



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ED INNOVAZIONE
TECNOLOGICA

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Chimiche

***Determinazione del contenuto totale e dei
livelli di migrazione di
NIAS da poliuretano***

RELATRICE

Prof.ssa Valentina Gianotti

CANDIDATO

Andrea Castagnotto

Anno Accademico 2023 – 2024

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"A. AVOGADRO"

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	4
2. PARTE TEORICA.....	6
2.1. Gascromatografia.....	6
2.1.1. Strumentazione.....	6
2.1.2. Tecnica GC-MS.....	10
2.1.3. Volume di ritenzione.....	11
2.2. Analiti.....	13
2.2.1. 1,4-butandiolo.....	13
2.2.2. Anilina.....	14
2.2.3. 2,6-tertbutilidrossitoluene.....	15
2.2.4. Acetiltributilcitrato.....	16
2.2.5. Bis(2-etilesil)adipato.....	18
2.3. Normativa vigente.....	19
2.4. Studi di migrazione, meccanismi e stato dell' arte.....	22
3. MATERIALI E METODI.....	26
3.1. Standard, solventi, matrici alimentari.....	26
3.2. Strumentazione.....	26
3.3. Rette di taratura.....	27

3.4. Procedura per la prova di migrazione su simulante alimentare.....	28
3.5. Procedura per la prova di migrazione su matrici alimentari.....	29
3.6. Estrazione spinta della guarnizione.....	30
4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	31
4.1. Messa a punto del metodo.....	31
4.2. Prove di migrazione su simulante alimentare.....	32
4.3. Prove di migrazione su alimenti reali.....	33
4.4. Estrazione spinta del materiale.....	35
5. CONCLUSIONI.....	38
6. APPENDICE: RETTE DI TARATURA.....	39
7. BIBLIOGRAFIA.....	43

1. INTRODUZIONE

Diverse specie chimiche, quali additivi alimentari, residui di pesticidi, contaminanti ambientali, microtossine, etc., possono trovarsi, per mezzo di un'aggiunta intenzionale o accidentale, a contatto con il cibo durante le diverse fasi della lavorazione dei prodotti alimentari e, quindi, all'interno degli alimenti stessi.

I sistemi di imballaggio, o comunque tutti quei manufatti che risultano a contatto con i cibi, possono essere una possibile fonte di inquinanti all'interno degli alimenti, in seguito a processi di migrazione ed altri trasferimenti di massa che coinvolgono potenziali analiti contenuti. Tra questi figurano i NIAS (*Non Intentionally Added Substances*) che, nel caso di materiali polimerici, possono derivare dai processi di sintesi come monomeri e additivi oppure dalla formazione di prodotti di reazione e di degradazione durante la fabbricazione e/o l'uso degli oggetti. Il termine NIAS è stato introdotto per materiali plastici a contatto con alimenti, in contesto legale europeo¹.



Fig. 1: schema riassuntivo NIAS

Questi composti sono presenti nei materiali che entrano in contatto con gli alimenti e che, tuttavia, non sono stati aggiunti per una motivazione tecnica durante il processo di lavorazione; la loro migrazione è un fenomeno noto, ma resta, ciononostante, difficile individuarlo e controllarlo².

Per via del loro potenziale pericolo per la salute umana, il monitoraggio dell'esposizione dei consumatori a queste sostanze è diventato parte integrante della sicurezza dell'approvvigionamento alimentare. A livello europeo il contenuto di specie chimiche in contenitori o materiali, il cui utilizzo prevede contatto con degli alimenti, è disciplinato dal regolamento (UE) 2020/1245 della commissione del 2 settembre 2020 che modifica e rettifica il regolamento (UE) n. 10/2011.

Il progetto, svolto in collaborazione con la ditta TECNO CM, ha come obiettivo lo studio della migrazione specifica di cinque analiti: 2,6-tertbutilidrossitoluene, anilina, bis(2 etilesil) adipato, 1,4-butandiolo e acetiltributilcitrato contenuti in un materiale plastico di loro

produzione, impiegato come guarnizione a contatto con matrici alimentari, verso un simulante alimentare (Tenax) e sei diverse matrici alimentari (riso, farina, latte in polvere, cacao in polvere, zucchero, amido di mais).

Le specie chimiche in analisi hanno ottenuto dei risultati di non conformità in studi di migrazione specifica condotti su guarnizioni in poliuretano fabbricati dalla ditta. Tali studi sono stati condotti da un laboratorio di analisi esterno; tuttavia, le prove sono state condotte in condizioni molto lontane dal caso reale dell'azienda, impiegando un simulante liquido e con i risultati riportati a un volume diverso dalla realtà.

La guarnizione è stata progettata per essere posizionata in fondo a un silos ed operare in condizioni di mass-flow per movimentare mangime secco per animali senza avere demiscelazione, con una superficie di contatto molto inferiore a quanto considerato nelle prove effettuate. Per questo motivo, in progetti di tesi precedenti, sono state condotte prove in modo da simulare il più possibile il caso reale e ottimizzare un metodo conforme a questa casistica, in accordo con la normativa vigente.

Le prove sono quindi, state condotte da normativa con l'utilizzo del corretto simulante, indicato come simulante alimentare di tipo E (TENAX®), destinato per materiali che vengono a contatto con cibi secchi. Il volume considerato risulta essere l'eccezione prevista dal regolamento per contenitori molto grandi o molto piccoli, che prevede un rapporto superficie/volume pari a 6 dm² per kg di alimento a contatto.

L'obiettivo di questo progetto di tesi sarà di condurre delle analisi per identificare e quantificare gli analiti trasferiti dal manufatto plastico agli alimenti secondo le nozioni precedentemente apprese, e quindi con metodologie conformi al caso reale.

2. PARTE TEORICA

In questo capitolo saranno illustrati i principali strumenti utilizzati nel progetto, gli analiti monitorati, la normativa europea di riferimento e lo stato dell'arte sull'argomento trattato in questa tesi.

2.1 GASCROMATOGRAFIA

Secondo la definizione IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), la cromatografia è un metodo fisico di separazione nel quale i componenti da separare vengono distribuiti tra due fasi: una *fase stazionaria* fissa e una *fase mobile* che si muove in una direzione definita. Attraverso questo genere di tecniche si riescono a separare, identificare e determinare componenti presenti in miscele complesse.

La *gascromatografia* (GC), adatta per sostanze volatili, si distingue dalle altre tecniche di analisi cromatografiche in quanto la fase mobile utilizzata è un gas che fluisce attraverso la fase stazionaria, trasportando il campione che viene precedentemente vaporizzato³. Partendo da un campione liquido, la separazione degli analiti avverrà in base alle differenti pressioni di vapore relative ed alla differente affinità con la fase stazionaria.

Il campione, formato da diverse componenti, viene introdotto in quantità definita in una zona ristretta della colonna contenente la fase stazionaria, venendo dunque trasportato dalla fase mobile; qui avremo che ciascuna molecola si ripartirà tra le due fasi in maniera differente, ottenendo dunque la separazione.

Quando gli analiti lasciano la colonna vengono rilevati, generando delle variazioni di segnale all'interno della camera di rilevazione: il segnale in uscita dal rilevatore dà origine a un *cromatogramma*.

2.1.1 Strumentazione

Le componenti strumentali di un gascromatografo vengono riportate in Fig. 2

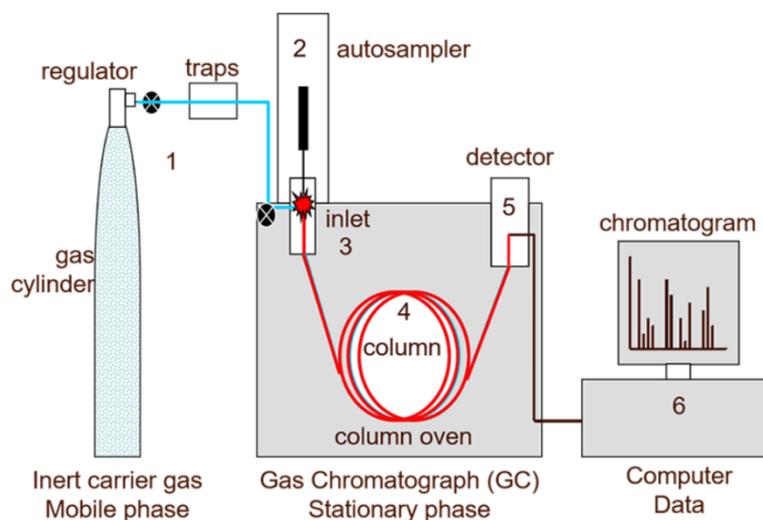


Fig. 2: schema⁴ generale del gascromatografo

La prima parte dello strumento è costituita da una bombola contenente la fase mobile o *gas carrier*, solitamente elio, argon, azoto o idrogeno, in quanto chimicamente inerti. Il gas fluisce in continuo attraverso lo strumento spingendo il campione dall'iniettore fino al detector.

Il gas di trasporto deve avere un'elevata purezza, in quanto contaminanti come idrocarburi, ossigeno e acqua possono danneggiare la fase liquida della colonna, innalzare la linea di base o far comparire picchi di sostanze non appartenenti alla matrice (picchi fantasma). Per una buona analisi cromatografica, inoltre, è importante mantenere il corretto controllo del flusso, che influenza sia l'efficienza della colonna che l'analisi qualitativa.

La giusta velocità di flusso può portare a raggiungere una maggiore efficienza del sistema analitico, mentre il mantenimento di valori di flusso costanti e stabili nel tempo permette di ottenere separazioni riproducibili. Per permettere una corretta gestione del flusso di gas si utilizzano una serie di sistemi di controllo:

- un *regolatore a due stadi* che permette di ridurre la pressione della bombola (200 bar) fino ad un livello operativo (5-10 bar). Ciascun manometro è munito di valvole di sicurezza e filtri interni per non permettere a potenziali inquinanti di entrare;
- un *flussimetro a bolla o digitale* per misurare la velocità di flusso del gas e mantenerla costante. Solitamente sono posti alla fine della colonna e lavorano mantenendo un flusso tra 25 e 150 mL/min per colonne impaccate o tra 1 e 25 mL/min nel caso di colonne tubolari capillari aperte.

La seconda parte dello strumento costituisce il corpo principale, una parte termostata formata da iniettore, colonna e detector.

Il *sistema di iniezione* permette di introdurre il campione all'interno del gascromatografo.

Scegliendo opportunamente il volume di iniezione del campione e sfruttando una sezione ristretta, la larghezza dei picchi ottenuti dall'analisi non verrà significativamente influenzata da questi parametri.

L'iniezione avviene solitamente con l'utilizzo di microsiringhe calibrate, attraverso un setto in gomma o silicone. Il campione da analizzare viene riposto in una camera portacampioni che viene riscaldata ad una temperatura di circa 50 °C superiore rispetto al punto di ebollizione della componente più altobollente della miscela. Tramite questo espediente, infatti, si può avere la certezza di ottenere un campione completamente vaporizzato. Per avere una maggiore riproducibilità nell'iniezione del campione, i moderni cromatografi utilizzano autocampionatori e autoiniettori.

Una volta vaporizzato, tramite un connettore il campione viene immesso nella *colonna*. Esistono due tipi di colonne, impaccate e capillari, tuttavia le prime sono ormai obsolete. Generalmente sono costruite in acciaio, vetro, silice fusa o Teflon, con una lunghezza che può variare dai 2 m ai 60 m; poiché devono essere introdotte all'interno di un forno termostato, solitamente vengono raccolte in una bobina per ridurre le dimensioni.

Le colonne capillari si suddividono in due categorie:

- le *colonne tubolari aperte a pareti rivestite* (WCOT – Wall-Coated Open Tubular), in acciaio inossidabile o plastica e rivestite da un sottile strato di fase stazionaria;
- le *colonne tubolari aperte a supporto rivestito* (SCOT – Support-Coated Open Tubular), aventi le pareti interne rivestite con uno strato costituito da materiale di supporto.

Le seconde sono in grado di trattenere più fase stazionaria, aumentandone la capacità di carica del campione; tuttavia, l'efficienza della colonna diminuisce.

Colonne più moderne sono quelle tubolari aperte a pareti ricoperte con silice fusa (FSWC – Fused-Silica Wall-Coated open tubular), contenenti minime quantità di ossidi metallici. Queste, hanno diversi fattori positivi dal punto di vista della struttura: pareti più sottili, ma con una maggiore resistenza per via del rivestimento protettivo applicato, permettendo la costruzione di colonne più flessibili, che conducono a una maggiore compattezza durante l'avvolgimento in spirale; ulteriore vantaggio è la scarsa reattività con i campioni.

Le colonne capillari hanno solitamente diametri compresi tra 320 µm e 250 µm, limitando la capacità di campione iniettabile. Questa caratteristica strutturale rende necessario un sistema di rilevazione il più possibile sensibile. Inoltre, la presenza di minimi quantitativi di ossidi di metalli fa sì che il problema relativo all'adsorbimento di analiti polari o polarizzabili sulle pareti del capillare, che affligge in genere le colonne capillari, non risulti influente.

La fase stazionaria contenuta all'interno della colonna deve avere determinate proprietà: una bassa volatilità, una temperatura di ebollizione almeno 100 °C più alta rispetto alla massima temperatura di lavoro della colonna, stabilità termica ed essere chimicamente

inerte. La scelta della corretta fase stazionaria è di fondamentale importanza per una buona separazione degli analiti: il tempo di ritenzione di un analita all'interno della colonna dipende, infatti, dalla costante di ripartizione, a sua volta correlata alla natura chimica della fase stazionaria stessa.

Per avere un certo tempo di residenza in colonna, un analita deve mostrare un certo grado di compatibilità, in termini di polarità, con la fase stazionaria. Quando le due polarità risultano essere simili o uguali, l'ordine di eluizione è determinato dal punto di ebollizione degli eluenti.

Le fasi stazionarie più utilizzate risultano essere i polialchil silossani (-R₂SiO-) Fig. 3. Tra questi, il polidimetil silossano presenta tutti gruppi -CH₃ come terminazioni, il che rende la fase relativamente non polare. La polarità della fase stazionaria può essere aumentata andando a sostituire una frazione dei gruppi metilici con gruppi funzionali quali fenil (-C₆H₅), cianopropil (-C₃H₆CN) e trifluoropropil (-C₃H₆CF₃).

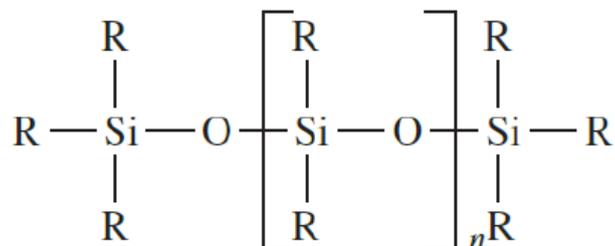


Fig. 3: Struttura generale di un polialchil silossano

Una volta separati gli analiti, per via della diversa pressione parziale e della diversa interazione con la fase stazionaria, questi raggiungono un rivelatore in grado di identificare la presenza degli analiti.

Il detector più comune risulta essere il detector a ionizzazione di fiamma (FID – Flame Ionization Detector), dove l'effluente della colonna viene bruciato mediante una fiamma aria-idrogeno con la conseguente produzione di ioni: questi ultimi generano, quindi, una corrente elettrica che viene convertita in segnale. Il FID rivela i composti organici bruciati, dando un segnale proporzionale circa al contenuto di carbonio. Si tratta di un rivelatore caratterizzato da una buona sensibilità, semplicità, robustezza e adattabilità a tutte le dimensioni della colonna. L'identificazione di un soluto, in questo caso, può essere ricavata tramite confronto del tempo di ritenzione ottenuto con quello di uno standard, ponendo costanti le variabili della colonna.

Per l'identificazione degli analiti della guarnizione in esame, sicuramente più performante è l'accoppiamento del GC con uno spettrometro di massa (MS). Questa tecnica rientra tra le tecniche ifenate, con l'acronimo GC-MS, basate sull'accoppiamento di due o più strumentazioni: la prima ha il compito di separare i componenti presenti all'interno della matrice in analisi, gli strumenti successivi li identificano e ne determinano la concentrazione.

2.1.2 Tecnica GC-MS

Il solo gascromatografo non permette di identificare i picchi: i tempi di ritenzione sono correlati ai coefficienti di ripartizione e, sebbene siano caratteristici di sistemi ben definiti, non sono unici.

La spettrometria di massa, al contrario, è un sistema di rivelazione capace di fornire una grande quantità di informazioni utili sia per l'identificazione qualitativa di composti incogniti sia per la loro quantificazione⁵.

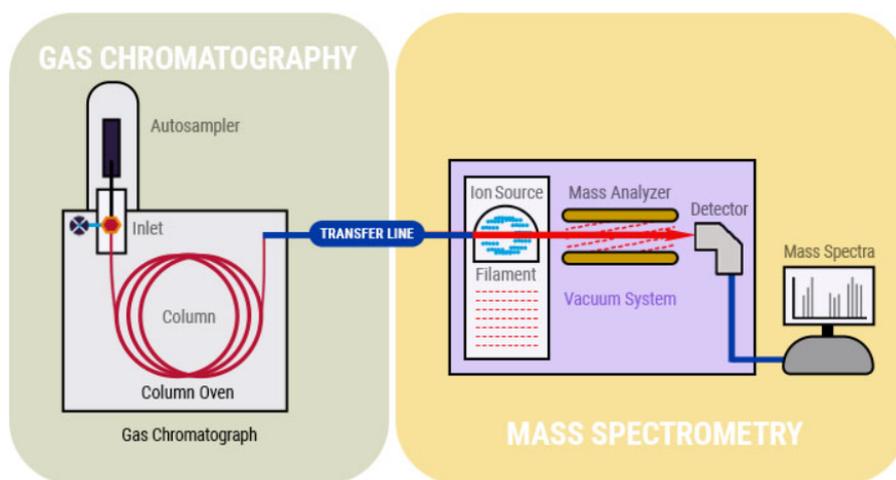
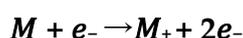


Fig. 4: schema riassuntivo del GC-MS

In Fig. 4 è riportato lo schema⁶ di un cromatografo accoppiato ad uno spettrometro di massa. I due strumenti risultano essere molto compatibili tra loro: entrambi impiegano composti vaporizzati, richiedono piccole quantità di campione e sono riscaldati tra i 200 e i 300 °C. L'unica possibile criticità risulta essere il passaggio dalla pressione atmosferica, presente all'interno del GC, ad un vuoto di 10^{-5} - 10^{-6} torr richiesti dalla MS. I moderni GC-MS utilizzano colonne capillari, in quanto i tubi in silice fusa consentono il trasferimento inerte e ad alta efficienza tra i due sistemi per flussi capillari di 5 mL/min o inferiori, facilmente supportati dai sistemi GC-MS in commercio.

Una volta raggiunto lo spettrometro di massa, le molecole dell'analita devono essere ionizzate per poter essere attratte, o respinte, dai campi magnetici o elettrici del sistema.

La tecnica di ionizzazione più diffusa risulta essere l'impatto elettronico (EI). La sorgente di ionizzazione, scaldata e sottovuoto, permette una facile vaporizzazione e, successivamente, ionizzazione della maggior parte dei soluti mediante l'impatto di un fascio di elettroni ad alta energia (70 eV). Gli elettroni ad alta energia collidono con le molecole neutre di analita causandone la ionizzazione, con la perdita generalmente di un elettrone, e successivamente la frammentazione. Questa tecnica di ionizzazione produce quasi esclusivamente ioni positivi:



Altri metodi di ionizzazione sono la ionizzazione chimica (CI), la ionizzazione chimica negativa (NCI) e il bombardamento atomico veloce (FAB), tuttavia queste metodiche sono molto meno utilizzate.

Successivamente alla ionizzazione, le particelle cariche vengono respinte e attratte da lenti cariche presenti all'interno dell'analizzatore di massa. Le specie ioniche vengono quindi separate in base al valore di rapporto massa su carica (m/z) da campi elettrici o magnetici. L'analizzatore di massa tipico è il quadrupolo, ma vengono utilizzate anche le trappole ioniche.

L'analizzatore di massa a quadrupolo consiste in quattro sbarre iperboliche poste ad angolo retto l'una rispetto all'altra. Alle sbarre è applicato un voltaggio in corrente continua (DC), con i segni del voltaggio che possono essere invertiti rapidamente, e una radiofrequenza. A seconda della combinazione tra la radiofrequenza e il potenziale di corrente, soltanto gli ioni con un certo valore del rapporto m/z riescono a passare e raggiungere il rivelatore, gli altri andranno a collidere contro le sbarre e saranno annullati.

Il rivelatore, solitamente un moltiplicatore elettronico, si occupa del conteggio degli ioni e genera lo spettro di massa, il quale riporta l'abbondanza degli ioni in funzione del rapporto m/z . Dal momento che gli ioni derivano da una tecnica di ionizzazione hard (ossia quella a EI), che produce frammenti specifici per la molecola, i rapporti di abbondanza ionica e le specie m/z presenti sono unici per ciascun composto. L'identificazione di uno specifico analita può essere ricavata, dunque, tramite un semplice confronto con una banca dati digitale.

La GC-MS riunisce i vantaggi di entrambe le tecniche: l'elevato potere di risoluzione e la velocità di analisi del GC sono mantenuti, mentre la MS consente sia l'identificazione delle specie chimiche sia la loro analisi quantitativa fino alle parti per miliardo (ppb).

Nell'analisi GC-MS lo spettrometro di massa può scannerizzare le masse ripetutamente durante l'esperimento cromatografico. I dati possono essere elaborati in due modi: come scansione totale TIC (Total Ion Chromatogram) o come un piccolo numero di ioni individuali SIM (Selected Ion Monitoring) caratteristici di un particolare composto. Il TIC riporta l'abbondanza degli ioni in ogni spettro sommata in funzione del tempo, con un grafico simile a un normale cromatogramma.

In modalità SIM solo un numero limitato di ioni viene monitorato, la velocità di acquisizione dei dati è maggiore e, quindi, si ha un incremento della sensibilità, che permette di avere dati quantitativi migliori rispetto alla modalità TIC.

2.1.3 Volume di ritenzione

Il tempo che trascorre tra l'iniezione dell'analita e la sua identificazione da parte del rivelatore viene detto tempo di ritenzione (t_R). Risulta essere uno dei parametri più

importanti per la separazione dei picchi cromatografici. In GC, tuttavia, è più utile utilizzare il concetto di *volume di ritenzione* (V_R) in quanto direttamente proporzionale alla velocità di flusso. I due parametri sono legati dall'equazione 1:

$$V_R = t_R F \quad (\text{Eq. 1})$$

Dove F è la velocità di flusso media all'interno della colonna.

Non essendo F direttamente misurabile, si ovvia al problema andando a determinare la velocità di flusso all'uscita della colonna (F_m) tramite un flussimetro. F ed F_m sono correlate dalla relazione (Eq. 2):

$$F = F_m \frac{T_c (P - P_{H_2O})}{T P} \quad (\text{Eq. 2})$$

Dove T_c è la temperatura della colonna, T è la temperatura del flussimetro e P la pressione del gas alla fine della colonna. P_{H_2O} è una correzione per la pressione usata quando il gas è saturato con acqua.

Il volume di ritenzione dipende, inoltre, dalla pressione media all'interno della colonna, ottenuta tramite il rapporto tra la pressione in ingresso P_i e quella in uscita P . Dal momento che la pressione all'interno della colonna è una funzione non lineare del rapporto P_i/P , bisogna introdurre il fattore di comprimibilità j per ottenere il volume di ritenzione corretto (Eq. 3).

$$V_R^0 = jt F \quad (\text{Eq. 3})$$

Il volume di ritenzione specifico V_g è definito dall'equazione 4:

$$V_g = \frac{jF(t_R - t_m) 273}{m_s T_c} \quad (\text{Eq. 4})$$

Con m_s che corrisponde alla massa della fase stazionaria e t_m il tempo morto, tempo necessario per una specie non trattenuta dalla fase stazionaria per raggiungere il detector. Infine, il volume di ritenzione specifico può essere correlato alla costante di distribuzione K dall'espressione (Eq. 5):

$$V_g = \frac{K 273}{\rho_s T_c} \quad (\text{Eq. 5})$$

V_g , a una data temperatura, risulta dunque essere dipendente solo dalla costante di distribuzione K dell'analita e dalla densità del liquido che compone la fase stazionaria ρ_s .

2.2 ANALITI

Le analisi effettuate in questo progetto hanno avuto lo scopo di raccogliere informazioni circa la migrazione specifica di cinque analiti: 1,4-butandiolo, anilina, 2,6-tertbutilidrossitoluene, acetiltributilcitrato e bis(2-etilesil)adipato.

Di seguito verranno riportate le principali caratteristiche di queste molecole^{7 8}

2.2.1 1,4-butandiolo

L'1,4-butandiolo (CAS: 110-63-4), facente parte della famiglia dei dioli, ha formula bruta $C_4H_{10}O_2$ e struttura derivante dal butano (Fig. 5), in cui un idrogeno di ciascun gruppo metilico è sostituito con un gruppo idrossile. A temperatura ambiente si presenta come un liquido viscoso incolore.



Fig. 5: 1,4-butandiolo

Ha un peso molecolare di 90.12 uma, a 20.1 °C raggiunge il punto di fusione e a 235 °C quello di ebollizione. Per via dei gruppi polari presenti risulta essere molto solubile in acqua, con una solubilità di 10^5 mg/L a 20 °C, mentre presenta una bassa affinità nei confronti dei solventi organici, con un $\log k_{ow}$ (la costante di ripartizione ottanolo/acqua) pari a -0.8. La sua pressione di vapore è pari a 1.4 Pa a temperatura ambiente. Risulta, infine, essere irritante.

Lo spettro di massa dell'1,4-butandiolo è mostrato in Fig. 6. I suoi rapporti m/z caratteristici sono: 71, 57 e 44.

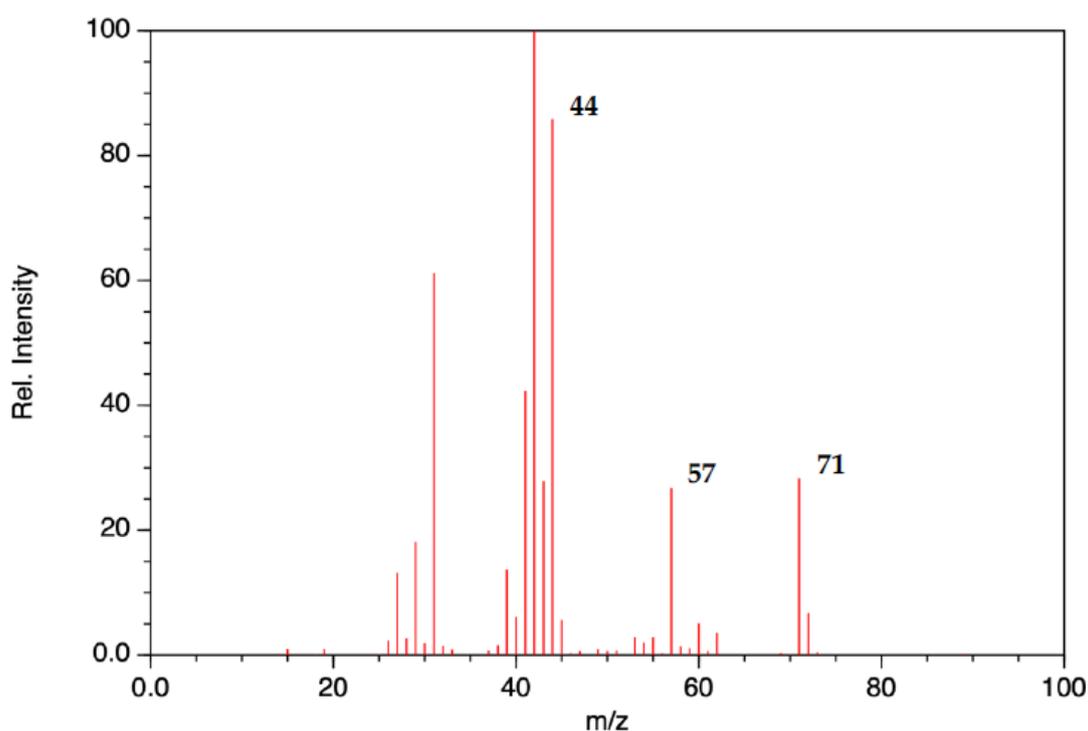


Fig. 6: spettro di massa dell'1,4-butandiolo

L'1,4-butandiolo rappresenta un intermedio versatile nell'industria chimica: il suo uso principale è nella sintesi di altri composti organici (in particolare il THF), mentre altri impieghi sono ad esempio la produzione di polimeri come poliuretano e polibutilentereftalato.

2.2.2 Anilina

L'anilina (CAS: 62-53-3) è un composto di formula bruta C_6H_7N , appartenente alla famiglia delle ammine aromatiche. La sua struttura (Fig. 7) è composta da un benzene in cui un atomo di idrogeno è stato sostituito da un gruppo NH_2 . Velenosa e con possibili effetti cancerogeni, si presenta a temperatura ambiente come un liquido oleoso di colore giallastro-bruno con odore caratteristico di pesce, tipico delle ammine primarie.

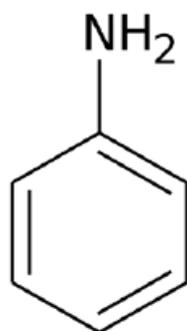


Fig. 7: anilina

Possiede un peso molecolare di 93.13 uma, un punto di fusione pari a $-6\text{ }^{\circ}C$ e un punto di ebollizione a $184\text{ }^{\circ}C$. Risulta più densa dell'acqua e solo leggermente solubile in quest'ultima, con una solubilità di 36 g/L a $25\text{ }^{\circ}C$; al contrario presenta una buona solubilità in solventi organici, con un $\log k_{ow}$ di 0.9. La sua pressione di vapore a $20\text{ }^{\circ}C$ è di 40 Pa e i suoi vapori sono più pesanti dell'aria.

Risulta essere tossica per assorbimento cutaneo e inalazione, mentre durante la combustione produce ossidi di azoto tossici.

In Fig. 8 è riportato lo spettro di massa dell'anilina, i cui rapporti m/z principali sono:

93, 66 e 65.

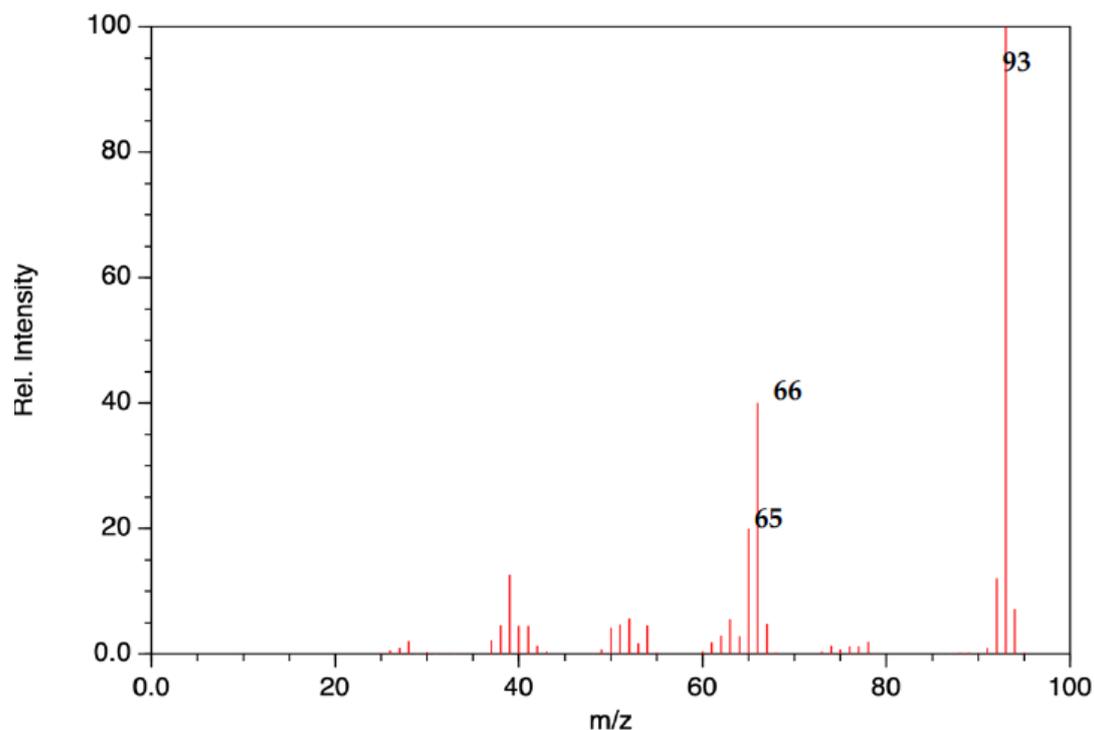


Fig. 8: spettro di massa dell'anilina

L'anilina è utilizzata per la produzione di una grande varietà di prodotti: schiume poliuretatiche, prodotti chimici agricoli, coloranti sintetici, antiossidanti, stabilizzanti per l'industria della gomma, erbicidi, vernici e come antidetonante nella benzina.

2.2.3 2,6-tertbutilidrossitoluene

Il 2,6-tertbutilidrossitoluene (CAS: 128-37-0), comunemente detto BHT, è un composto apolare lipofilo derivante dall'alchilazione del fenolo, con formula bruta $C_{15}H_{24}O$.

A temperatura ambiente si presenta come una polvere bianca inodore, la sua struttura chimica (Fig. 9) è composta da un 4-metilfenolo con due gruppi tert-butilici in posizione 2 e 6 dell'anello benzenico.

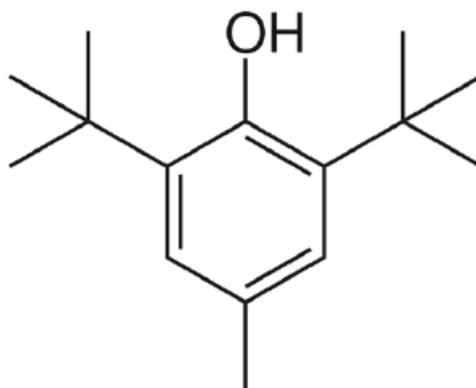


Fig. 9: 2,6-tertbutilidrossitoluene (BHT)

Il peso molecolare è di 220.35 uma, i punti di fusione e di ebollizione sono rispettivamente 71 °C e 265 °C. Risulta poco solubile in acqua (0.6 mg/L), ma con affinità elevata per i solventi organici ($\log k_{ow}$ pari a 5.10). La pressione di vapore a 20 °C è di 1.3 Pa e risulta essere molto tossico per la vita acquatica.

In Fig. 10 viene riportato lo spettro di massa del BHT. I principali rapporti m/z caratteristici sono: 205, 220 e 57.

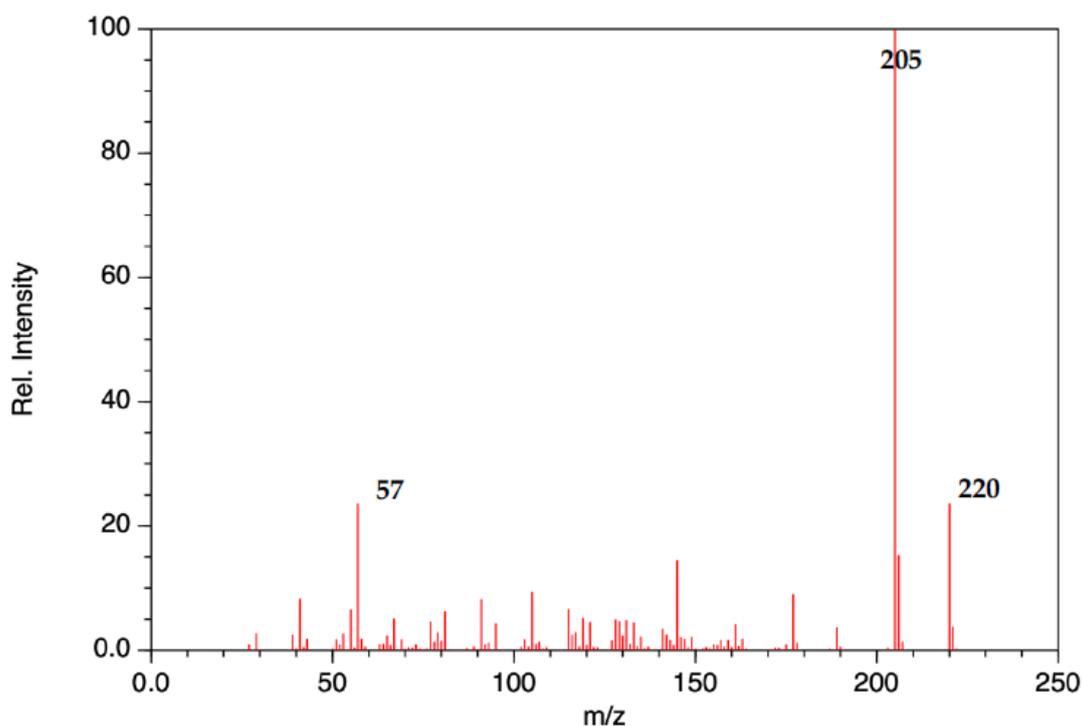


Fig. 10: spettro di massa del BHT

Il BHT è usato principalmente come agente antiossidante di composti organici insaturi. Viene usato, ad esempio, nell'industria alimentare e della cosmesi, per prevenire l'ossidazione e la formazione di radicali liberi, o come additivo nella produzione di plastiche come polietilene e poliuretano.

2.2.4 Acetiltributilcitrato

L'acetiltributilcitrato (CAS: 77-90-7) è un composto organico avente formula bruta $C_{20}H_{34}O_8$, derivante dall'acido tetracarbossilico (Fig. 11). Si presenta come un liquido incolore con odore molto tenue.

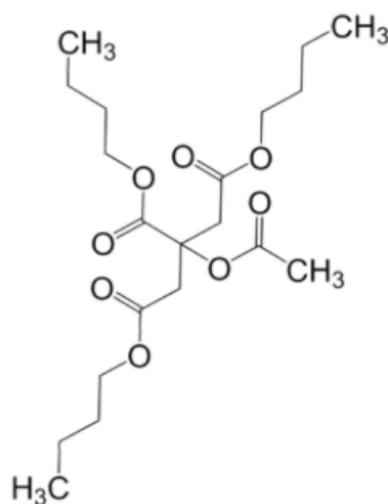


Fig. 11: acetiltributilcitrato

Il peso molecolare è pari a 402.5 uma e i punti di fusione ed ebollizione sono rispettivamente di $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $331\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La solubilità in acqua è pari a 4.49 mg/L a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e risulta essere solubile nei solventi organici, mostrando un $\log k_{ow}$ pari a 4.92, e la pressione di vapore è di 4×10^{-2} Pa a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In Fig. 12 è mostrato lo spettro di massa dell'acetiltributilcitrato. I rapporti m/z caratteristici della molecola sono: 259, 185 e 129.

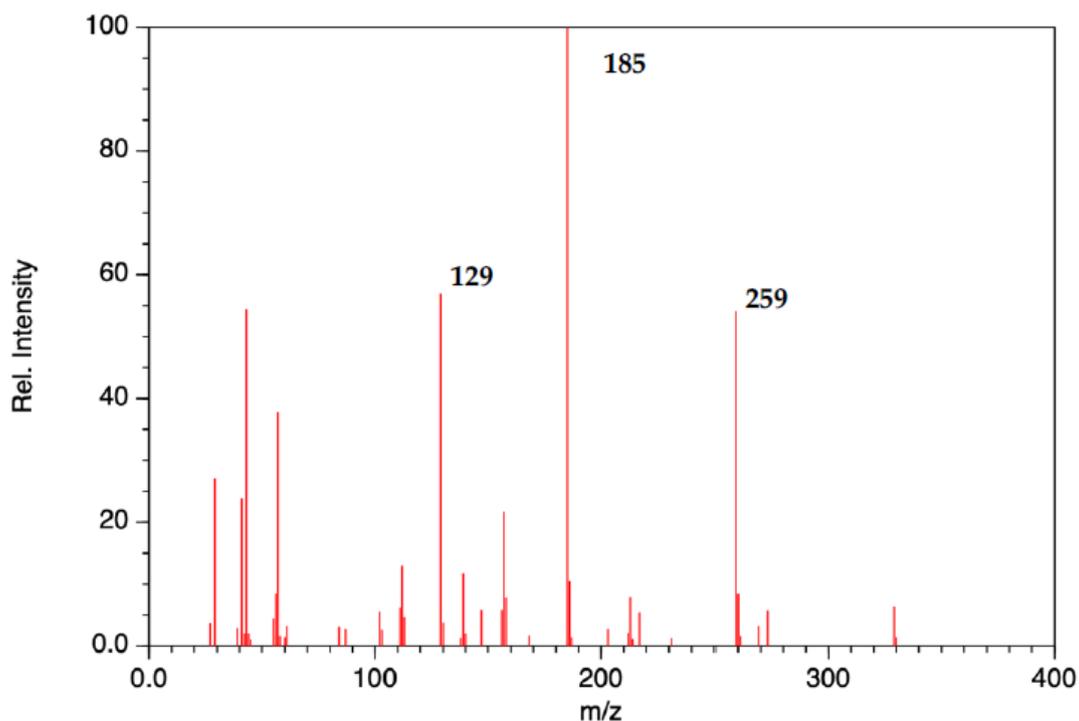


Fig. 12: spettro di massa dell'acetiltributilcitrato

L'acetiltributilcitrato è impiegato solitamente come plastificante nelle resine viniliche e nella gomma, viene inoltre usato per formare un rivestimento polimerico in materiali a contatto con cibo.

2.2.5 Bis(2-etilesil)adipato

Il bis(2-etilesil)adipato (CAS: 103-23-1) è un diestere (Fig. 13), derivante dalla reazione del gruppo carbossilico dell'acido adipico con il 2-etilesanolo. Si presenta come un liquido dall'odore delicato e con una colorazione che va dal trasparente al giallo paglierino, la sua formula bruta è $C_{22}H_{42}O_4$.

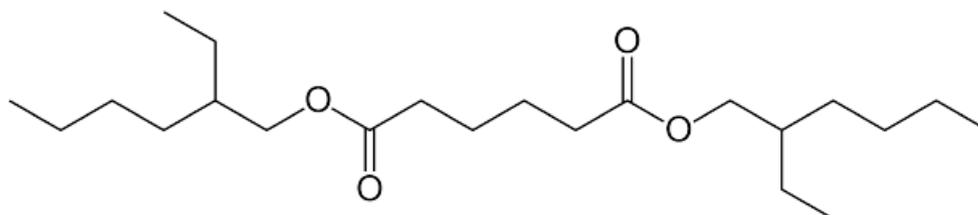


Fig. 13: bis(2-etilesil)adipato

Possiede un peso molecolare di 370.6 uma, raggiunge il punto di fusione a $-67.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e quello di ebollizione a $417\text{ }^{\circ}\text{C}$. Risulta essere particolarmente apolare, con una solubilità in acqua di 0.78 mg/L , ma con una maggiore affinità con i solventi organici ($\log k_{ow} = 6.8$).

La sua pressione di vapore è pari a $1.13 \times 10^{-4}\text{ Pa}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inquinante per l'ambiente acquatico, può provocare irritazione cutanea e viene inoltre classificato come possibile cancerogeno per l'uomo.

Viene riportato in Fig. 14 lo spettro di massa del bis(2-etilesil)adipato, i cui rapporti m/z principali sono: 129, 57, 147 e 112.

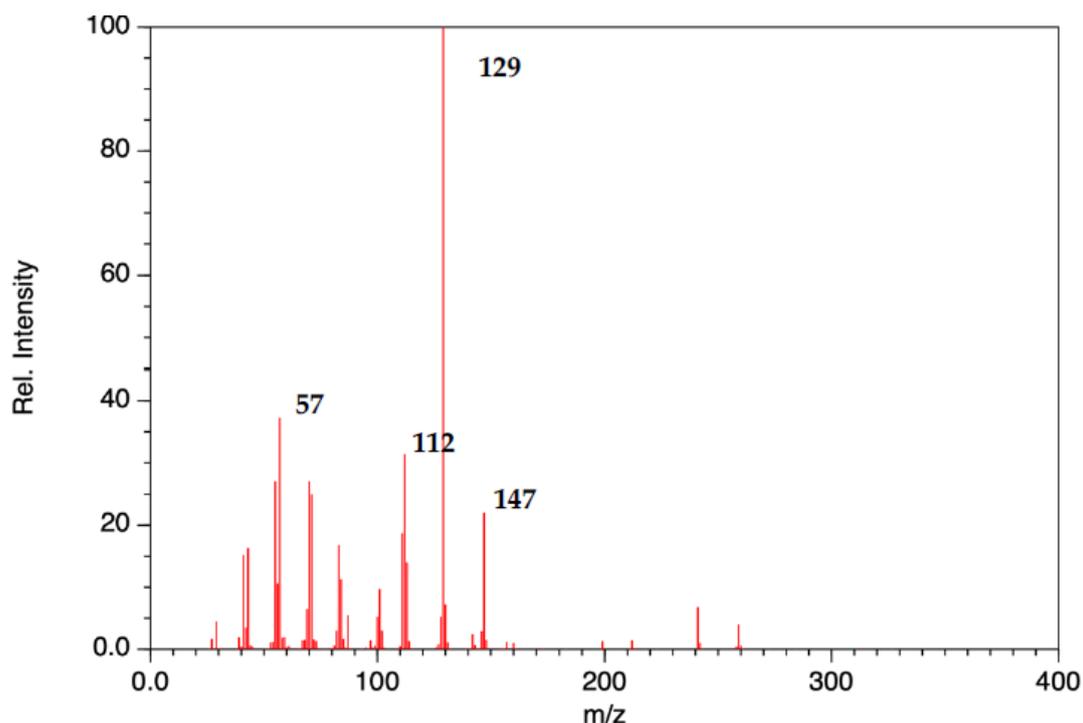


Fig. 14: spettro di massa del bis(2-etilesil)adipato

Come tutti i derivati diesterici degli alcoli, viene utilizzato come plastificante per rendere più flessibile il polimero; viene inoltre usato come fluido idraulico e lubrificante per velivoli e come ingrediente in coperture plastiche basate sul PVC.

2.3 NORMATIVA VIGENTE

Il regolamento⁹ (UE) 2020/1245 della commissione del 2 settembre 2020 (UE, 2020) modifica e rettifica il regolamento (UE) n. 10/2011 (UE, 2011) riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con prodotti alimentari, definendone i criteri ed i relativi limiti da osservare per ottenere la conformità. Tale regolamento prevede la possibilità di adottare misure specifiche per alcuni gruppi di materiali e oggetti, descrivendo la procedura da seguire per autorizzare sostanze a livello europeo e stabilisce norme specifiche per i materiali e gli oggetti di materia plastica, al fine di garantirne l'impiego in condizioni di sicurezza.

Le materie plastiche vengono definite come sostanze macromolecolari ottenute da processi di polimerizzazione. In particolare, sono composte da monomeri e altre sostanze di partenza che vengono trasformate, mediante reazione chimica, in una struttura macromolecolare che costituisce il principale componente strutturale delle materie plastiche. Il polimero in sé, dunque, non rappresenta un potenziale rischio per la salute, in quanto le sostanze ad alto peso molecolare non possono essere assorbite dall'organismo; tuttavia, i monomeri o altre sostanze di partenza non reagiti o parzialmente reagiti, oppure gli additivi a basso peso molecolare impiegati nella formulazione, possono rappresentare dei rischi una volta entrati in contatto con gli alimenti, in quanto potrebbero essere trasferiti tramite migrazione in quest'ultimi dal manufatto di materia plastica con il quale sono a contatto. Di conseguenza, queste molecole devono essere oggetto di una valutazione dei rischi e devono ottenere un'autorizzazione prima di essere utilizzati nella fabbricazione di materiali e oggetti di materia plastica.

La valutazione dei potenziali rischi presentati da una sostanza, contemplando la sostanza stessa, ma anche le relative impurità e i prodotti di reazione e degradazione, ha permesso di stabilire le specifiche e le restrizioni d'uso, le limitazioni quantitative o di migrazione per garantire la sicurezza dei materiali o degli oggetti finali. Tale valutazione è stata effettuata dall'ente EFSA (European Food Safety Authority), l'autorità europea per la sicurezza alimentare, esaminando la possibile migrazione nelle peggiori condizioni d'uso prevedibili, nonché la tossicità.

Le sostanze utilizzate nella sintesi di oggetti di materia plastica possono contenere impurità provenienti dai processi di fabbricazione o estrazione. Allo stesso modo, durante la

preparazione e l'uso di oggetti di materia plastica, può verificarsi la formazione di prodotti di reazione e di degradazione: tali composti sono presenti nel manufatto finale in maniera non intenzionale, venendo identificati come NIAS.

Qualora fossero rilevanti per la valutazione dei rischi, queste molecole devono essere prese in considerazione e incluse nelle restrizioni della sostanza.

Non essendo possibile elencare e prendere in considerazione tutti gli elementi che potrebbero risultare dannosi all'interno della normativa, i NIAS devono essere valutati dal fabbricante conformemente ai principi scientifici di valutazione dei rischi riconosciuti a livello internazionale.

Basandosi sulla valutazione dei rischi, l'EFSA deve definire limiti di migrazione specifica al fine di garantire la sicurezza del materiale o dell'oggetto finale. Durante la fase di preparazione, per ciascun additivo aggiunto ci si deve assicurare che, mettendo a contatto il materiale plastico con un alimento, il suo rilascio non modifichi la composizione del cibo in modo inaccettabile.

Per ottenere risultati compatibili, nel rispetto del limite di migrazione globale, è necessario condurre prove in condizioni standardizzate, quali durata, temperatura e mezzo, considerando le peggiori condizioni d'uso prevedibili del materiale o dell'oggetto in materia plastica.

Il limite di migrazione globale regolamentato è pari a 10 mg per dm², che corrisponde, per un imballaggio cubico contenente 1 kg di prodotto alimentare, a una migrazione di 60 mg per kg di cibo. Per imballaggi di piccolo volume, in cui il rapporto superficie/volume è più elevato, la migrazione nei prodotti alimentari è maggiore. Per garantire la stessa sicurezza degli imballaggi di grande volume, il limite di migrazione globale deve essere correlato al limite nell'alimento e non alla superficie dell'imballaggio.

Nel caso non fosse possibile determinare la superficie di contatto tra l'oggetto in materiale plastico ed il prodotto alimentare, è necessario stabilire norme specifiche per verificarne la conformità.

Infine, per recipienti molto piccoli o molto grandi, l'effetto del rapporto tra la superficie e il volume dei prodotti alimentari imballati si allontana di molto dall'ipotesi convenzionale. Di conseguenza, è necessario normalizzare la loro superficie prima di confrontare i risultati delle prove di migrazione.

Il limite di migrazione specifica corrisponde alla quantità massima di una sostanza consentita nei prodotti alimentari. Esso garantisce che non vi siano rischi per la salute una volta che il materiale plastico giunga a contatto con i prodotti alimentari. Il fabbricante deve garantire il rispetto di tali limiti, mediante prove di contatto effettuate nelle condizioni peggiori prevedibili.

I prodotti alimentari sono matrici complesse e, pertanto, vi possono essere difficoltà nelle analisi delle sostanze che vi migrano. Si è presentata, dunque, la necessità di mettere a punto

delle prove condotte per osservare il trasferimento delle sostanze impiegando dei simulanti alimentari. Questi simulanti devono presentare le principali caratteristiche fisico-chimiche del prodotto alimentare. Inoltre, durante il loro uso, condizioni quali temperatura e durata della prova devono riprodurre il più possibile fedelmente l'eventuale migrazione potenziale della sostanza. Bisogna considerare che, per alimenti grassi, i simulanti possono sovrastimare di molto la migrazione nei prodotti alimentari, rendendo necessario la correzione dei dati mediante un coefficiente di riduzione.

I metodi analitici di verifica della migrazione devono rispettare i criteri di cui all'articolo 11 del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio.

Il regolamento (UE) 2020/1245 della commissione del 2 settembre 2020, che modifica e rettifica il regolamento (UE) n. 10/2011, dispone delle linee guida per quelle che sono le metodologie di analisi e la verifica dei dati.

Di particolare interesse per il lavoro svolto in questo studio sono gli allegati II, III e V, ai quali si è fatto riferimento durante le analisi.

L'allegato I contiene una tabella illustrativa di limiti e restrizioni per un gran numero di sostanze.

Il punto 2 dell'allegato II, riguardante le restrizioni su materiali e oggetti, per le ammine aromatiche primarie (PAA) che non rientrano nella tabella dell'allegato I, come nel caso dell'anilina in studio, non prevede limiti di migrazione specifica. Tuttavia, è dichiarato che la somma delle PAA non deve superare la concentrazione di 0.01 mg di sostanza per kg di prodotto o simulante alimentare.

L'allegato III, riguardante i simulanti alimentari, dichiara che, per la dimostrazione di conformità di materiali e oggetti di materia plastica non ancora venuti a contatto con i prodotti alimentari, il simulante designato per le prove di migrazione specifico negli alimenti secchi (cereali, farina, latte in polvere, riso, etc..) è il simulante alimentare E.

Questo è il poli(ossido di 2,6-difenil-p-fenilene), comunemente detto TENAX®, avente dimensioni delle particelle pari a 60-80 mesh e dei pori pari a 200 nm.

L'allegato V descrive le linee guida da applicare per le prove di conformità. Il capo 2 di questo allegato, in particolare, fa riferimento a prove di migrazione specifica da materiali e oggetti non ancora a contatto con prodotti alimentari. La migrazione deve essere determinata direttamente sul materiale o comunque su un campione rappresentativo di questo. Il contatto con il simulante o con il prodotto alimentare deve avvenire soltanto sulle parti del campione effettivamente destinate al contatto, nelle condizioni più estreme di tempo e temperatura prevedibili per l'impiego effettivo.

Se un materiale o un oggetto è destinato a diverse applicazioni che comprendono combinazioni di durata e temperatura di contatto, la prova deve essere limitata alle condizioni di prova riconosciute come più rigorose secondo i dati scientifici. Se il materiale

o l'oggetto è destinato ad un'applicazione a contatto con un prodotto alimentare che lo sottopone in successione ad una combinazione di due o più tempi e temperature, la prova di migrazione deve essere svolta sottoponendo il campione a prove in successione a tutte le peggiori condizioni d'impiego prevedibili, utilizzando la stessa porzione di simulante alimentare.

Se il materiale o l'oggetto è destinato a venire ripetutamente a contatto con i prodotti alimentari, bisogna effettuare tre prove di migrazione su uno stesso campione, cambiando ogni volta la porzione di simulante alimentare. La verifica di conformità va effettuata sulla base del livello di migrazione riscontrato nella terza prova. Tuttavia, in presenza di una prova inconfutabile che il livello di migrazione non aumenti nella seconda e nella terza prova e se nella prima prova non si superano i limiti di migrazione non sono necessarie altre prove.

A prescindere dalle disposizioni appena citate, un materiale o un oggetto non può essere in alcun modo considerato conforme al presente regolamento se nella prima prova viene riscontrata una sostanza la cui migrazione o il cui rilascio in quantità rilevabili sono vietati. Al termine della durata del contatto, la migrazione specifica nel prodotto o nel simulante alimentare deve essere analizzata secondo un metodo analitico conforme. Per sostanze instabili o per le quali non è disponibile un metodo analitico adeguato, la verifica della conformità va effettuata considerando il contenuto residuo per 6 dm² di superficie di contatto.

Per materiali o oggetti con volume compreso tra 500 mL e 10 L si utilizza la superficie effettivamente a contatto. Se il volume dell'oggetto è superiore o inferiore a questi valori, o se la superficie di contatto effettiva non è calcolabile in maniera pratica, si suppone allora che la superficie di contatto corrisponda a 6 dm² per kg di prodotto alimentare.

Per effettuare lo screening della migrazione specifica è possibile calcolare il potenziale di migrazione sulla base del contenuto residuo di sostanza nel materiale o nell'oggetto supponendo una migrazione completa.

2.4 STUDI DI MIGRAZIONE: MECCANISMI E STATO DELL'ARTE

Nei lavori di tesi precedentemente svolti, inerenti a questa tematica, in primo luogo si è andati a ottimizzare una metodica analitica per permettere di individuare gli analiti in studio tramite delle prove di contatto con il simulante alimentare; successivamente si è passati a identificare i meccanismi di migrazione degli analiti, i fattori che li possono influenzare (ad esempio umidità e contenuto di grassi) e sviluppare delle procedure che possano simulare correttamente il fenomeno.

In questo progetto sono state effettuate le analisi di migrazione sulle matrici alimentari, sfruttando tutte le nozioni apprese dai lavori precedenti.

Le specie contenute nel materiale polimerico e che migrano nell'alimento a seguito del contatto possono essere sostanze utilizzate durante la produzione del materiale polimerico (monomeri, additivi, etc.), sostanze usate nella conversione del materiale (inchiostri da stampa, adesivi per laminazione o solventi), prodotti di degradazione, impurità o sostanze incognite.

Le linee guida da seguire per la determinazione della presenza di tali specie all'interno di alimenti sono date dal Regolamento europeo trattato nel precedente capitolo, dove si indica come determinare direttamente la migrazione, tramite prove in cui il materiale plastico e il simulante o alimento vengono messi in diretto contatto tra loro.

La normativa prevede inoltre l'utilizzo di un simulante al posto dell'alimento reale. Nerin et al. (2007)¹⁰ confrontano due simulanti alimentari: il TENAX®, il cui utilizzo è predisposto dal regolamento europeo, e il PORAPAK™. Nello studio citato si è notato come, ad alte temperature, il secondo performi meglio del primo, in quanto il TENAX® sembra dare rilascio dei composti per desorbimento termico; essendo tuttavia disposto dal metodo normato, in questo lavoro di tesi è stato impiegato quest'ultimo, tenendo conto però di questo comportamento.

La migrazione dipende da molti fattori: la natura chimica e fisica del migrante e del cibo in contatto con il materiale plastico, l'area superficiale del materiale polimerico in contatto con il cibo, il tempo, la temperatura del contatto e il tipo di materiale polimerico.

I fattori esterni che impattano maggiormente risultano essere il tempo e la temperatura (Triantafyllou et al., 2002)¹¹.

Ulteriori studi sono stati effettuati confrontando la migrazione degli analiti utilizzando un simulante e quella che avverrebbe se, invece, il polimero fosse a contatto con una matrice alimentare; ad esempio, Reinas et al. (2012)¹² comparano la cinetica di migrazione di due molecole antiossidanti nel TENAX® e nel riso: dall'indagine emerge una sovrastima dei valori di migrazione per il simulante, rispetto alla matrice reale, imponendo un modello più rigido e quindi più sicuro. In particolare, la migrazione è molto più rapida nel TENAX®, probabilmente per via dell'alta porosità del materiale e della sua capacità di adsorbimento. La temperatura è legata in maniera direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione, ma ha un impatto molto maggiore nel caso del simulante rispetto al riso.

Dal momento che la concentrazione dei soluti identificati nel simulante alimentare è generalmente maggiore rispetto a una matrice reale, risulta interessante capire se il comportamento dei diversi alimenti vari o rimanga simile. Sanches Silva et al. (2009)¹³ confrontano la migrazione di una molecola particolarmente apolare (DPBD – Diphenylbutandiene) in diverse matrici alimentari, riportando che i valori di migrazione, in questo caso, vanno dalla matrice più grassa (latte in polvere) a quella con meno contenuto grasso (riso). Il fenomeno può essere spiegato con il concetto "*simile scioglie il simile*" essendo

il DPBD solubile in composti grassi, anche la migrazione segue questa dinamica. Lo studio inoltre dimostra che anche l'area superficiale dell'alimento è una variabile di cui tenere conto nelle valutazioni: la migrazione che avviene a contatto con la farina risulta essere maggiore rispetto a quella con riso, nonostante abbiano un contenuto di grassi simile; questo avviene perché la farina ha una maggiore area superficiale, correlabile a una maggiore migrazione.

L'entità della migrazione è inoltre dipendente dalla pressione di vapore dell'analita e dalla diffusione per contatto; infatti, le componenti maggiormente volatili tenderanno a migrare preferenzialmente attraverso la fase vapore, mentre le componenti a più alto peso molecolare si sposteranno preferenzialmente per diffusione. Nello studio di Goulas et al. (2007)¹⁴, infatti, viene dimostrato come due molecole poco volatili (il bis(2- etilesil)adipato e acetiltributilcitrato) migrino quando l'alimento viene messo a contatto con l'halva, un alimento di origine greca ad alto contenuto di grassi. La migrazione di entrambi i plastificanti diminuisce progressivamente allontanandosi dal materiale polimerico all'interno dell'alimento.

Di più difficile comprensione è quello che avviene con analiti volatili. Silva et al. (2008)¹⁵ studiano la diffusione migratoria (trasporto di massa) attraverso cinque strati separati di cibo secco, con il primo a diretto contatto con polietilene a bassa densità. La molecola di BHT, volatile, riesce a penetrare attraverso tutti e cinque gli strati, mentre le molecole più grandi sono rimaste più concentrate nei primi due layer. Si ipotizza che questo comportamento sia dato dal fatto che il BHT riesce a volatilizzarsi e venga adsorbito dall'alimento, poiché la pressione di vapore dell'analita nel cibo è minore della pressione di vapore nel polimero. La migrazione del BHT può, quindi, avvenire anche quando l'alimento e la plastica sono separati dall'aria.

Nel corso degli anni sono state sviluppate diverse metodologie per l'estrazione degli analiti dalle matrici utilizzate nelle prove di contatto. L. Blanco-Zubiaguirre et al. (2021)¹⁶ ad esempio, hanno impiegato un'estrazione solido-liquida con ultrasuoni (FUSLE) utilizzando acetone nitrile come solvente; in seguito vengono separate dall'estratto le proteine (tramite precipitazione) e i lipidi prima di iniettarlo.

PROCEDURE SPERIMENTALI

3. MATERIALI E METODI

3.1 STANDARD, SOLVENTI, MATRICI ALIMENTARI

Gli standard utilizzati sono acetiltributilcitrate, anilina, bis(2-etilesil)adipato, 1,4-butandiolo, BHT e come standard interno è stato impiegato lo stirene, tutti di grado analitico e acquistati dall'azienda Sigma-Aldrich.

Il solvente utilizzato, di grado analitico, per le diverse procedure è stato acetone acquistato dalla VWR.

Come simulante alimentare è stato utilizzato il Tenax[®], acquistato da Sigma-Aldrich; le matrici alimentari, cacao, latte in polvere e amido di mais sono state fornite dall'azienda TECNO CM mentre farina, zucchero e riso sono stati acquistati in un supermercato locale.

3.2 STRUMENTAZIONE

Per la quantificazione degli analiti nelle prove di estrazione, sul campione reale e di estrazione spinta è stato impiegato un gascromatografo Thermo Scientific Trace 1300 accoppiato ad uno spettrometro di massa Thermo Scientific ISQ LT (Fig. 15).

La colonna utilizzata per la separazione degli analiti è una colonna capillare DB5-5 ms, di lunghezza 30 m, diametro interno 0.25 mm e 0.25 μ m di spessore, acquistata dalla ditta Phenomenex. L'iniettore è stato posto ad una temperatura di 250 °C, con split flow di 30 mL/min ed un time splitless di 1 min. Il flusso del gas carrier è stato impostato a 1.0 mL/min.



Fig. 15: strumento GC-MS utilizzato

La rampa di temperatura è stata fissata a partire da 40 °C, mantenuta per 1 min, prima di alzarsi fino ad arrivare a 135 °C, con una velocità di 5 °C/min, mantenuta per 0.1 min. Infine,

con una velocità di 8 °C/min si sono raggiunti i 230 °C, rimanendo in questa condizione per 12.1 min.

Nella linea di trasferimento tra GC e spettrometro di massa si è impostata una temperatura di 290 °C. Gli analiti sono stati ionizzati tramite impatto elettronico in modalità positiva, con energia di ionizzazione di 70.0 eV e con una temperatura di 290 °C. Per non acquisire anche il segnale del solvente d'analisi si è impostato un solvent delay di 5 min.

Sono state effettuate scansioni Full Scan e tramite modalità SIM (Single Ion Monitoring).

La prima ha un range m/z tra 40 e 300, con uno scan time di 0.28 s e uno scan rate di 999.9 amu/s. I rapporti m/z utilizzati in modalità SIM, invece, sono: 41, 42, 55, 57, 65, 66, 69, 71, 72, 82, 85, 88, 93, 105, 114, 130, 133, 205, 220 con uno scan time di 2.08 s.

3.3 RETTE DI TARATURA

Per realizzare un'analisi quantitativa è essenziale costruire le rette di taratura degli analiti in esame, ovvero delle curve, i cui punti correlano una concentrazione nota a un segnale rilevato dallo strumento, e che permettono quindi, durante l'analisi di un campione, di risalire alla sua concentrazione a partire dal segnale registrato.

Gli standard impiegati per questa procedura sono: acetiltributilcitrato, anilina, bis(2-etilesil)adipato, 1,4-butandiolo, BHT e come standard interno lo stirene. Le miscele di analiti (Fig.16) sono state preparate con concentrazioni diverse e analizzate al GC-MS in modalità SIM, permettendo di costruire le rette i cui grafici sono stati riportati in Appendice, associando alla concentrazione il valore dell'area del picco corrispondente nel cromatogramma.

Sono state preparate 11 soluzioni mix di standard degli analiti a concentrazione 0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50, 2.50, 3.00, 5.00 mg/L, ottenendo per ogni molecola 11 punti di calibrazione. Ogni soluzione è stata replicata per tre volte al GC-MS.

3.4 PROCEDURA PER LA PROVA DI MIGRAZIONE SU SIMULANTE ALIMENTARE

La procedura si articola in tre fasi: il contatto tra matrice alimentare e manufatto, l'estrazione degli analiti e l'analisi dell'estratto.

Dalla guarnizione poliuretanicca sono state campionate tre lastrine di dimensione 4.0 x 4.0 cm, ognuna delle quali è stata posta a contatto con 0.6400 g di simulante alimentare in un becker (Fig. 17) cercando di disporle con una superficie di contatto maggiore possibile; in questo modo si è rispettato il rapporto tabulato area superficiale: massa di matrice = 1 dm² : 4 g, e i campioni sono stati lasciati a contatto in stufa a 70°C per 72 ore.



Fig. 17: porzioni della guarnizione a contatto con Tenax®

Al termine delle 72 ore i campioni sono stati rimossi dalla stufa e il simulante alimentare è stato recuperato trasferendolo in delle beute.

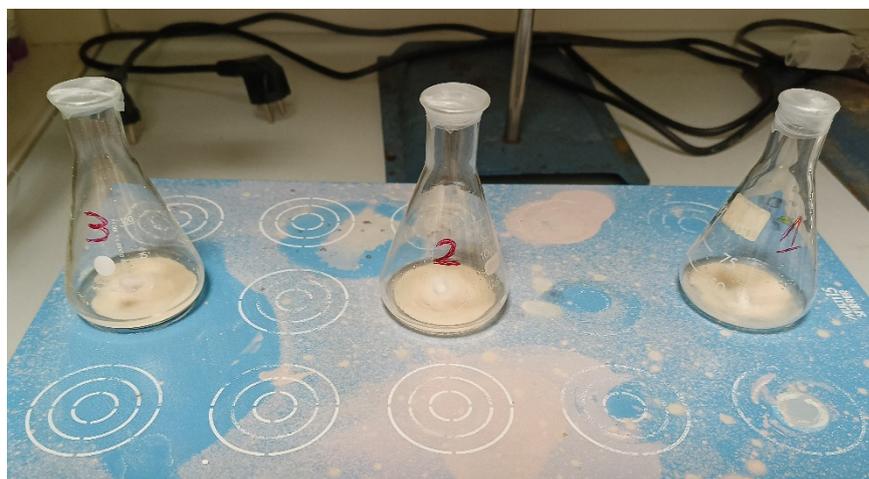


Fig. 18: estrazione del Tenax® in acetone

Ogni campione è stato sottoposto a due estrazioni consecutive (Fig. 18), da un'ora ciascuna, con 7.0 mL di acetone: al termine sono stati recuperati gli estratti in provette Falcon da 50 mL separandoli dal residuo solido; le provette sono state sottoposte a centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti per sedimentare ulteriori residui. Si è recuperato il surnatante dalle provette per ogni campione, il quale è stato ulteriormente filtrato, con filtro in PTFE avente

porosità pari a 0.22 μm ; dalla soluzione così ottenuta si è prelevata un'aliquota per il GC-MS. Per ciascuna replica genuina sono state fatte tre repliche di analisi al GC-MS.

3.5 PROCEDURA PER LA PROVA DI MIGRAZIONE SU ALIMENTI REALI

La procedura delle prove di contatto con matrici alimentari è la stessa descritta nelle prove di migrazione con il Tenax®, anche per questo caso sono state eseguite tre repliche genuine per ognuno dei sei alimenti utilizzati, e di ogni replica genuina sono state eseguite tre repliche di analisi al GC-MS.



Fig. 19: matrici alimentari usate durante le prove

3.6 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO TOTALE DELLA GUARNIZIONE

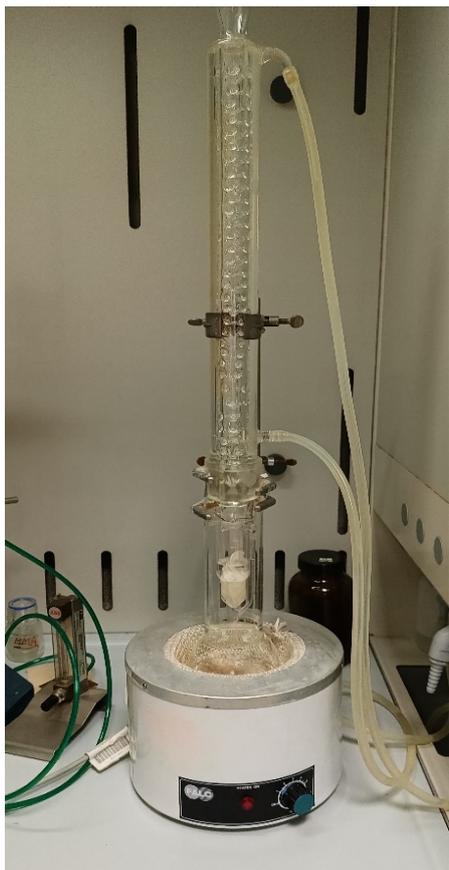


Fig. 20: estrazione totale in Kumagawa

La determinazione del contenuto totale è stata eseguita tramite l'utilizzo di un Kumagawa (Fig. 21).

La procedura prevede il prelievo di un campione di circa 3.00 g di materiale, che viene tagliato in pezzi delle dimensioni di circa 1.0x0.5 cm posti all' interno del ditale del Kumagawa, avvolti con della carta da filtro per formare un fagotto. Il campione è stato lasciato a reflusso per 6 ore nel Kumagawa estraendolo con 200 mL di acetone; una volta raggiunto il raffreddamento dell'estratto, questo è stato recuperato e pesato in un matraccio, dal quale è stata poi prelevata l'aliquota da analizzare posta in una fiala da GC.

Per ogni replica genuina sono state fatte tre repliche di analisi al GC-MS

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il presente lavoro si basa su una serie di tesi precedenti il cui scopo era di sviluppare una metodica per andare a determinare e quantificare la migrazione di NIAS da manufatti in poliuretano verso gli alimenti con cui erano posti a contatto. Lo studio di questo fenomeno è importante poter andare a tutelare la salute umana, in quanto alcune delle molecole presenti nel materiale hanno effetti nocivi. I progetti precedenti sono stati volti a sviluppare la procedura, ottimizzarne ogni passaggio, capire le rese di estrazione di ogni passaggio e migliorarli.

In questo lavoro di tesi si è andati ad applicare per l'analisi di campioni reali, l'intera metodica oramai ottimizzata, al fine di determinare i livelli di migrazione di alcuni NIAS verso il simulante alimentare previsto dalla normativa (Tenax®) e verso alimenti reali.

Si è valutato se la migrazione negli alimenti reali, che sono abitualmente in contatto con la guarnizione poliuretana, segua gli stessi meccanismi di diffusione o dia origine a risultati che debbano essere valutati diversamente per poter essere più certi della sicurezza dei materiali. Inoltre, nell'ottica di una valutazione del rischio e di una comprensione approfondita del materiale analizzato, è stata condotta una determinazione del contenuto totale del manufatto plastico.

4.1 MESSA A PUNTO DEL METODO

La calibrazione è stata eseguita con le miscele standard descritte nel paragrafo 3.3, in Fig. 21 è riportato a titolo di esempio il cromatogramma della soluzione standard a 5ppm. Lo stirene non fa parte degli analiti ricercati ma è utilizzato come standard interno.

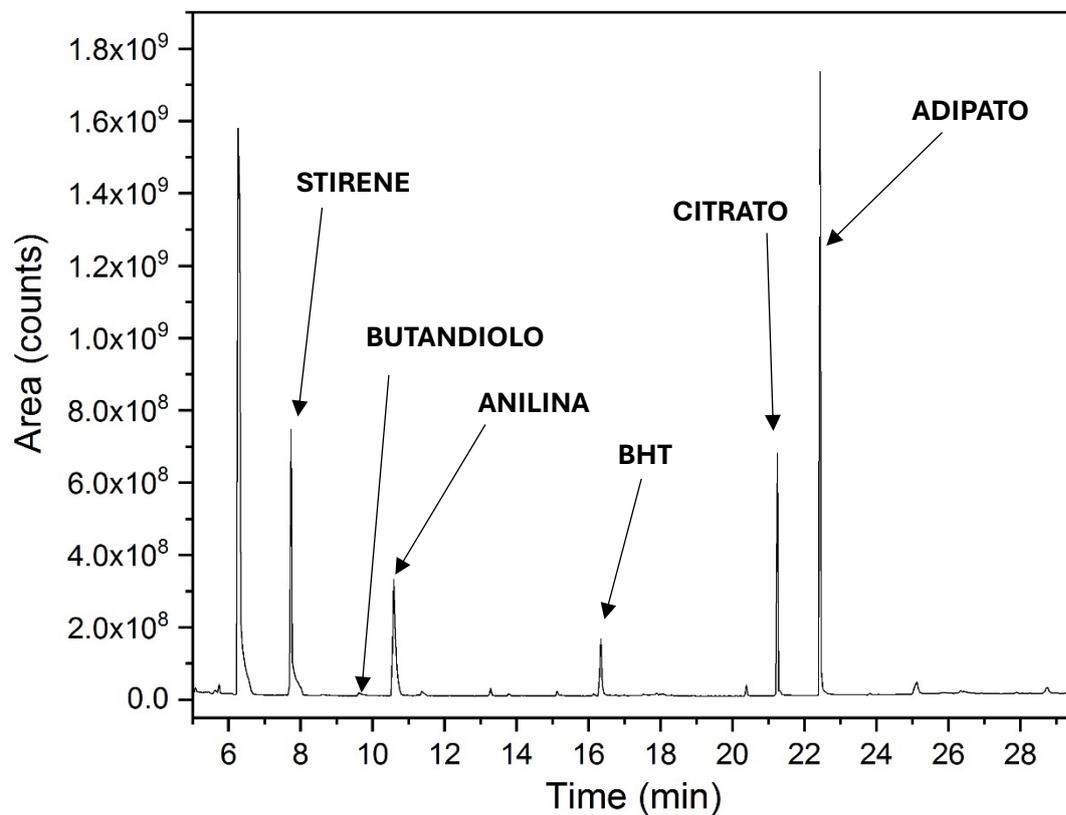


Fig. 21: cromatogramma acquisito in modalità full mass di una miscela per la costruzione delle rette di taratura. Le concentrazioni degli analiti sono: stirene 5 ppm, 1,4-butandiolo, anilina 5 ppm, BHT 5 ppm, acetiltributiltrato 5 ppm, bis(2-etilesil)adipato 20 ppm.

Considerando l'intero intervallo di concentrazioni indicate nel paragrafo "Materiali e Metodi" le rette di taratura ottenute (di cui si riporta un esempio in Fig.22) ci evidenziano una non linearità su tutto l'intervallo.

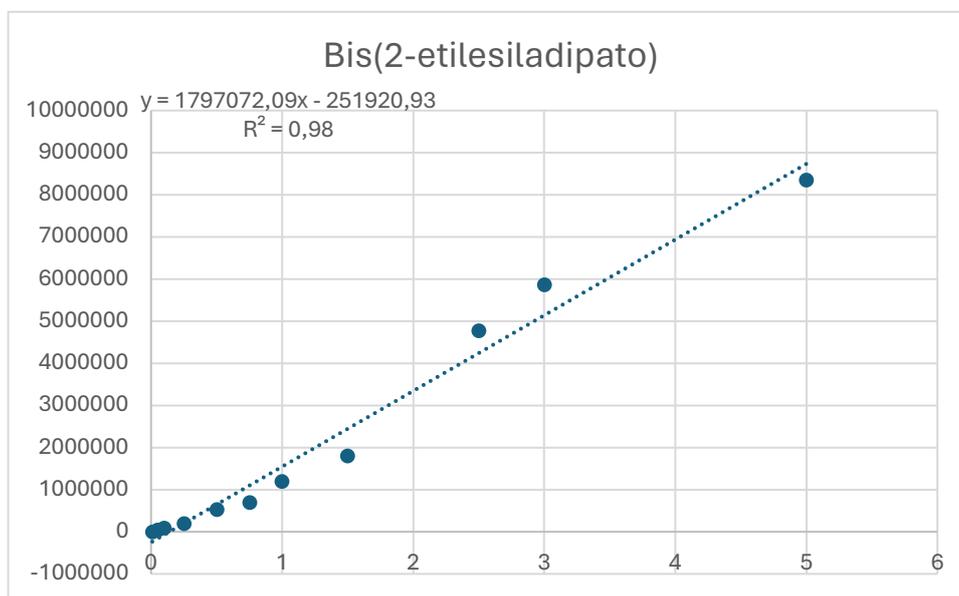


Fig.22: retta di taratura del bis(2-etilesil)adipato

Si osserva che l'intervallo considerato è troppo ampio e ci sono almeno due intervalli di linearità con sensibilità diversa; pertanto, a seconda della concentrazione del campione reale si andrà a utilizzare la retta di calibrazione opportuna.

Le equazioni delle rette sono riportate nelle seguenti tabelle 2 e 3

ANALITA	EQUAZIONE RETTA	R ²	INTERVALLO DI LINEARITA' (mg/L)
1,4-butandiolo	103310x - 61020	0.9692	0.01-5.00
Anilina	5E+06x - 110666	0.9952	0.01-0.75
BHT	1884385,2x + 54628,6	0.9998	0.01-0.75
Acetiltributilcitrato	305464x - 4580,8	0.9944	0.01-0.75
Bis(2-etilesil)adipato	972030x - 7254,5	0.9859	0.01-0.75

Tab. 2: rette di taratura basse concentrazioni

ANALITA	EQUAZIONE RETTA	R ²	INTERVALLO DI LINEARITA' (mg/L)
Anilina	6E+06x - 1E+06	0.9858	1.0-5.0
BHT	9E+06x - 1E+06	0.9980	1.0-5.0
Acetiltributilcitrato	416201x + 166471	0.9665	1.0-5.0
Bis(2-etilesil)adipato	2E+06x - 548822	0.9675	1.0-5.0

Tab. 3: rette di taratura alte concentrazioni

LOD e LOQ sono stati determinati mediante la sensibilità della retta di taratura per ogni analita e sono riportati in Tabella 4

ANALITA	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
BUTANDIOLO	0,5	1,7
ANILINA	0,005	0,017
BHT	0,005	0,017
CITRATO	0,001	0,003
ADIPATO	0,005	0,016

Tab. 4: LOD ed LOQ degli analiti cercati

4.2 DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO TOTALE

L'estrazione spinta serve a valutare la quantità totale di analiti effettivamente presenti nel campione di guarnizione poliuretanic. Questo permette, affiancandolo ai risultati delle prove di contatto, di stabilire se la migrazione dei diversi analiti sia frutto di un'alta o bassa affinità con la matrice o del quantitativo presente nella guarnizione e quindi del loro impatto possibile sulla salute.

I campioni in esame sono due guarnizioni in poliuretano prodotte a partire da diverse formulazioni fornite dall'azienda TECNO-CM.

Una guarnizione è stata prodotta nel 2021 (Fig. 23 dx) e l'altra nel 2023 (Fig. 23 sx). Saranno indicate con la data da qui in avanti.



Fig. 23: guarnizioni poliuretaniche fornite dall'azienda, quella del 2023 (sinistra) e quella del 2021 (destra)

La prova è stata eseguita su entrambi i manufatti polimerici in esame, e di ognuno sono state fatte due repliche genuine.

I campioni estratti relativi alla guarnizione del 2021 sono stati analizzati prima tali quali e poi sottoposti a diluizione 1:25 in quanto i valori di concentrazione relativi a 1,4-butandiolo e acetiltributilcitrato si trovavano al di fuori dell'intervallo della retta di taratura.

Nella tabella 5 vengono riportati i risultati delle analisi per le due guarnizioni espressi in mg/kg per le sostanze in esame:

ANALITA	GUARNIZIONE 2021		GUARNIZIONE 2023	
	mg/Kg	DEV. STD.	mg/Kg	DEV. STD.
BUTANDIOLO	1405	166	149	23
ANILINA	13	1	12,1	0,2
BHT	7,7	0,8	51	2
CITRATO	6003	468	30	2
ADIPATO	0	0	180	14

Tab. 5: risultati estrazione spinta dei due manufatti plastici

Queste prove mostrano anzitutto che l'unico analita a non essere presente è il bis(2-etilesil)adipato nella guarnizione più vecchia. L'anilina risulta essere presente in entrambi i materiali in concentrazioni molto simili, 1,4-butandiolo e BHT si mostrano più abbondanti nel materiale più recente, dove si rileva anche una diminuzione del contenuto di acetiltributilcitrato rispetto al materiale precedente. Le deviazioni standard di alcuni analiti risultano elevate, probabilmente perché il campione reale non è molto omogeneo.

Questo ci permette quindi di affermare che la diversa migrazione degli analiti nel simulante alimentare rifletta anzitutto la diversa composizione dei due materiali polimerici.

4.3 PROVE DI MIGRAZIONE SU SIMULANTE ALIMENTARE

Le prove di contatto con il campione reale permettono di definire l'entità della migrazione degli analiti dal manufatto poliuretano.

Le prove sono state condotte seguendo la normativa europea, quindi utilizzando il Tenax® come simulante alimentare e riproducendo in maniera più realistica possibile le condizioni più drastiche che si possono verificare operativamente; i risultati potranno essere confrontati con i limiti di legge riportati in tabella 6.

ANALITA	1,4-BUTANDIOLO	ANILINA	BHT	ACETILTRIBUTILCITRATO	BIS-2-ETILESILADIPATO
LIMITE DI LEGGE	5 mg/dm ²	0.01 mg/dm ²	3 mg/dm ²	60 mg/dm ²	18 mg/dm ²

Tab. 6: limiti di legge per gli analiti

Dato che la procedura completa di estrazione richiede più passaggi, nell'applicare la metodica finale verranno anche applicati tutti i fattori di correzione che sono stati ricavati mediante il calcolo delle rese di estrazione dei singoli passaggi.

In tabella 7 si osserva che gli analiti anilina, BHT, acetiltributilcitrato e bis(2-etilesil)adipato migrano nel simulante, con differenze nelle quantità di molecole tra i due manufatti che possono essere attribuite alle differenti concentrazioni riscontrate all'interno delle guarnizioni e a una diversa disponibilità alla migrazione degli analiti dovute all'invecchiamento del campione poliuretano.

A supporto di questa tesi abbiamo già osservato il fenomeno nei lavori in precedenza, che è legato alla maturazione del materiale che va incontro a ulteriore reticolazione. Nel caso della guarnizione del 2021 quindi, i valori di migrazione delle molecole potrebbero essere maggiori di quelli ottenuti in questo lavoro nel momento in cui venisse testata poco dopo essere stata prodotta. Questo potrebbe comportare un rischio maggiore per gli alimenti posti a contatto.

L'analita 1,4-butandiolo risulta assente nel Tenax® per entrambi i campioni, anche se è presente nella formulazione ed è stato determinato nell'estrazione totale. La spiegazione potrebbe essere che la migrazione non avviene per una non affinità della molecola con la matrice Tenax®.

Il bis(2-etilesil)adipato è assente solo nella guarnizione del 2021, ed essendo anche assente nella relativa estrazione spinta si può dedurre che non fa parte della composizione del manufatto.

Di seguito sono illustrati i risultati delle prove di migrazione di entrambe le guarnizioni sul Tenax®:

ANALITA	GUARNIZIONE 2021		GUARNIZIONE 2023	
	mg/dm ²	DEV. STD.	mg/dm ²	DEV. STD.
BUTANDIOLO	0	0	0	0
ANILINA	0,1810	0,0003	0,18003	0,00003
BHT	0,20	0,08	2,3	0,7
CITRATO	12	5	0,205	0,002
ADIPATO	0	0	1,8	0,5

Tab. 7: risultati prova di migrazione delle guarnizioni nel Tenax®

Dal confronto con i limiti di legge si evince che i valori ottenuti per gli analiti BHT, acetiltributilcitrato e bis(2-etilesil)adipato si attestano a valori più bassi del massimo consentito, mentre l'anilina risulta essere abbondantemente superiore al suo relativo limite.

4.4 PROVE DI MIGRAZIONE SU ALIMENTI REALI

La prova di contatto con alimenti reali è stata eseguita sulla guarnizione poliuretanicca del 2021. Le matrici analizzate sono state cacao, latte in polvere, amido, zucchero, farina e riso, al fine di vedere se c'è una differenza di migrazione dovuta alle caratteristiche chimico fisiche dell'alimento in confronto con quelle della matrice.

Le prove di estrazione valutate mediante le rette di calibrazione esterna hanno portato ai risultati mostrati in Tab. 8, anche in questo caso è stata effettuata la correzione dei dati in base alle rese di estrazione del lavoro precedente.

ANALITA	1,4-BUTANDIOLO		ANILINA		BHT		ACETILTRIBUTILCITRATO		BIS(2-ETILESIL)ADIPATO	
	mg/dm ²	DEV. STD.	mg/dm ²	DEV. STD.	mg/dm ²	DEV. STD.	mg/dm ²	DEV. STD.	mg/dm ²	DEV. STD.
MATRICE	0	0	0	0	0,5	0,2	0	0	5	2
CACAO	0	0	0	0	0,006	0,001	0,0530	0,0007	0,027	0,002
LATTE IN POLVERE	0	0	0	0	0,016	0,007	0,2	0,1	0,9	0,3
AMIDO	0	0	0	0	0	0	0,0465	0,0005	0,053	0,018
ZUCCHERO	0	0	0	0	0,019	0,007	0,0323	0,0002	0,18	0,02
RISO	0	0	0	0	< LOQ	0	0,0382	0,0007	0,21	0,05
FARINA	0	0	0	0						

Tab. 8: risultati prove di migrazione nelle diverse matrici alimentari

Innanzitutto, vediamo che solamente gli analiti BHT, acetiltributilcitrato e bis(2-etilesiladipato) sono stati identificati negli estratti, mentre abbiamo assenza di anilina e 1,4-butandiolo. Data la presenza di anilina nelle prove di contatto con il Tenax®, possiamo dire che la molecola non migra nelle matrici alimentari o lo fa in quantità non rilevabili dalla strumentazione; nel caso dell'1,4-butandiolo vale lo stesso discorso della molecola precedente, in quanto è presente nell'estrazione spinta dei manufatti.

Andando a confrontare i valori di migrazione degli analiti con i limiti di legge, vediamo che tutte le molecole hanno concentrazioni al di sotto della soglia, rendendo il materiale a norma.

I dati ricavati mostravano la presenza di bis(2-etilesiladipato) in ognuna delle matrici analizzate, nonostante la molecola non risultasse presente nell'estrazione totale. Considerando questo fenomeno, si è deciso di preparare campioni per ciascuna matrice alimentare utilizzando il metodo delle aggiunte standard. Ogni campione consisteva in una frazione definita del bianco della matrice alimentare, combinata con una quantità specifica di standard del bis(2-etilesiladipato).

Le prove condotte hanno rivelato un effetto matrice additivo nelle polveri alimentari, che causava una sovrastima variabile della concentrazione del bis(2-etilesiladipato). Ne

possiamo dedurre che il picco considerato come adipato non è tale ma è dovuto a un picco interferente della matrice.

Se andiamo poi a confrontare i dati delle matrici alimentari con quelli della migrazione sul Tenax® della stessa guarnizione vediamo che, a eccezione del valore del BHT nel cacao, le quantità di analiti che migrano nelle diverse matrici sono minori rispetto al simulante alimentare. Questo sembrerebbe confermare le evidenze della letteratura¹⁷ sull'argomento riguardo la sovrastima della migrazione da parte del Tenax®.

Nelle tesi precedenti è stata condotta un'analisi merceologica degli alimenti, caratterizzando l'umidità (Tab. 9) e il contenuto di grassi (Tab. 10) per valutare la possibile correlazione tra questi parametri e l'entità della migrazione. Tuttavia, confrontando le caratteristiche delle matrici con le quantità di analiti migrati, non sono emerse correlazioni significative riguardo all'entità della migrazione delle molecole. Questo conferma quanto i parametri in questione non sembrano, alla luce delle informazioni finora raccolte, avere un ruolo determinante sul fenomeno della migrazione.

UMIDITÀ PERCENTUALE			
MATRICE	METODO NORMATO	DEV. STD	TGA
Latte in polvere	3,6	0,05	4,5
Zucchero	0,016	0,003	/
Riso	9,0	0,3	8,8
Farina	12,5	0,1	9
Amido	11,79	0,01	9,9
Cacao	6,4	1,8	5,6

Tab. 9: valori percentuali di umidità ottenuti tramite metodo normato e TGA

PERCENTUALE DI GRASSI			
MATRICE	SOXHLET	ROSE-GOTTLIEB	VALORI TABULATI
Latte in polvere	0,6	1	0,9
Zucchero	/	/	/
Riso	0,5	/	0,3
Farina	0,8	/	1
Amido	0	/	0,3
Cacao	21,8	/	25

Tab. 10: percentuali di grassi degli alimenti

5. CONCLUSIONI

Il progetto di tesi si inserisce come ultimo tassello di un lungo percorso che ha come obiettivo lo sviluppo di una metodica analitica per determinare e quantificare la migrazione di NIAS da manufatti in poliuretano a contatto con alimenti, per poter valutare la sicurezza dei materiali e i possibili rischi per la salute umana. La metodica è stata sviluppata e ottimizzata nei suoi vari passaggi sempre rispettando la normativa vigente.

In questo lavoro di tesi si è andati ad applicare per l'analisi di campioni reali, l'intera metodica oramai ottimizzata, al fine di determinare i livelli di migrazione di cinque analiti (1,4-butandiolo, anilina, BHT, acetiltributilcitrato e bis(2-etilesil)adipato) verso il simulante alimentare previsto dalla normativa (Tenax®) e verso alimenti reali. Un ulteriore aspetto da vagliare era se la migrazione degli alimenti reali, che entrano in contatto con la guarnizione poliuretana, segua gli stessi meccanismi di diffusione o se generi risultati che richiedano una valutazione diversa, al fine di garantire una maggiore sicurezza dei materiali.

Le prove di contatto sul simulante alimentare hanno evidenziato la buona capacità della metodica nell'andare a determinare le quantità di analita che effettivamente migrano, non mostrando le criticità che erano state segnalate utilizzando il metodo precedente.

In queste prove è emersa un'ampia differenza nel rilascio della migrazione tra le diverse guarnizioni che ne rispecchia la composizione. L'analita 1,4-butandiolo si è dimostrato non affine sia al Tenax® e sia alle matrici alimentari, in quanto presente in formulazione ma non nella migrazione; discorso simile per l'anilina, che risulta non migrare solo nelle matrici alimentari. Inoltre è stata delineata una generale sovrastima delle quantità di analita migrate da parte del simulante rispetto alle matrici alimentari utilizzate.

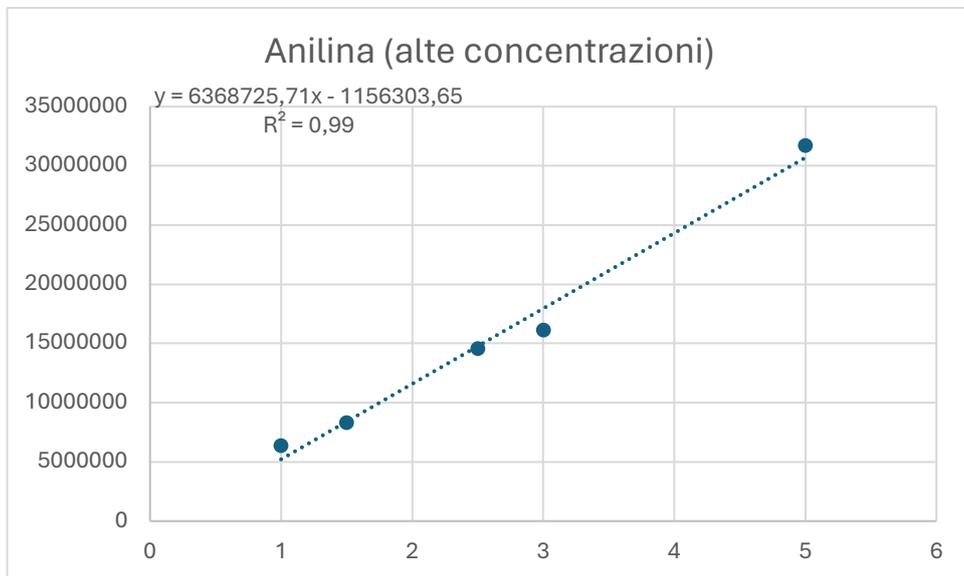
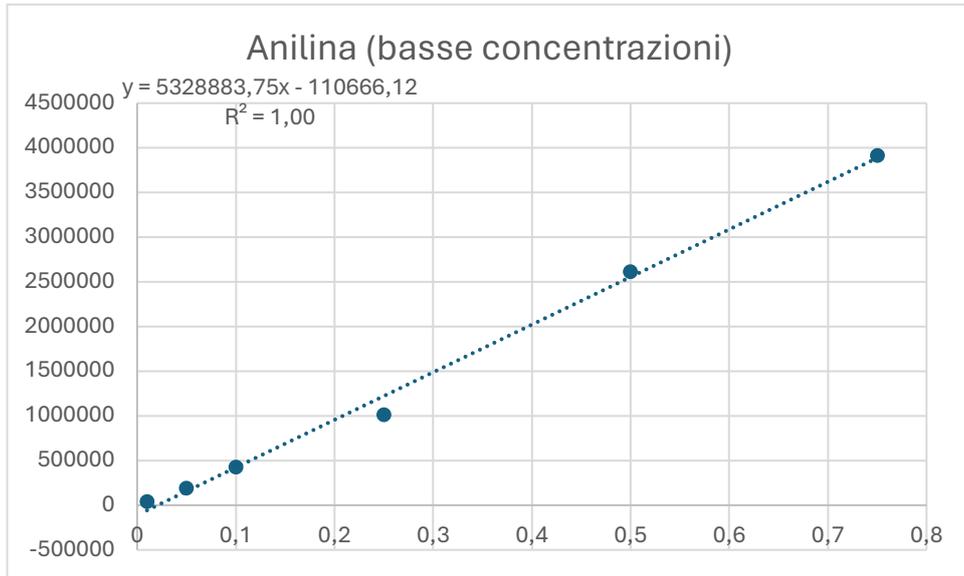
Pertanto, sebbene il Tenax fornisca dati utili per la valutazione del rischio, è fondamentale integrare questi risultati con quelli ottenuti da test condotti su alimenti reali per ottenere una valutazione più precisa e rappresentativa della migrazione di sostanze chimiche.

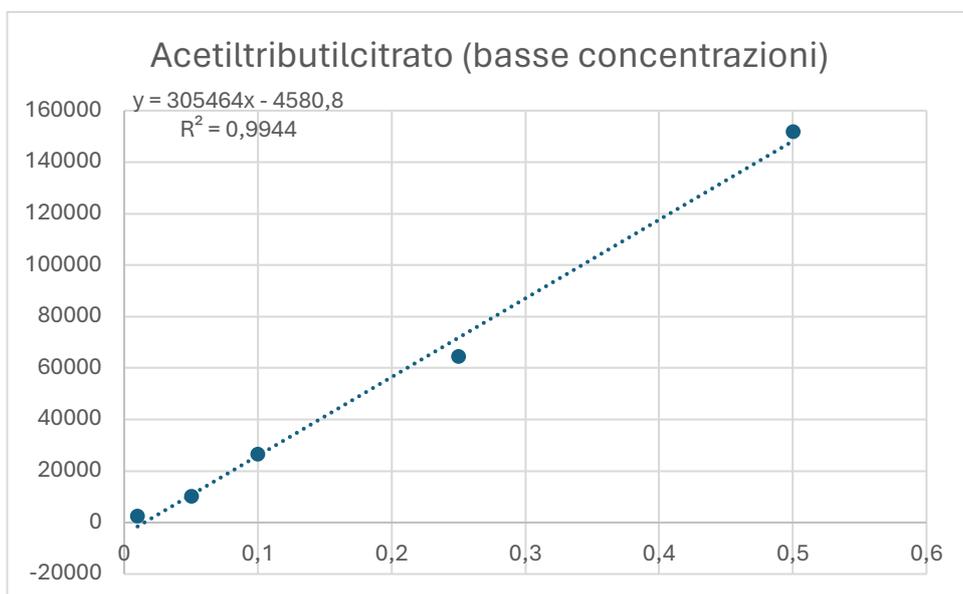
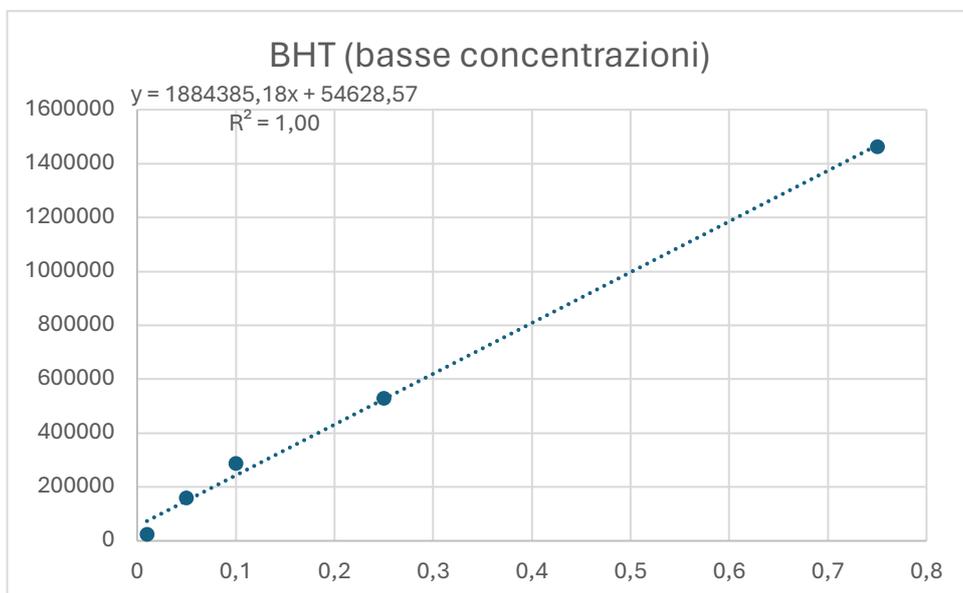
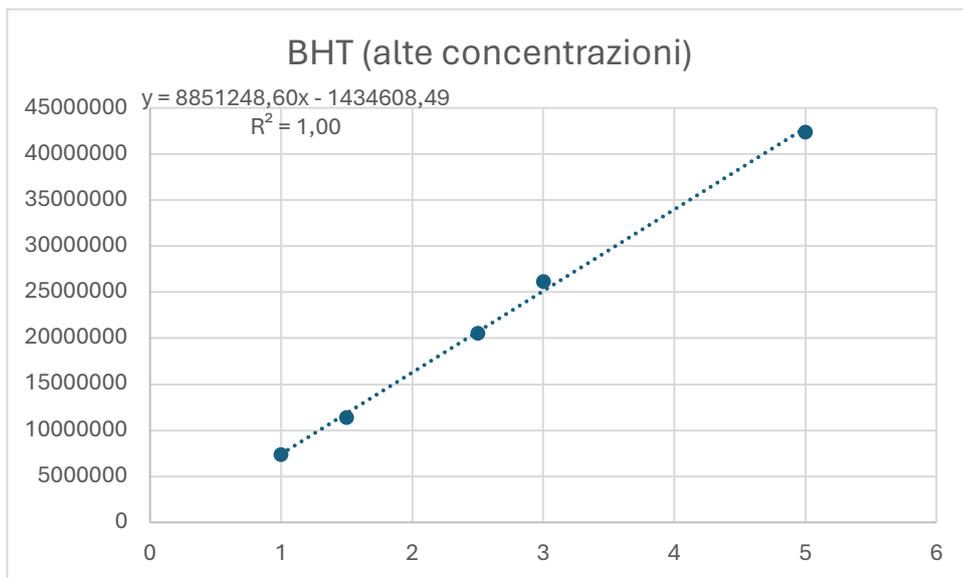
Il lavoro ha messo in evidenza che quindi lo studio per la salubrità e sicurezza dell'utilizzo di questi materiali va sempre condotto con metodi totalmente ottimizzati, secondo normativa ma con la stima di tutte le rese di estrazione e dei possibili effetti matrice.

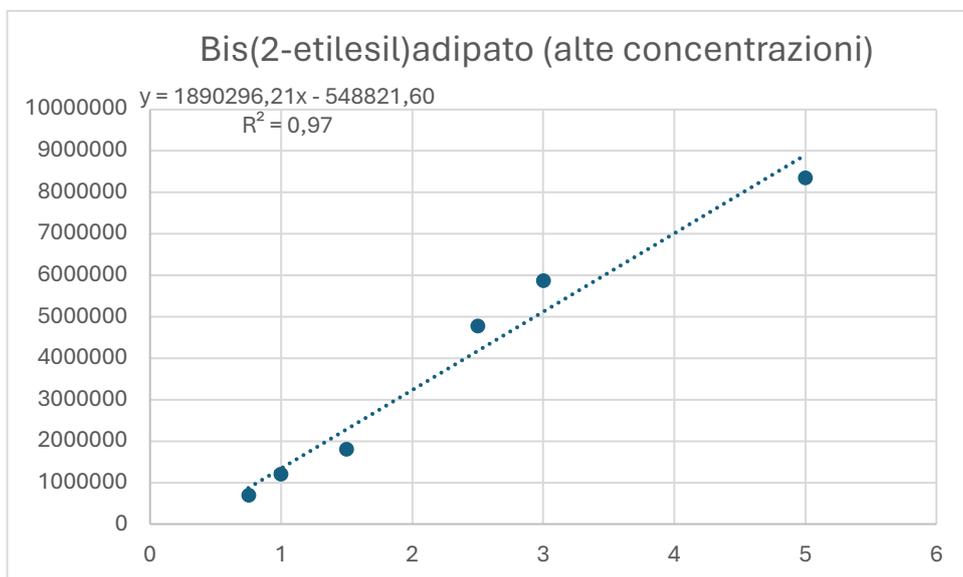
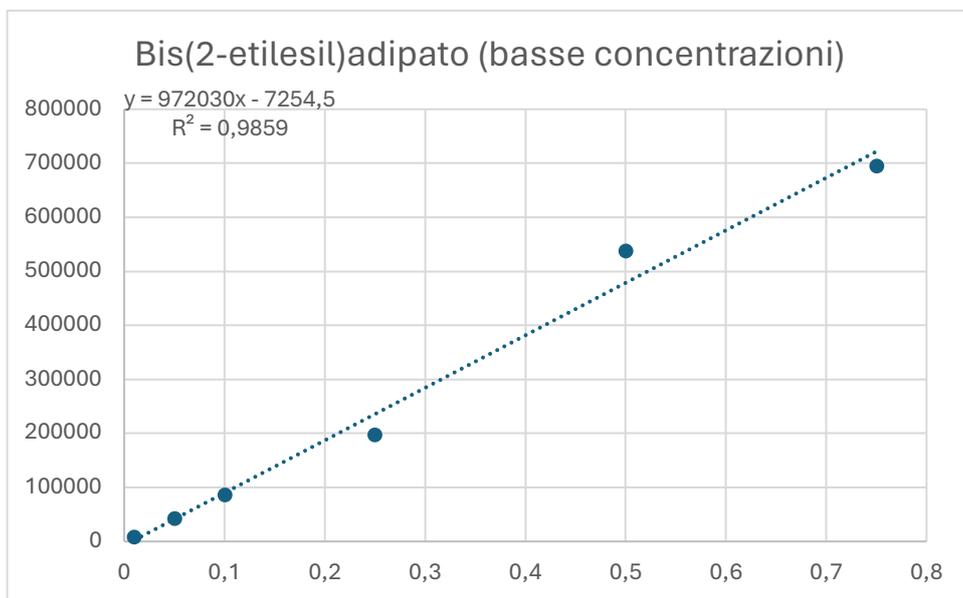
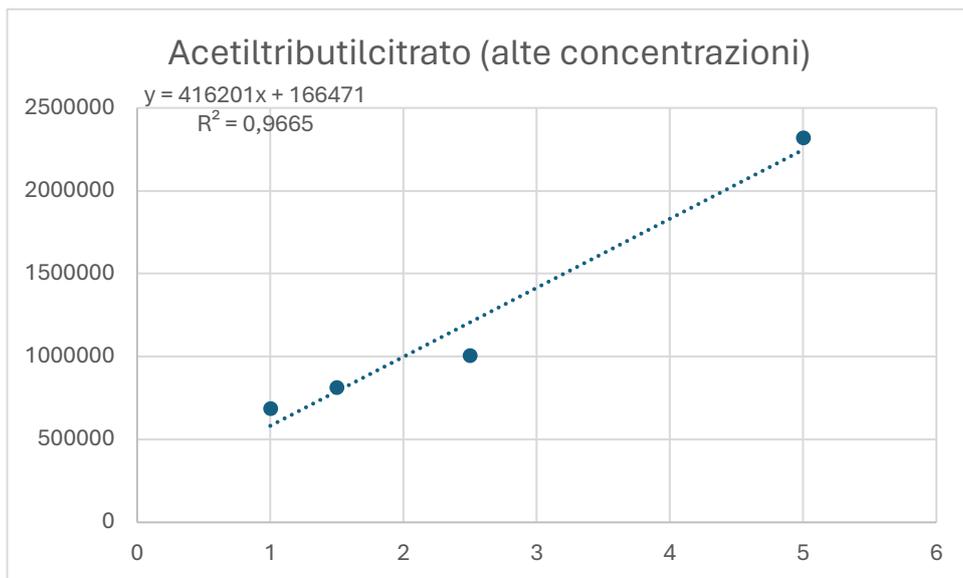
Alla luce dei risultati ottenuti con la metodica ottimizzata, potrebbe essere interessante effettuare nuovamente uno studio sulla penetrazione degli analiti nelle matrici reali in funzione dello strato di assorbente.

6.APPENDICE: rette di taratura

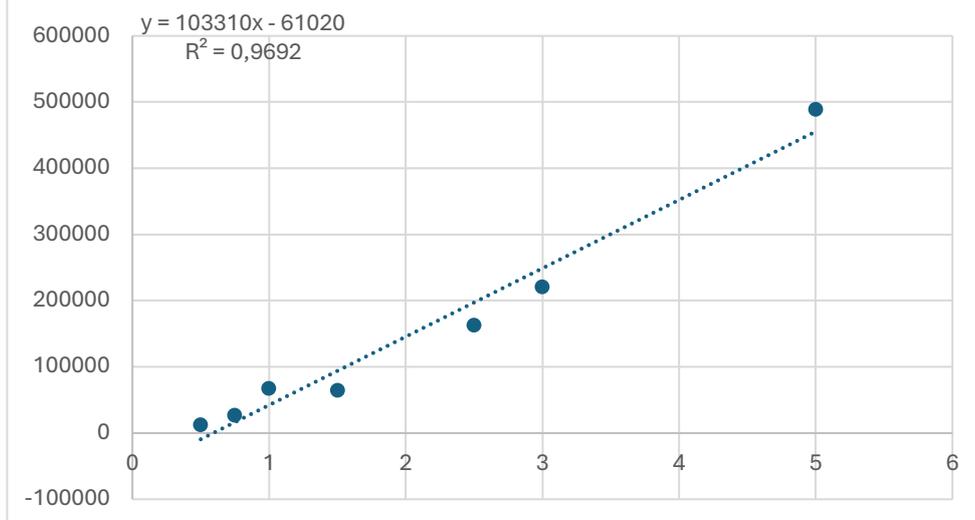
Nella seguente appendice vengono mostrate le rette di taratura utilizzate per il calcolo quantitativo degli analiti (da Fig. 23 a Fig. 27). I punti riportati sono dati dalla media delle ripetizioni effettuate alla stessa concentrazione.







1,4-butandiolo



7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- [1] Reinas, I., et al. "Migration of two antioxidants from packaging into a solid food and into TenaxR." *Food Control* 28.2 (2012): 333-337.
- [2] <https://www.foodpackagingforum.org/food-packaging-health/non-intentionallyadded-substances-nias>
- [3] Crouch, Stanley R., Douglas A. Skoog, and F. James Holler. *Principles of instrumental analysis*. Cengage Learning, 2018.
- [4] <https://blog.perkinelmer.com/posts/gas-chromatography-explained-what-it-is-andhow-it-works/>
- [5] "Gascromatografia – Una introduzione" (Mondello, s.d.)
- [6] <https://blog.perkinelmer.com/posts/chromatography-explained-how-massspectrometry-adds-information-to-your-analysis/>
- [7] <https://www.nist.gov>
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [9] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R0010>
- [10] Nerin, C., E. Contin, and E. Asensio. "Kinetic migration studies using Porapak as solid-food simulant to assess the safety of paper and board as food-packaging materials." *Analytical and bioanalytical chemistry* 387 (2007): 2283-2288.
- [11] Triantafyllou, Vasileios I., Konstantoula Akrida-Demertzi, and Panagiotis G. Demertzis. "Migration studies from recycled paper packaging materials: development of an analytical method for rapid testing." *Analytica Chimica Acta* 467.1-2 (2002): 253-260.
- [12] Reinas, I., et al. "Migration of two antioxidants from packaging into a solid food and into TenaxR." *Food Control* 28.2 (2012): 333-337.
- [13] Silva, A. Sanches, et al. "Migration and diffusion of diphenylbutadiene from packages into foods." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57.21 (2009): 10225-10230.
- [14] Goulas, Antonios E., et al. "Migration of di (2-ethylhexyl) adipate and acetyltributyl citrate plasticizers from food-grade PVC film into sweetened sesame paste (halawa tehineh): Kinetic and penetration study." *Food and chemical toxicology* 45.4 (2007): 585-591.
- [15] Silva, A. Sanches, et al. "Mass transport studies of model migrants within dry foodstuffs." *Journal of Cereal Science* 48.3 (2008): 662-669.
- [16] L. Blanco-Zubiaguirre, I. Zabaleta, A. Prieto, M. Olivares, O. Zuloaga, M.P. Elizalde. "Migration of photoinitiators, phthalates and plasticizers from paper and cardboard materials into different simulants and foodstuffs" *Food chemistry* 344 (2021).

[17] E. L. Bradley, L. Castle and D. R. Speck. "A Comparison of the Migration of 'Spiked' and 'Intrinsic' Substances from Paper and Board into Raisins and into Tenax as a Food Simulant." *Packaging Technology and Science*. 2015; 28: 509–517.