice in fase solida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD), l'estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE) e la SPE dispersiva (dispersive SPE, dSPE). Nell'ultimo decennio, il metodo QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) è diventato il metodo di estrazione più frequentemente impiegato, associato alla GC-MS o alla LC-MS/MS⁵.

Alcuni dei metodi riportati, propongono l'analisi di più residui di pesticidi nel tè o nelle erbe medicinali, ma ancora oggi non è stato descritto alcun metodo analitico per il rilevamento simultaneo di più pesticidi in campioni di origano. Solo recentemente è

stato descritto il metodo LC-Orbitrap, in grado di identificare 199 pesticidi nelle spezie, ma l'origano non faceva parte della lista⁶.

Di particolare interesse, quindi, è uno studio⁷ in cui sono stati utilizzati metodi basati sulla spettrometria di massa (GC-MS/MS ed LC-MS/MS a triplo quadrupolo) che consentono l'individuazione di oltre 400 pesticidi nell'origano. Più in particolare, i ricercatori hanno studiato la differenza dei pattern dei residui di pesticidi presenti in campioni di origano genuino e di origano adulterato, ipotizzando che gli elementi vegetali "estranei" aggiunti all'origano possano apportare anche altri contaminanti. Quindi, conoscendo il pattern di pesticidi presenti in un determinato campione, potrebbe essere possibile individuare i campioni sospetti e proteggere così i consumatori non solo da possibili frodi ma anche da rischi per la salute.

LO STUDIO

Nel 2015 e nel 2016, sono stati raccolti in 16 Paesi in ogni parte del mondo campioni di origano essiccato di cui erano noti origine, produttore e dati di tracciabilità. Altri lotti di campioni sono stati acquistati on line da rivenditori di Paesi dell'Unione europea e non.

I 76 campioni dello studio sono stati prima analizzati con un approccio a due livelli mediante FTIR e LC-HRMS. Tali analisi hanno individuato 34 campioni adulterati, contenenti foglie di ulivo, mirto, nocciolo, cisto e sommaco. I restanti 42 si sono rivelati campioni di autentico origano.

I RISULTATI

Dalle analisi è emerso che in tutti i campioni di origano, adulterato o autentico, è stato individuato almeno un residuo di pesticida. Nella maggior parte dei casi (98,5%) erano presenti diversi residui e in 2 campioni, uno adulterato l'altro genuino, è stato individuato un cocktail di ben 16 sostanze.

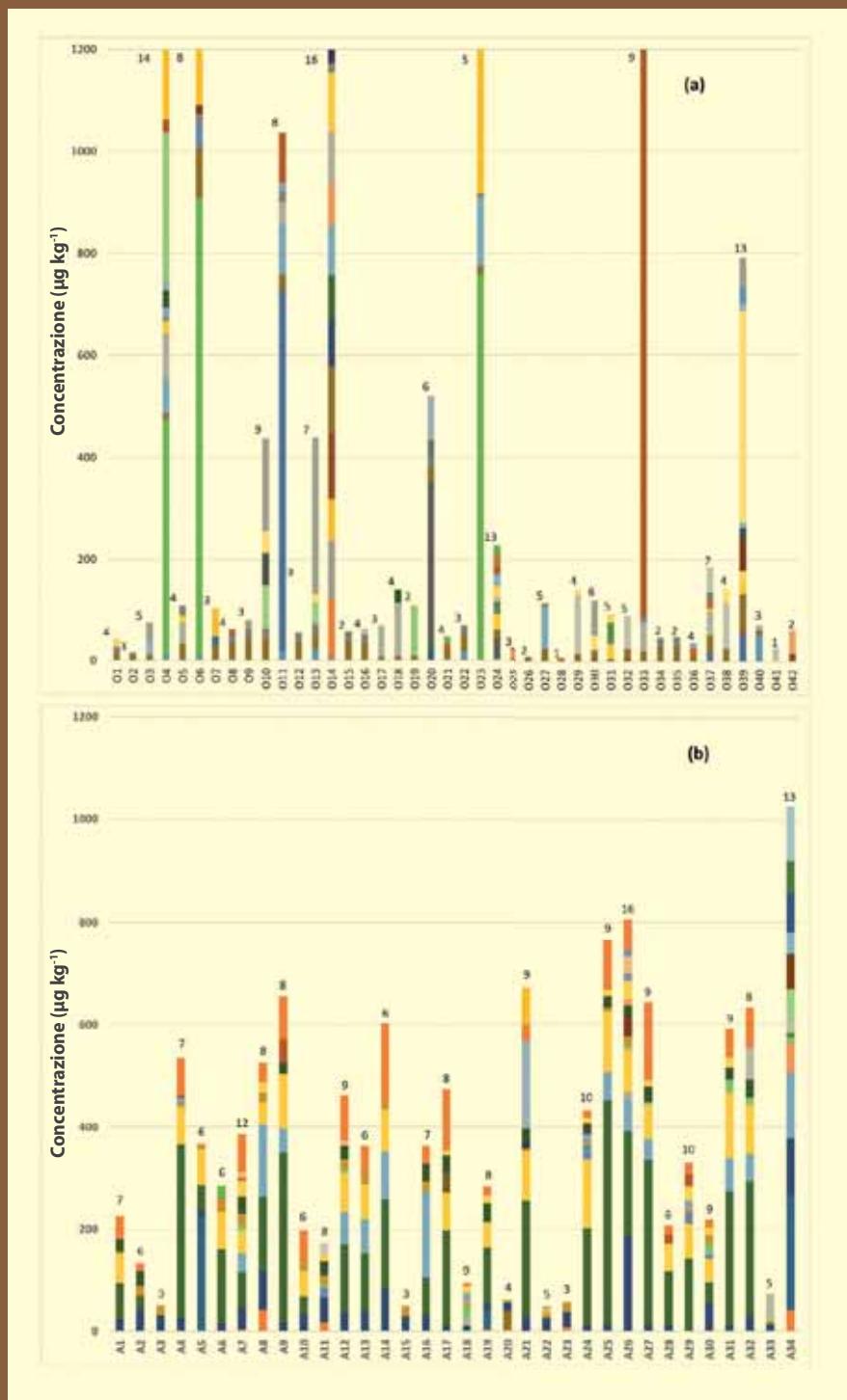
In totale, sono stati identificati 55 diversi pesticidi e i livelli sono risultati compresi tra 1 µg kg⁻¹ (acetamiprid, linuron) e 7.310 µg kg⁻¹ (tebuconazolo). Clorpirifos, difenilamina, acetamiprid, deltametrina, piriproxifene e cifultrin sono stati i pesticidi più frequentemente riscontrati nel 100, 71, 63, 40, 34 e 34% dei campioni, rispettivamente.

Origano autentico

Nei 42 campioni classificati come origano autentico sono stati individuati complessivamente 44 residui e

Figura 1

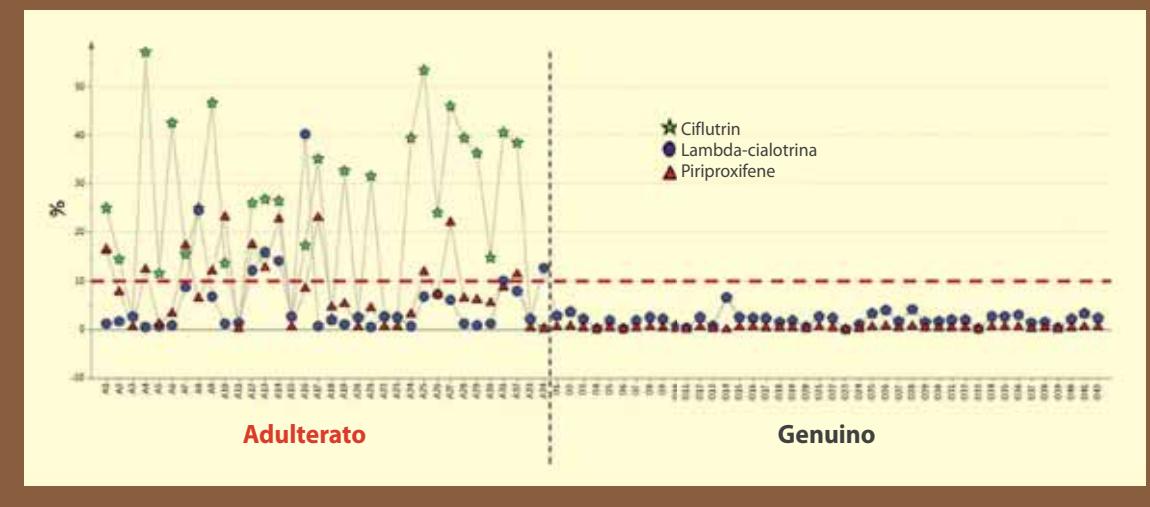
Numero di pesticidi contenuti nei campioni di origano autentico e adulterato



Campioni di origano autentico. b. Campioni di origano adulterato.

Figura 2

Concentrazione dei pesticidi individuati come marker di adulterazione



Nel grafico sono riportate le concentrazioni normalizzate: 100% è pari alla somma dei pesticidi individuati nel campione analizzato.

ciascuno di essi conteneva da 1 a 16 residui (figura 1a). Oltre all'onnipresente clorpirifos, rilevato in tutti gli organi analizzati a concentrazioni variabili da 4 a 131 $\mu\text{g kg}^{-1}$, sono stati riscontrati frequentemente anche residui di difenilammina e acetamipride (67 e 55%, rispettivamente), ma a basse concentrazioni, da 5 a 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e da 1 a 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, rispettivamente. È importante evidenziare che alcuni pesticidi, sebbene presenti solo in alcuni campioni, hanno fatto registrare concentrazioni molto elevate, a volte superiori anche agli LMR: tebuconazolo, carbendazim e clorotalonil. In 6 campioni è stato individuato anche il piperonil butossido (sinergizzante), a concentrazioni variabili da 5 a 1.730 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Origano adulterato

In tutti i campioni di origano adulterato sono stati riscontrati 3 o più pesticidi (da 6 a 16 residui nel 50% dei casi) (figura 1b). Analogamente al vero origano, il clorpirifos è risultato presente in tutti i campioni (4-187 $\mu\text{g kg}^{-1}$), mentre nel 77% di essi sono stati rilevati: acetamipride (1-43 $\mu\text{g kg}^{-1}$), difenilammina (5-23 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e piriproxifene (55-153

$\mu\text{g kg}^{-1}$). Quest'ultimo principio attivo, registrato come insetticida per gli ulivi, non è stato rilevato nei campioni di origano autentico. Ciflutrin, permefrina e deltametrina, dal canto loro, sono stati rilevati soprattutto nei campioni adulterati. Di questi, il ciflutrin ha superato gli LMR nel 44% dei casi.

Residui di pesticidi come marcatori di adulterazione

Come riportato in precedenza, lo studio descritto ha rilevato notevoli differenze tra i livelli di pesticidi



individuati nei due gruppi di campioni, cosa che potrebbe essere imputata ai trattamenti antiparassitari cui vengono sottoposte le specie vegetali utilizzate come adulteranti. Più in particolare, il numero medio di residui per campione è risultato più elevato per l'origano adulterato (7,5) rispetto all'origano autentico (5,1). Inoltre, mentre alcuni residui, quali acetamiprid, difenilammina e clorpirifos, non hanno fatto registrare particolari differenze tra i due gruppi di campioni, per la lambda-cialotrina, il ciflutrin, la permetrina e il metidation sono stati rilevati valori più elevati nell'origano adulterato. Infine, dalle analisi statistiche multivariate condotte, i ricercatori hanno concluso che qualsiasi campione di origano contenente più del 10% di lambda-cialotrina, ciflutrin o piriproxifene può essere considerato adulterato (*figura 2*).

TAKE HOME MESSAGES

- Nel set di 76 campioni di origano (34 adulterati, 42 genuini) sono stati individuati complessivamente 55 pesticidi.
- Nei campioni adulterati sono stati riscontrati un numero medio e concentrazioni medie di antiparassitari più elevati.
- Nei campioni adulterati quanto in quelli autentici sono stati riscontrati livelli simili di

clorpirifos, difenilammina e acetamiprid.

- Le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nell'origano adulterato per: tebuconazolo (7.310 µg kg⁻¹), piperonil butossido (1.730 µg kg⁻¹), carbendazim (9001 µg kg⁻¹) e boscalid (710 µg kg⁻¹).
- In 4 campioni genuini (10% circa) e in 15 adulterati (44%) la concentrazione rilevata dei residui di antiparassitari ha superato gli LMR.
- Il piriproxifene, il ciflutrin e la lambda-cialotrina sono stati identificati come i marker più indicativi di una possibile adulterazione.
- Il piriproxifene è stato riscontrato solo nei campioni adulterati.
- Uno screening dei residui di pesticidi nell'origano potrebbe essere non solo un metodo di controllo della sicurezza del prodotto ma anche uno strumento per identificare i campioni sospetti di adulterazione. Per la conferma dell'adulterazione si dovrebbero adottare approcci analitici complementari.
- Si dovrebbero condurre ulteriori studi e analisi al fine di espandere il database dei residui che si trovano comunemente in campioni di erbe e spezie autentici o adulterati. Ciò consentirà l'individuazione di solidi marcatori di adulterazione.



1. *ESA, European Spice Association. Quality minima document. www.esa-spices.org/index-esas.html/publications-esas*
2. *Marieschi M, Torelli A, Bianchi A, Bruni R. Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial mediterranean oregano. *Food Chem.*, 2011; 126:705-709.*
3. *Wielogorska E, Chevallier O, Black C, Galvin-King P, Delétre M, Kelleher CT, Haughey S.A, Elliott C.T. Development of a comprehensive analytical platform for the detection and quantitation of food fraud using a biomarker approach. The oregano adulteration case study. *Food Chem.*, 2018; 239:32-39. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.083.*
4. *Regolamento CE n. 396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005 concernente i livelli massimi di residui di antiparassitari nei o sui prodotti alimentari e mangimi di origine vegetale e animale e che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio.*
5. *Nantia E.A, Moreno-González D, Manfo F.P, Gámez-Gracia L, García-Campaña A.M. QuEChERS-based method for the determination of carbamate residues in aromatic herbs by UHPLC-MS/MS. *Food Chem.*, 2017; 216:334-41. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.038.*
6. *Goon A, Khan Z, Oulkar D, Shinde R, Gaikwad S, Banerjee K. A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2018;1532:105-111. doi: 10.1016/j.chroma.2017.11.066.*
7. *Drabova L, Alvarez-Rivera G, Suchanova M, Schusterova D, Pulkarbova J, Tomaniova M, Kocourek V, Chevallier O, Elliott C, Hajslava J. Food fraud in oregano: Pesticide residues as adulteration markers. *Food Chem.*, 2019; 276:726-734. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.143. (©Authors, www.creativecommons.org/licenses/by/4.0/).*