

# POLICLORODIBENZODIOSSINE (PCDD), POLICLORODIBENZOFURANI (PCDF), E POLICLOROBIFENILI DIOSSINO-SIMILI (DL-PCB) IN LATTE, MOZZARELLA, SIERO, E RICOTTA DI BUFALAE ALLEVATE IN CAMPANIA

## *POLYCHLORODIBENZODIOXINS (PCDDs), POLYCHLORODIBENZO- FURANS (PCDFs), AND DIOXIN-LIKE POLYCHLOROBIPHENYLS (DL- PCBs) IN MILK, MOZZARELLA CHEESE, WHEY, AND WHEY CHEESE FROM BUFFALOES RAISED IN THE CAMPANIA REGION*

Cortesi M. L.<sup>1</sup>, Chirollo C.<sup>1</sup>, Anastasio A.<sup>1</sup>, Sarnelli P.<sup>2</sup>, De Filippis S. P.<sup>3</sup>, Di Domenico A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti – Sezione di Ispezione degli Alimenti – Facoltà di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Napoli “Federico II”.

<sup>2</sup>Settore Veterinario Regione Campania – Napoli.

<sup>3</sup>Istituto Superiore di Sanità, Reparto Chimica Tossicologica – Roma.

### SUMMARY

Dioxins (PCDDs and PCDFs) and PCBs are a group of and toxic organochlorinated chemicals comprising hundreds of structurally related compounds (congeners) classified as persistent organic pollutants (POPs). It is acknowledged that 17 PCDD and PCDF congeners are of major concern due to their toxicity; 12 PCB congeners are also recognized to express dioxin-like toxicity and are thereby identified as DL-PCBs. Due to their high persistence and lipophilic nature, dioxins and PCBs tend to accumulate in fat and their bio-accumulation through the food chain may pose the risk of causing adverse effects to human health. For the general population, dietary intake is the most important pathway of exposure to the aforesaid environmental contaminants: meat, milk and dairy products, and fish and other seafood products contribute to total daily intake for more than 90 %. To prevent excessive human exposure to dioxins and DL-PCBs, the European Commission established maximum levels for dioxins and the sum of dioxins and DL-PCBs in an array of food components mainly of animal origin (Regulation EC 1881/2006). In this study, dioxins and DL-PCB concentrations were measured in buffalo milk collected from three impounded Campania farms producing milk with different contamination levels. The fate of contaminants in mozzarella cheese, whey, and whey cheese was also investigated. Analyses were carried out by HRGC-HRMS using US EPA Method 1613. The results of this study show the carry-over of the contamination from milk to its dairy products.

### KEYWORDS

PCDDs, PCDFs, DL-PCBs, buffalo milk, mozzarella cheese, whey, whey cheese.

### INTRODUZIONE

Le policlorodibenzodiossine (PCDD), i policlorodibenzofurani (PCDF), e i policlorobifenili (PCB) sono contaminanti organici persistenti (POP) di origine antropogenica, dotati di notevole stabilità chimica ed elevata lipofilità, ca-

ratteristiche che ne favoriscono il bioaccumulo e la biomagnificazione nella rete trofica. Tra le PCDD e i PCDF, il congenere più tossico è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD), inclusa dalla IARC nel Gruppo 1 della lista dei cancerogeni umani (1,2,3). L'alimentazione costituisce la principale via d'esposizione a PCDD,

PCDF, e PCB soprattutto tramite gli alimenti d'origine animale quali latte e derivati, carne, e prodotti ittici, che contribuiscono per oltre il 90 % all'esposizione complessiva. Studi sperimentali su animali con i composti predetti hanno evidenziato effetti tossici per il fegato, il sangue, la pelle e i sistemi nervoso, endocrino, immunitario, e riproduttivo (4,5,6,7). Rash cutanei e gravi forme di cloracne sono stati documentati negli esseri umani in seguito all'esposizione a dosi relativamente elevate (8). Alcuni effetti di PCDD, PCDF, e PCB per gli esseri umani non sono ancora ben compresi. Le concentrazioni cumulative di diossine (PCDD e PCDF) e DL-PCB (PCB diossino-simili, un sottogruppo dei PCB con proprietà tossiche assimilabili a quelle delle diossine) sono espresse in "equivalenti di tossicità" (TEQ), utilizzando specifici fattori di equivalenza di tossicità (TEF) relativi alla potenza tossica della TCDD, il congenere ritenuto più pericoloso (TEF = 1). Nel 2006 è stato emanato il Regolamento CE 1881, che fissa nel latte limiti massimi di diossine pari a 3 pgWHO-TEQ/g di grasso e di diossine e DL-PCB insieme pari a 6 pgWHO-TEQ/g di grasso (9), ove i valori cumulativi TEQ sono calcolati con il sistema TEF del 1997 della World Health Organization. La Regione Campania ha attraversato negli ultimi anni varie situazioni d'emergenza, a seguito del riscontro nel latte di valori TEQ superiori ai livelli massimi stabiliti a livello comunitario. Scopo del presente studio è stato quello di determinare le concentrazioni di diossine e DL-PCB nel latte di massa di tre aziende bufaline — poste da tempo sotto sequestro dalle autorità competenti a seguito del rinvenimento di concentrazioni TEQ superiori ai limiti di legge — e di verificare i corrispondenti livelli in mozzarella, siero, e ricotta.

## MATERIALI E METODI

Il latte utilizzato per le sperimentazioni è stato prelevato, nel periodo settembre-novembre 2008, in tre allevamenti bufalini della provincia di Caserta, scelti sulla base delle positività riscontrate nel corso dell'ultimo campionamento ufficiale, in quanto suddivisibili in 3 categorie: A) con livelli molto superiori al limite di legge [ $>30$  pg/WHO TEQ/g di grasso]; B) con livelli abbastanza superiori al limite di legge [ $>20$  pg/WHO TEQ/g di grasso]; C) con livelli di poco superiori al limite di legge [ $>7-8$  pg/WHO TEQ/g di grasso]. Dopo la mungitura mattutina, il latte di massa di ciascuna azienda è stato immediatamente trasferito presso uno stabilimento riconosciuto, dove è avvenuta la trasformazione, secondo le tecniche tradizionali in uso nel caseificio, utilizzando attrezzature fornite ad hoc. Il latte è stato pesato e sono stati misu-

rati la temperatura, il pH e l'SH. Sono stati di seguito aggiunti quantitativi adeguati di sierofermento, il caglio liquido, previo riscaldamento del latte a 38-40°C, e, dopo aver registrato il tempo di presa, sono state eseguite la rottura a croce, la rottura della cagliata e, raggiunto il necessario grado di acidificazione naturale, si è proceduto alla lavorazione della mozzarella. Il siero è stato utilizzato successivamente per la produzione della ricotta che, per problemi tecnici, non è stato possibile ottenere nel corso del terzo campionamento. Concluse le operazioni nel primo pomeriggio, i campioni di latte, siero, ricotta e mozzarella sono stati trasportati presso la Sezione di Ispezione e congelati a -25°C. Sono stati ricercati i 17 congeneri di PCDDs e PCDFs e i 12 congeneri di DL-PCBs (espressi in pg/WHO TEQ/g di grasso). Le analisi sono state effettuate presso l'Istituto Superiore di Sanità mediante gas-cromatografo ad alta risoluzione accoppiato a spettrometro di massa ad alta risoluzione (HRGC / HRMS), utilizzando il metodo US -EPA n. 1613 rev. B (10).

## RISULTATI

Azienda A: da 60 kg di latte, con una percentuale di grasso del 5,36% (Tab.1), si sono ottenuti 9,3kg di mozzarella e 700 g di ricotta, con valori di grasso rispettivamente del 27,99% e 34,45%. Le concentrazioni rilevate di PCDDs/PCDFs e DL-PCBs sono state pari a 39,73 pg/g di grasso nel latte di massa; 45,78 pg/g nella mozzarella; 45,2 pg/g nel siero di latte; 34,95 pg/g nella ricotta (Fig.1). Le diossine e i furani hanno inciso in maniera considerevole sulle diossine totali, rispetto ai DL-PCBs, attestandosi intorno al 75% nel latte di massa e nella mozzarella e raggiungendo anche l'80% nel siero e nella ricotta.

Azienda B: da 50 kg di latte, con una percentuale di grasso del 7,05% (Tab.1), si sono ottenuti 9,4 Kg di mozzarella e 500g di ricotta, con percentuali di grasso rispettivamente del 33% e 28,8%. Le concentrazioni rilevate di PCDDs/F e DL-PCBs sono state pari a 22,23 pg WHO-TE/g di grasso nel latte; 25,24 pg/g nella mozzarella; 21,80 pg/g nel siero di latte; 16,80 pg/g nella ricotta (Fig.1). Le diossine e i furani hanno inciso, rispetto ai DL-PCBs, per il 71-74-73% nel latte, nel siero e nella ricotta e per il 66% nella mozzarella.

Azienda C: da 35 kg di latte, con una percentuale di grasso del 7,97 % (Tab.1), si sono ottenuti 9,6 kg di mozzarella, con valori di grasso del 27,99%. Le concentrazioni di diossine, furani e DL-PCBs sono state pari a 22,70 pg/g di grasso nel latte di massa; 31,29 pg/g nella mozzarella; 27,10 pg/g nel siero di latte (Fig.1). Le diossine e i furani, in rapporto ai DL-PCBs, hanno contribuito per il 53%, il 59% e il 66%, rispettivamente

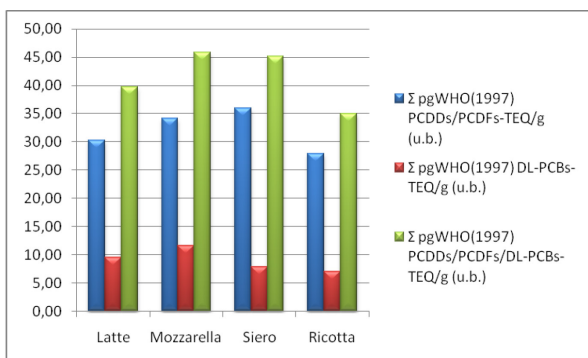
te nel latte, nella mozzarella e nel siero.

**Tabella 1.** Percentuali di grasso in latte, mozzarella, siero e ricotta di bufala.

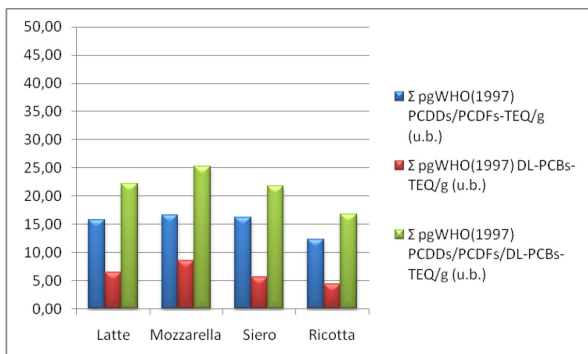
	Latte di massa	Mozzarella	Siero di latte	Ricotta
Azienda A	5,36	27,99	0,73	34,45
Azienda B	7,05	33,0	1,5	28,8
Azienda C	7,97	27,99	1,05	N.E.

**Figura 1.** Distribuzione di pcdds, pcdfs e dl-pcbs nel latte e relativi derivati.

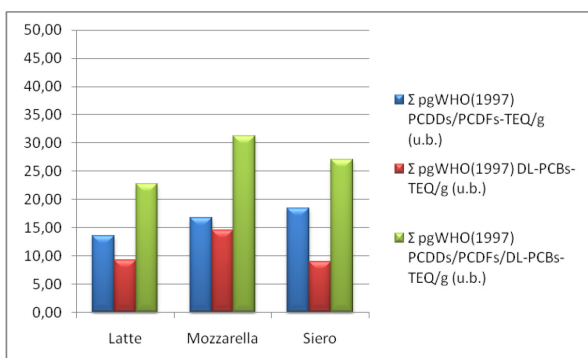
#### Azienda A



#### Azienda B



#### Azienda C



## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Il Regolamento CE 1881/2006, modificato da ul-

timo dal Regolamento 165/2010, stabilisce limiti massimi, in alcune tipologie di alimenti, per la somma di 17 congeneri di PCDDs e PCDFs e di 12 congeneri di DL-PCBs. Nel corso della presente indagine sono stati ricercati i livelli dei suddetti composti in latte di massa di aziende bufaline poste sotto sequestro ed in alcuni prodotti derivati. I risultati ottenuti, anche se limitati a tre aziende, appaiono di indubbio interesse, in quanto riferibili ad animali oggetto di contaminazione naturale e non sperimentale. E' proprio da attribuire a questa situazione il fatto che il latte dell'azienda C abbia evidenziato livelli di diossine superiori a quelli attesi, in relazione alle concentrazioni riscontrate nel corso dell'ultimo controllo ufficiale, per cui i risultati ottenuti sono di fatto tutti riferibili a latte con contaminazioni complessive notevolmente superiori ai limiti fissati. Il latte dell'azienda A ha presentato un tenore in grasso inferiore alla media (5,93%), molto probabilmente attribuibile alla scarsa attenzione all'alimentazione degli animali, considerato che l'azienda era da molto tempo sotto sequestro. Nel grasso presente nel latte e nei derivati sono state comunque rinvenute concentrazioni elevate dei contaminanti ricercati a testimoniare che la via lipidica costituisce il principale fattore di trasferimento. Anche nelle mozzarelle ottenute dal latte delle aziende B e C, che presentavano un tenore in grasso abbastanza vicino a quello mediamente rilevato nel latte di bufala, si è osservato un incremento delle concentrazioni complessive di diossine e DL-PCB /g di grasso, rispetto a quelle del latte di origine, più precisamente livelli di 25,24 e 31,29, rispetto alle concentrazioni di 22,23 e 22,7 dei due campioni di latte. Nel siero, prelevato dopo la caseificazione, si è riscontrato invece un incremento per le aziende A e C ed una leggera diminuzione per l'azienda B, anche se è da evidenziare che il siero dell'azienda A non può essere regolarmente valutato, in quanto presentava un tenore di grasso < 1% ed il Reg. 1881 specifica che il tenore massimo non è applicabile agli alimenti con un tenore di grasso < 1%. Concentrazioni rilevanti, anche se inferiori a quelle del latte impiegato, sono state osservate anche nei due campioni di ricotta. In riferimento ai tre gruppi di contaminanti ricercati risulta evidente che la frazione PCCD/F si è attestata, rispetto al valore cumulativo WHO-TE, in un intervallo compreso fra il 76% e l'80% nel latte e nei sottoprodotti dell'azienda A e fra il 53% e il 74% in quelli delle aziende B e C. I DL-PCBs hanno pertanto contribuito in modo significativo ai livelli di diossine totali. Dai dati ottenuti emerge complessivamente che i livelli di contaminazione restano abbastanza elevati sia nel formaggio sia nella ricotta, tali che, con-

sumando 150 g di mozzarella di bufala o 100 g di ricotta di bufala, anche una sola volta alla settimana, i quantitativi di diossine ingeriti oscillerebbero rispettivamente da 1249 a 1922 pg per la prima e da 483 a 1204 pg per la seconda, contribuendo quindi in maniera decisiva al raggiungimento e/o al superamento della dose settimanale tollerabile (Tolerable Weekly Intake = TWI), fissata, per un individuo di 70 kg, a 14 pgWHO-TE/kg p.v., ovvero a 980 pgWHO-TE per settimana. Ulteriore preoccupazione desta inoltre il fatto che questi alimenti sono consumati frequentemente da fasce di popolazioni a rischio, e soprattutto da giovani e bambini. Tuttavia, durante il monitoraggio effettuato a livello di caseifici nel 2008, in seguito all'emergenza "diossina" nella regione Campania (11), i livelli cumulativi di contaminazione riscontrati hanno superato solo nel 2 % dei 387 prelievi effettuati il pertinente limite massimo di legge, di 6 pgWHO-TE/g grasso, considerando l'incertezza estesa del 20%; questo in parte dovuto ad una possibile diluizione della contaminazione attraverso differenti conferimenti aziendali nel latte di massa. Solo in due caseifici, i livelli di contaminazione sono risultati comparabili a quelli osservati nel nostro studio. Ai fini della tutela della salute rivestono quindi particolare attenzione anche le abitudini alimentari, talora basate sull'autoconsumo e sul consumo continuato di prodotti aziendali, qualora questi derivino esclusivamente da allevamenti esposti alla contaminazione ambientale.

E' sperabile che l'attenzione posta, a livello nazionale ed internazionale, alla contaminazione da diossine negli alimenti, dovuta a cause diverse, ambientali e non, riduca il ripetersi di emergenze, purtroppo ancora segnalate, anche di recente, a seguito dell'utilizzo sconsiderato di materie prime non consentite per l'alimentazione degli animali da reddito. I piani di controllo ufficiali si sono dimostrati comunque validi per individuare prima e monitorare poi situazioni di non conformità e di conseguente rischio per il consumatore. La ricerca deve essere orientata anche verso metodiche di accertamento che permettano, qualora necessario, controlli più rapidi e meno costosi.

## BIBLIOGRAFIA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 69, *Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans*, 1997, Lyon, IARC
2. McGregor, D. B., Partensky, C., Wilbourn, J. and Rice, J. M. (1998). An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 106 Suppl. 2, 755-760.
3. Steenland, K., Bertazzi, P., Baccarelli, A., Kogevinas, M. (2004). Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environmental Health Perspectives* 112, 1265-1268.
4. Birnbaum, L.S., Tuomisto, J. (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Additives and Contaminants* 17, 275-288.
5. Vreugdenhil, H. J. I., Slijper, F. M. E., Mulder, P. G. H., Weisglas-Kuperus N. (2002). Effects of perinatal exposure to PCBs and dioxins on play behavior in Dutch children at school age. *Environmental Health Perspectives* 110, 593-598.
6. Mocarelli, P., Gerthoux, P. M., Ferrari, E., Patterson, D. G., Kieszak, S., Brambilla, P., et al. (2000). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet* 355, 1838-1839.
7. Ryan, J. J., Amirova, Z., Carrier, G. (2002). Sex ratios of children of Russian pesticide producers exposed to dioxin. *Environmental Health Perspectives* 110, 699-701.
8. Baccarelli, A., Pesatori, A. C., Consonni, D., Mocarelli, P., Patterson, D.G. Jr, Caporaso, N. E., Bertazzi, P. A., Landi, M. T. (2005). Health status and plasma dioxin levels in chloracne cases 20 years after the Seveso, Italy accident. *British Journal of Dermatology* 152 (3), 459-65.
9. Regolamento (CE) N. 1881/2006 della commissione del 19 dicembre 2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari.
10. US EPA (1994) Method 1613 rev. B: Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS
11. Borrello, S. et al. (2008) Management of the 2008 "Buffalo Milk Crisis" in the Campania Region under the Perspective of Consumer Protection. *Organohalogen Compounds*, 70, 891-2.

## RINGRAZIAMENTI

Ricerca eseguita con finanziamento della Regione Campania - progetto Se.Bio.Rec "Contaminanti organici persistenti nell'ambiente: studio di coorte sullo stato sanitario e sui livelli di accumulo nel latte materno in gruppi di popolazione a differente rischio di esposizione nella Regione Campania". Responsabili Scientifici dr. Alessandro di Domenico e dr.ssa Elena De Felip. Si ringraziano il dr. Giovanni Russo, per la

collaborazione negli allevamenti, il dr. Angelo Citro, per la trasformazione del latte in caseifi-

cio e il dr Gianfranco Brambilla per la parte editoriale.