

## I residui chimici negli alimenti

*Intervista a Gianluigi Cardinali, docente di microbiologia agroalimentare e ambientale alla facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Perugia*

Emanuela Traversini

Il rapporto 2011 di Legambiente *I pesticidi nel piatto* ha fornito una fotografia aggiornata sul problema dei residui chimici nei prodotti agro-alimentari, in particolare in quelli ortofrutticoli e nei prodotti derivati (vino, olio, pane, pasta, ecc). Per capirne meglio i risultati, abbiamo intervistato il professor Gianluigi Cardinali, docente di microbiologia agroalimentare e ambientale alla facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Perugia.

*A che punto è la ricerca in merito ai residui chimici sugli alimenti?*

La ricerca del singolo principio attivo attraverso l'analisi chimica ha diversi problemi: innanzitutto, normalmente la ricerca non trova un principio attivo, ma un endometabolita, cioè - per dirla con parole semplici - un composto derivato dal principio attivo, un composto che può essere stato trasformato dalla pianta oppure dalla pianta e dai microrganismi o, ancora, dai soli microrganismi. Se in un prodotto ortofrutticolo si cerca un principio attivo e non lo si trova, non è escluso che ci sia al suo posto un endometabolita, spesso sconosciuto. Può succedere quindi che l'analisi risulti negativa, ma che nel prodotto ci sia un composto derivato. Questo è il primo problema. Il secondo problema è questo: anche se si riesce a individuare un endometabolita nel prodotto, non è detto che se ne conosca l'effetto e, quindi, l'eventuale pericolosità; potrebbe essere anche più pericoloso del principio attivo che si stava cercando. È proprio quello che è successo in una ricerca sull'iprodione, un fungicida impiegato fino a qualche anno fa in viticoltura e frutticoltura. C'è poi un terzo problema a complicare le cose: in un prodotto agroalimentare le molecole non sono mai da sole, ma sono in combinazione. Se è noto di poche molecole qual è il loro effetto da sole, è noto di pochissime il loro effetto in combinazione. Il servizio sanitario ambientale inglese ha stimato che le possibili combinazioni di molecole siano alcune centinaia

di milioni, una mole assolutamente non rilevabile con i sistemi attuali. La conclusione è che l'analisi chimica resta preziosa, però, da sola, ha dei limiti abbastanza forti.

*Ci aiuti a capire meglio, parliamo di un esempio concreto: lei ha citato una ricerca sui residui del fungicida iprodione, quali sono state le evidenze sperimentali?*

In quel lavoro - fatto in collaborazione con il dipartimento di Chimica della facoltà di Agraria di Perugia - è stato impiegato eccezionalmente un lievito appartenente alla specie *Zygosaccharomyces rouxii*, perché in un saggio preliminare si era dimostrato che ceppi diversi di questa specie potevano essere sensibili o resistenti a questo principio attivo. In effetti la forma resistente era in grado di trasformare l'iprodione in tre sottoprodotti, due dei quali conosciuti e uno sconosciuto. Questi tre sottoprodotti erano la sintesi delle vie metaboliche di derivazione dell'iprodione già conosciute, effettuate da una parte dai batteri, da una parte dalle piante. Devo però precisare che si trattava di un sistema modello, che non è stato replicato perché costoso.

*Era stata presa in esame anche la tossicità dei tre sottoprodotti?*

In alcuni microorganismi la tossicità c'era, in altri era piuttosto bassa. Questo perché tutti i fungicidi hanno una variabilità specie-specifica o ceppo-specifica. Con l'iprodione abbiamo continuato a lavorare sul concetto generale di biosaggio tramite la rilevazione spettroscopica: o mediante la FT-IR (spettroscopia a infrarossi) o l'ultravioletto-visibile.

*L'iprodione è un fungicida che veniva utilizzato in viticoltura?*

È un fungicida di uso generale: ora è stato tolto dal mercato. In passato poteva essere usato anche illegalmente in post raccolta, in

barba a tutti i tempi di restrizione, e in quel caso veniva ingerito direttamente (nelle fragole, nell'uva, nel vino, nei passiti).

*Partendo dai risultati ottenuti con l'iprodione, quale sistema di analisi propone per valutare la tossicità di un prodotto?*

L'iprodione è stato un punto di partenza; una volta stabilita la procedura, a noi ricercatori interessa soprattutto arrivare a un concetto: attraverso la modifica abbastanza rapida - in un'ora, due ore al massimo - dei componenti cellulari, come del metaboloma (l'insieme di metaboliti prodotti da una cellula ndr), si è in grado di stabilire il tipo di stress e l'entità dello stress cui sono sottoposte le cellule. Per cui è possibile anche ricavare una scala percentuale con riferimento agli agenti stressanti conosciuti presi in considerazione. Ad esempio, prendiamo come riferimento l'ipoclorito di sodio: possiamo dire che un dato composto o miscela di composti o l'insieme di sostanze sconosciute presenti in un'acqua potabile ha un effetto stressante sulle cellule pari a una certa percentuale rispetto a quello dell'ipoclorito di sodio. Questa è una scala che, anche se arbitraria, è proporzionale allo stress indotto. Finora non è mai stata proposta, perché lo stress cellulare è stato sempre gestito in maniera qualitativa. Cioè, di fronte a uno stress ci si è sempre chiesti: di che tipo è, quali molecole interessa, quali sono i suoi meccanismi. Attualmente non conosciamo alcun sistema che riesca a quantificare lo stress. Questo è il problema più serio perché, senza una quantificazione, si pongono sullo stesso piano casi sostanzialmente trascurabili e casi pericolosi.

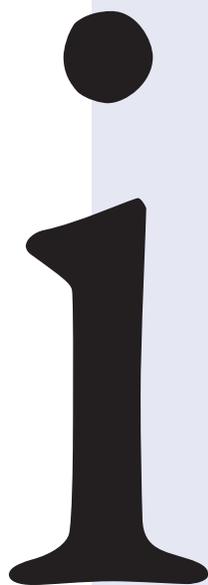
*In quali ambiti potrebbe essere applicato il sistema di cui parla?*

Sia in ambito ambientale, sia alimentare. Permetterebbe di superare il problema che adesso è insito in tutte le rivisitazioni, cioè il fatto che si consideri una concentrazione

di un certo composto come tossica o non tossica indipendentemente dall'organismo sottoposto a quella molecola. Facciamo un esempio: l'etilometro. La concentrazione di etanolo nel sangue può indicare un livello assolutamente tollerabile da una persona che abbia delle alcool-deidrogenasi attivissime, oppure può essere destabilizzante per una persona astemia; quella quantità di etanolo ha un significato statistico medio. Sarebbe più interessante, anziché dire quanto etanolo c'è nel sangue, valutare su una scala percentuale quanto sono rallentati i riflessi di una persona. Si passerebbe così da un test che controlla la quantità rilevabile di una sostanza stressante a un sistema che invece cerchi di definire quali sono gli effetti di tale sostanza. Perché quella stessa sostanza può avere effetto o non avere effetto, a seconda dell'individuo. Senza considerare poi che per molte sostanze è presente il fenomeno dell'ormesi: fino a una certa concentrazione hanno effetto benefico, da una certa concentrazione in poi hanno effetto nocivo. Si parla di un esperimento in Russia, discutibilissimo dal punto di vista bioetico, per effettuare il quale hanno lasciato un intero paese in case costruite con materiali riciclati da scorie radioattive. A quanto pare, il sistema immunitario di queste persone è stimolato da una presenza di radiazioni a basso livello. E non è una sorpresa, perché, per esempio, le correnti a bassa tensione stimolano l'attività microbiologica; quelle ad alta tensione uccidono i microrganismi. Lo stesso agente, sia esso fisico, chimico o biologico, può avere effetti diversi a seconda della concentrazione, dei cofattori che agiscono insieme ma soprattutto del target dell'organismo che lo subisce. E questo è il passaggio culturale che ci interessa: passare dalla ricerca di quali composti chimici ci sono in un determinato prodotto alla descrizione funzionale di che cosa fanno. In materia ambientale, conoscere l'effetto di un agente chimico, sia a livello di tossicologia, sia di variazione della composizione delle comunità ecologiche, è sicuramente un discorso più impegnativo, ma dovrebbe essere anche più promettente.

*E non ci si sta muovendo in questo senso?*

No, perché siamo vincolati a livello europeo da due macigni pazzeschi. Il primo è il sistema Audit, che è generalizzato e che chiaramente non funziona. Il "batterio killer", ad esempio, è passato impunemente attraverso uno dei sistemi Audit più sofisticati. Il sistema igienico sanitario della frutta e verdura in Europa è sicuramente efficiente, ma non funziona perché parte dal principio che sia possibile inferire la situazione finale di un prodotto - in questo caso alimentare - conoscendo tutti i passaggi, che per altro vengono dichiarati in forma cartacea. Il problema è che tutti i passaggi non sono conoscibili, molti sono anche accidentali. In più è un si-



stema molto costoso. Fare un'analisi in fondo alla catena, e quindi analizzare cosa c'è nel prodotto finale, sarebbe molto più veloce ed eviterebbe di conoscere tutto ciò che c'è stato a monte. Per cui anche l'eventuale dimenticanza, colposa ma non dolosa, o l'eventuale frode dolosa sarebbero scoperte. Questo è un problema culturale: l'Unione europea ha abbracciato filosoficamente il sistema Audit con risultati disastrosi. Prendiamo ad esempio il biologico: l'Italia, come tutti gli altri Paesi europei, è costretta a far entrare dei prodotti biologici dichiarati tali dagli enti paralleli, anche provenienti da Paesi del terzo mondo, i quali però non applicano le stesse regole all'ingresso dei loro prodotti. Per fare un esempio: noi potremmo dover dichiarare biologica la frutta e verdura libanese perché c'è un corridoio verde tra il Libano e l'Italia, ma nulla vieta al Libano di importare a basso costo quella frutta e verdura da un Paese come il Pakistan che non ha alcun tipo di controllo. E il nostro funzionario ministeriale sarebbe costretto a certificare che quella frutta e verdura è biologica perché qualcuno l'ha dichiarata tale. Con questo sistema risalire all'eventuale frode fatta chissà dove diventa praticamente impossibile. Questo è un problema culturale tipicamente europeo; negli Stati Uniti è molto meno marcato perché l'FDA usa alternativamente sia il sistema Audit sia il sistema di analisi terminale. C'è anche un altro problema molto radicato: si è convinti che sapere cosa c'è in un sistema permetta di conoscere qual è il sistema. È l'estrinsecazione, chimica se vogliamo, del riduzionismo, che ha imperato fino a qualche decennio fa. Noi sappiamo che questo non è vero: in nessun sistema biologico funziona così. Anche perché la nostra capacità di definire tutte le componenti è scarsissima. E non è detto che le componenti che conosciamo siano le più significative. A chi non conosce profondamente un sistema, la semplice analisi quantitativa non dice un granché. Il problema è che in materia ambientale ogni sistema è un attore a se stante, assolutamente difficile da riprodurre e da ritrovare: non si può avere di un sistema ambientale la stessa conoscenza che abbiamo della fisiologia umana. Quindi, mentre nella fisiologia umana, con molti limiti, certi valori sono conosciuti, applicare lo stesso metodo in un sistema ambientale è quanto meno pericoloso. I nostri limiti sono culturali, concettuali, prima ancora che tecnici, e sono difficilmente risolvibili, perché ancora abbiamo un sistema che è ampiamente riduzionista e determinista, due aspetti che nella scienza ambientale sono notoriamente sbagliati.



*Come dovrebbe essere valutata la tossicità di un composto, secondo lei?*

Ora le analisi tossicologiche sono estremamente lunghe e costose perché usano il sistema animale. Ad esempio si utilizza la DL50, la dose letale al 50% della popolazione, ottenendo dati molto precisi dal punto di vista dell'analisi statistica e numerica, ma con due inconvenienti: è un sistema molto costoso ed è politicamente molto impopolare perché applicato sugli animali; nell'ambito dell'Unione europea sono molti i movimenti, le associazioni che stanno facendo petizioni per abolire il sistema animale, non solo in tossicologia, ma addirittura in farmacologia. Nel momento in cui cadesse in farmacologia, dove l'interesse è abbastanza generalizzato, si può immaginare cosa succederebbe in tossicologia il giorno dopo. È assolutamente impossibile immaginare non solo che si estenda il modello animale ai circa 2/3 milioni di nuovi composti chimici prodotti ogni anno - al momento in commercio ci sono tra i 19/20 milioni di prodotti chimici - ma passare alle semplici miscele binarie (due composti) significherebbe elevare al quadrato quei 20 milioni, arrivando a 400 milioni di milioni. Con questi sistemi sarebbe assolutamente impensabile. A complicare le cose, nell'ambiente e negli alimenti non si trova mai una miscela binaria, ma miscele multiple di tantissime sostanze. Il nostro approccio pragmatico è diverso: a noi non interessa sapere che cosa c'è. Se poi l'analisi chimica è in grado di rilevarlo, benissimo, non abbiamo niente in contrario, anzi è di grande aiuto; quello che proponiamo, però, è valutare con il biosaggio una particolare miscela contenuta ad esempio in un'acqua di scarico, in un'acqua potabile, in un salame. Se la miscela attacca delle cellule eucarioti, quindi in qualche modo simili alle nostre (ma si potrebbero usare anche delle cellule umane in coltura) e produce uno stress significativo, allora qualunque sia la composizione della miscela, sappiamo che è dannosa. Ragionando in questo modo, si supera in un colpo solo tutto il problema delle miscele, perché sia se in un'acqua potabile c'è un solo composto sia se ce ne sono cento, nel momento in cui si fa il biosaggio si valuta quell'acqua potabile complessa come una soluzione unica. Con l'approccio chimico io dovrei fare un'analisi, quindi separare cento composti, verificare la tossicità o comunque avere conoscenza della tossicità di cento composti e poi, comunque, fermarmi, perché non potrei conoscere le sinergie tra i singoli composti. L'approccio

pragmatico con il biosaggio dovrebbe superare il problema delle miscele e, se non eliminare il modello animale (perché non è eliminabile con le conoscenze attuali), permettere di utilizzarlo in maniera più parsimoniosa. Non dimentichiamoci, infine, che il modello animale è un modello, perché l'uomo non è un topo. Non sempre quello che succede negli animali succede nell'uomo.

*Avrebbe più senso utilizzare le cellule umane?*

Secondo me sì. Una cosa che abbiamo visto, per esempio, è che usando nelle cellule di lievito e in quelle umane il metabisolfito di potassio come sistema modello si ottiene una risposta simile. Con un lavoro estensivo di questo tipo si potrebbero individuare le corrispondenze tra la reazione del lievito e la reazione a una determinata miscela di composti chimici delle cellule di vari organi e tessuti umani. Disponendo di questi dati e di sistemi di analisi dei dati che permettano una connessione immediata tra la reazione del lievito o di una batteria di lieviti o una batteria di cellule umane in coltura e di cellule umane dei diversi tessuti o organi, sarebbe possibile fare un'inferenza abbastanza precisa degli effetti complessivi della sostanza o di miscele di sostanze sulle cellule umane. Si tratterebbe di un unico esperimento rispetto agli  $n$ -quadro esperimenti dell'approccio tradizionale, dove  $n$  è il numero dei componenti della miscela.

*Ma un organismo è sottoposto a più miscele.*

Sì, però vi è sottoposto in un arco di tempo: se le miscele a cui è sottoposto sono compresenti, allora abbiamo una miscela di ordine superiore, ma pur sempre una miscela. Immaginiamo, ad esempio, un animale che beva acqua più o meno contemporaneamente da due pozze, una inquinata da una miscela A e l'altra da una miscela B. Se le bevute sono abbastanza ravvicinate, è sottoposto allo stress  $A + B$ . In questo caso non si farebbe altro che prendere la stessa quantità di A e di B, fare una supermiscela e analizzare quella. Se invece l'animale bevesse per un certo periodo di tempo la miscela A e poi passasse alla miscela B, le due miscele andrebbero analizzate separatamente perché agirebbero separatamente. A meno che non ci siano degli effetti cronici di lunghissimo periodo della miscela A, che poi si andrebbero a sommare a quelli della miscela B. Questo vale anche per l'uomo: se si mangia un prodotto che contiene particolari conservan-

ti tossici e si aggiunge un vino che contiene una quantità eccessiva di metabisolfito, l'organismo è sottoposto a una miscela di metabisolfito a cui si sommano tutte le diverse sostanze presenti all'interno dell'altro alimento. Pertanto vanno valutare tutte le miscele che agiscono in simultanea. Se invece agissero in tempi diversi, sarebbe logico considerare le miscele separatamente.

*Può spiegarci sinteticamente cos'è il biosaggio?*

Il biosaggio nella forma più schematica è un sistema di analisi che utilizza un sensore e un rivelatore. Come sensore abbiamo utilizzato quasi sempre dei lieviti, che accoppiano due caratteristiche fondamentali: la facilità di manipolazione dei microrganismi, di tutti i microrganismi, e il fatto di essere eucariotici, e quindi mimici per molte funzioni a quello che viene effettuato a livello fisiologico da piante, animali e dall'uomo stesso. Però il sensore può essere qualsiasi altra cosa: possono essere batteri, cellule vegetali, cellule umane, etc. Dal punto di vista tecnico, l'unica cosa richiesta è che siano cellule disgregate e che possano formare uno strato mono o oligocellulare. Il sistema rivelatore può essere qualsiasi sistema, noi ne abbiamo scelti due perché sono abbastanza ampi come capacità di lettura delle molecole: uno è la spettroscopia ad infrarossi FT-IR, che dà più informazioni di altre, riesce ad individuare le classi di molecole, ma non le singole molecole che possono essere implicate in questo fenomeno. L'altra, che è meno informativa ma che in certi casi permette di produrre dei *fingerprint* molto accurati, è la spettroscopia UV e visibile. Questi due sistemi analizzano ambiti dello spettro di frequenza ben distinti: è totalmente diversa la qualità, il tipo di strumento e il tipo di segnale. Alla fine quello che vien fuori è uno spettro di risposta, cioè la differenza fra le informazioni rilevate in tutto il range di frequenza dalle cellule sottoposte allo stress e le stesse informazioni rilevate sulle cellule sotto controllo, non sottoposte allo stress. Una volta che noi otteniamo uno stress di risposta, si passa all'analisi dei dati, sulla quale abbiamo scritto diversi software, già pubblicati, che ci permettono di valutare la qualità e la quantità dello stress.

