



DIPARTIMENTO
SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA



izs

istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata



Workshop 20 Maggio 2021

**Primo Workshop annuale
del Laboratorio Nazionale di Riferimento per il trattamento
degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti**

Videoconferenza

Istituto Superiore di Sanità



*Attività svolta nell'ambito del CEN/CT/275/WG8
«Irradiated foods»*

Emanuela Bortolin

Istituto Superiore di Sanità, Roma

CEN/CT/275/WG8 «Irradiated foods»

Il WG8 “irradiated food” è il gruppo di lavoro europeo del CEN che si occupa dei protocolli per l'identificazione degli alimenti irradiati.

Il gruppo, costituito da esperti provenienti da diversi paesi europei, si riunisce periodicamente per riesaminare i metodi standardizzati per eventuali revisioni/aggiornamenti.

Esperti per l'Italia dal 2018:

Dott.ssa Concetta Boniglia DSANV – ISS

Dott.ssa Emanuela Bortolin FAST - ISS

Riunioni:

22 giugno 2018, 11th Meeting, Berlino

14 settembre 2018, riunione gruppo di lavoro *ad hoc* per la revisione di alcuni standard, via web

10 settembre 2020, 12th Meeting, via web

Tabella 2. Metodi di identificazione degli alimenti irradiati recepiti dall'UNI

Norma UNI	Tipologie alimentari	Metodo
EN 1784:2003	pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaya e mango	GC degli idrocarburi
EN 1785:2004	pollo e maiale, uova	GC/MS dei 2-alchilciclobutanoni
EN 1786:1996	pollo, manzo, trote contenenti osso	ESR dell'idrossiapatite
EN 1787:2000	pistacchi, paprika, fragole	ESR della cellulosa
EN 1788:2001	erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali	TL
EN 13708:2001	fichi, mango e papaya secchi, uvetta	ESR degli zuccheri
EN 13751:2009	erbe, spezie, molluschi e crostacei	PSL
EN 13783:2001	erbe e spezie	DEFT/APC
EN 14569:2004	pollo	Lisato di limulus amebocita / Batteri gram negativi
EN 13784:2001	vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie	DNA comet assay

ATTIVITA' SVOLTA NEL CEN/CT/275/WG8

11th Meeting, Berlino, 22 giugno 2018

I partecipanti hanno evidenziato che tutti gli standard, citati nella legislazione, rischiano di diventare obsoleti, e si sono accordati per contattare la Commissione (DG SANTE) per chiedere di introdurre nuovi programmi di ricerca sui metodi di identificazione. E' stata inviata la richiesta ma al momento non c'è stato nessun riscontro da parte della UE.

Per la maggior parte degli **standard** è stata ribadita la decisione, presa nella precedente riunione del 2017, di **conferma per altri 5 anni**.

Sulla base della letteratura più recente, sono stati esaminati in dettaglio i metodi EN 1785 (determinazione dei 2-alchilciclobutanoni GC/MS), EN 13708 (ESR zuccheri) ed EN 1787 (ESR cellulosa).

EN 1785:2004 (GC/MS determinazione dei 2-alchilciclobutanoni) - specificità del metodo

Sono stati illustrati i risultati dello studio condotto dal Joint Research Centre (JRC) (EU) sulla presenza naturale di 2-ACB in campioni di anacardo e noce moscata (precedentemente riportata in letteratura da Variyar et al., 2008). Lo studio non ha confermato la presenza dei prodotti radiolitici nei campioni non irradiati. I partecipanti sono stati informati anche sullo sviluppo di protocolli di analisi basati sulla gascromatografia di massa più efficienti e veloci del metodo attuale. A questo stadio non è stata ravvisata la necessità di revisionare lo standard.

EN 13708:2001 (ESR zuccheri) – specificità del metodo

Sulla base di studi, condotti recentemente in Germania, che hanno evidenziato la possibilità di ottenere falsi positivi applicando il metodo a campioni macinati o allo zucchero puro, gli esperti hanno deciso di sottoporre il metodo a revisione e hanno iniziato la discussione sulle modifiche da apportare.

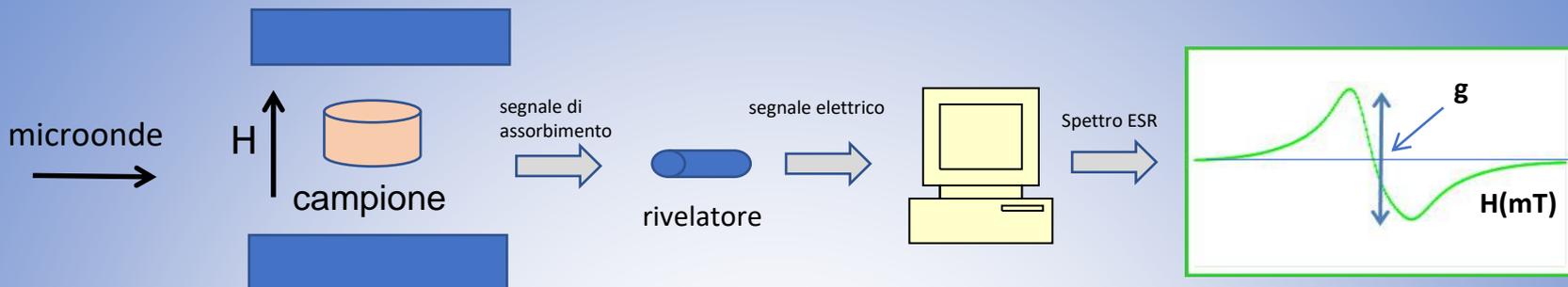
EN 1787:2000 (ESR cellulosa) - specificità del metodo

Nel corso della riunione sono stati presentati i risultati di un lavoro recente condotto da due laboratori (in Francia e Germania) nel quale si evidenzia che la frutta a guscio (noci e nocciole) in seguito al trattamento sbiancante (bleaching) mostra segnali ESR del tutto simili a quelli indotti dall'irraggiamento determinando così la possibilità di avere classificazioni non corrette (falsi positivi). Si è deciso di sottoporre a revisione il metodo ed è stato costituito a tale scopo un gruppo di lavoro.

Nelle due riunioni successive via web sono state discusse le modifiche da apportare agli Standard EN 1787 e EN 13708 e sono state concordate le versioni revisionate. Le nuove proposte sono state inviate al CEN/TC/ 275 per l'approvazione ed entro la scadenza è stata espressa la nostra posizione (favorevole alla revisione).

*Revisione dei metodi EN 1787 ed EN 13708
(risonanza di spin elettronico – ESR)*

Tecnica ESR



Esistono sostanze, dette «paramagnetiche», che, quando vengono introdotte in un campo magnetico, sono in grado di assorbire energia dalle microonde (banda X). Questa proprietà deriva dalla presenza nelle loro molecole di elettroni spaiati che subiscono modifiche in seguito all'interazione con il campo magnetico. I **radicali** fanno parte di questa categoria. La tecnica della risonanza di spin elettronico o **tecnica ESR** è **in grado di rivelare la presenza di queste sostanze in un campione** attraverso la misura dell'assorbimento di energia dalle microonde che viene registrato al variare dell'intensità del campo magnetico. Il risultato della misura è il cosiddetto «spettro ESR» del campione che presenta, in genere, forme diverse a seconda della sostanza esaminata. Ogni segnale presente nello spettro è caratterizzato da un parametro, **il fattore g**, che ne individua la posizione rispetto al campo magnetico.

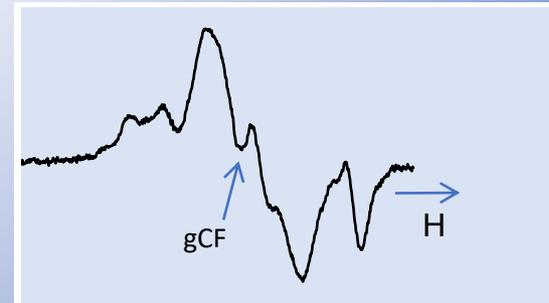
Le radiazioni ionizzanti inducono, in modo specifico negli alimenti, radicali che possono essere utilizzati come *marker dell'irraggiamento*. I radicali radioindotti producono spettri ESR con forme ben identificabili e valori di *g* tipici. Il riconoscimento di questi segnali nello spettro ESR consente di classificare il campione come irradiato.



Spettro ESR di ossa di pollo irradiate



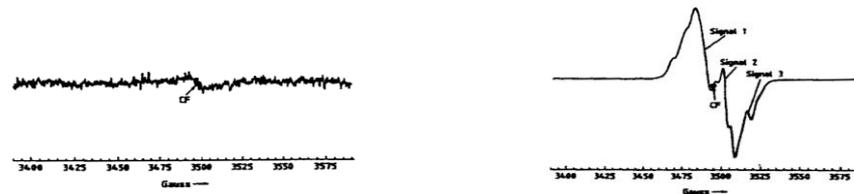
Spettro ESR di gusci di noci irradiate



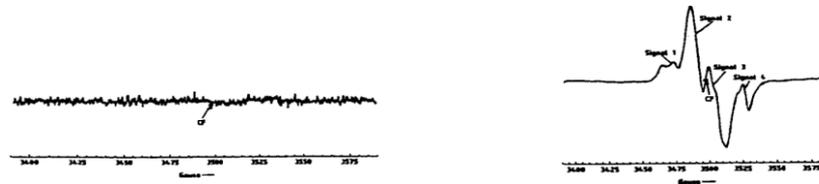
Spettro ESR di uvetta irradiata

Il metodo EN 13708

- Il metodo, basato sulla tecnica della risonanza di spin elettronico (ESR), è stato validato per fichi secchi, uvetta, mango e papaya essiccati ma si applica anche ad altre matrici vegetali contenenti zuccheri in forma cristallina.
- I campioni **non irradiati** possono presentare, nel loro spettro ESR, un **debole segnale simmetrico allargato** ($g=2,004\pm 0,001$) dovuto a radicali intrinseci.
- I campioni irradiati presentano invece uno spettro multicomponente, con valore $g=2,0035\pm 0,0010$ al centro dello spettro, che può assumere **forme e ampiezze diverse** a seconda del tipo di zuccheri presenti nella matrice e della loro struttura: **7,4-7,8 mT per campioni di mango e papaya essiccati, 8,7-9,1 mT per fichi secchi e uvetta.**



Typical ESR spectra of unirradiated and irradiated (3 kGy) dried mangoes



Typical ESR spectra of unirradiated and irradiated (3 kGy) dried figs

Tratto da: **EUROPEAN STANDARD** Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy (ESR) 2001

Limiti del metodo EN 13708

Le caratteristiche dello spettro ESR di un campione irradiato dipendono dal tipo di zuccheri mono- o di- saccaridi presenti nella matrice alimentare sotto esame.

La rivelazione dei segnali radioindotti non è influenzata significativamente dalle condizioni di conservazione ed è possibile anche diversi mesi dopo l'irraggiamento.

L'applicabilità del metodo dipende dalla quantità di zuccheri in forma cristallina presenti nel campione. Se gli zuccheri sono assenti o presenti in quantità molto ridotte l'irraggiamento non produce radicali in numero sufficiente per essere rivelati con la tecnica ESR.

Di conseguenza, così come indicato nello Standard europeo,

la rivelazione di uno spettro ESR multicomponente fornisce prova dell'irraggiamento ma la sua assenza non costituisce evidenza che il campione non sia stato irradiato.

In accordo con quanto riportato nello Standard europeo, nel Piano Nazionale 2015-2018 viene specificato che si tratta di un “metodo da intendersi di conferma solo nel caso di risultato analitico positivo».

Nota: per controllare la sensibilità del campione potrebbe essere utile irradiarne una porzione (a una dose di quelle utilizzate per il trattamento) e ripetere l'analisi.

RISCHIO DI FALSI POSITIVI IN SEGUITO ALLA MACINAZIONE DEI CAMPIONI

A partire dal 2007 vengono pubblicati lavori (Thamaphat et al., 2007; Thamaphat, 2011; Ahn et al., 2012) che prospettano la possibilità di avere falsi positivi applicando il metodo EN 13708 alla frutta macinata. Si tratta di lavori eseguiti su zucchero di diversa origine in cui si evidenzia che la macinazione dei campioni induce nello spettro ESR segnali del tutto simili a quelli tipici dell'irraggiamento.

Nel lavoro di **Ahn et al. (2012)** si esaminano gli spettri ESR di campioni di **zucchero grezzo e raffinato** sottoposti a **macinazione manuale** (mortaio e pestello) o **elettrica** (macinino elettrico) per tempi da **0,5 a 6 minuti**. Per confronto vengono registrati anche gli spettri di campioni degli stessi zuccheri **irradiati** con **Co-60** a dosi tra **1 e 50 Gy**. **Spettrometro JES-TE 300 Jeo Co. (banda X)**.

Gli spettri ESR dello zucchero irradiato presentano le stesse caratteristiche di quelli che si registrano con la frutta irradiata (quelli dello zucchero raffinato sono più intensi di quelli registrati con lo zucchero grezzo).

Gli spettri ESR dei campioni sottoposti a macinazione sono identici nella forma e nel valore di g centrale a quelli dei campioni irradiati ma presentano un'intensità molto minore.

Le intensità dei segnali indotti dalla macinazione sono più elevate nello zucchero raffinato, aumentano con la durata della macinazione ma non dipendono dalla grandezza del grano/frammento.

I segnali ESR registrati nello zucchero raffinato dopo 6 minuti di macinazione elettrica corrispondono a quelli indotti dall'irraggiamento a 10 Gy.

REVISIONE EN 13708

Gli esperti hanno concordato di riportare nella sezione dedicata alla preparazione del campione l'avvertenza che il campione non deve essere macinato e di segnalare tra le limitazioni del metodo la possibilità di avere **falsi positivi** dovuti a segnali ESR indotti meccanicamente nello zucchero, inserendo nella bibliografia la letteratura di riferimento.

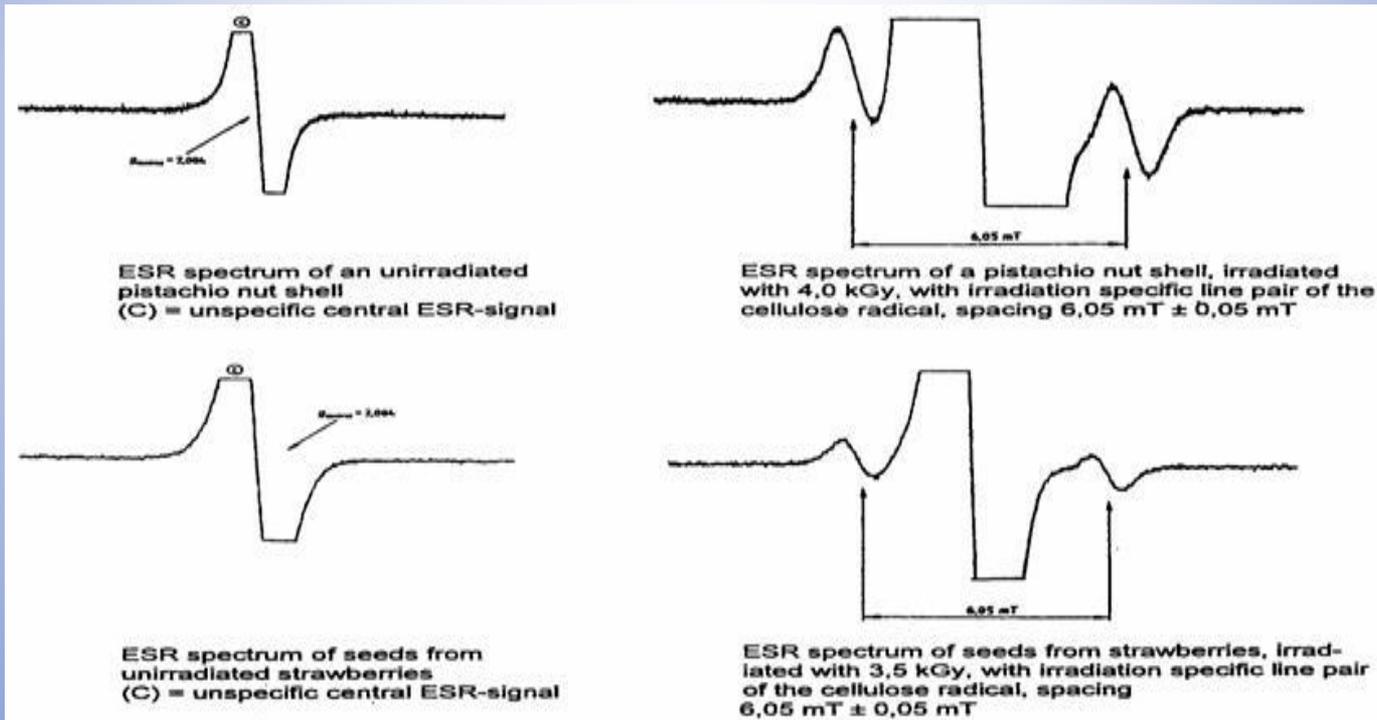
È stato inoltre deciso di specificare che lo scopo di questo standard non è quello di identificare lo zucchero cristallino puro.

La versione revisionata è stata approvata ed è in corso di pubblicazione.

In accordo con quanto riportato nello Standard europeo, nel **Piano Nazionale 2020-22** viene specificato che esiste il «rischio di falsi positivi se si macinano i campioni».

Il metodo EN 1787

- Il metodo, basato sulla tecnica della risonanza di spin elettronico (ESR), è stato validato per pistacchi, paprika e fragole ma si applica anche ad altre matrici vegetali contenenti cellulosa.
- I campioni **non irradiati** presentano, nel loro spettro ESR, un **segnale simmetrico** dovuto a radicali intrinseci (semi-chinoni e/o acidi grassi).
- Nello spettro ESR dei campioni **irradiati** ai lati **del picco centrale**, notevolmente **più intenso**, compaiono **due picchi laterali (satelliti)**, molto **deboli** e disposti simmetricamente ad una distanza di **6.05±0.5 mT** l'uno dall'altro. I **picchi satelliti** costituiscono la **prova dell'irraggiamento**.



Tratto da: EUROPEAN STANDARD EN 1787 Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy (2000)

Limiti del metodo EN 1787

La rivelazione dei picchi laterali, che costituiscono la prova dell'irraggiamento, dipende dal **contenuto di cellulosa** e/o e dalle condizioni di conservazione (**umidità**) che incidono sulla ricombinazione dei radicali **responsabile del decadimento del segnale nel tempo**.

Inoltre, trattandosi di segnali generalmente deboli sulla rivelazione incidono anche le condizioni di misura e le caratteristiche dello spettrometro usato per la misura.

Tutto questo può generare **falsi negativi**.

Pertanto come indicato nello Standard europeo EN 1787 (2000):

L'identificazione nello spettro ESR dei segnali dei radicali della cellulosa fornisce prova dell'irraggiamento ma la loro assenza non costituisce evidenza che il campione non sia stato irradiato.

In accordo con quanto riportato nello Standard europeo, nel Piano Nazionale 2015-2018 viene specificato che si tratta di un **“metodo da intendersi di conferma solo nel caso di risultato analitico positivo”**.

RISCHIO DI FALSI POSITIVI DA GUSCI «SBIANCATI» CHIMICAMENTE

Nel 2006 viene pubblicato un lavoro (Butz and Hildbrand, 2006) che evidenzia il rischio di ottenere falsi positivi da gusci di noci e pistacchi sottoposti a trattamenti chimici di sbiancamento. Il lavoro è suggerito dai risultati controversi di analisi condotte su noci e pistacchi presenti sul mercato tedesco.

Nel periodo marzo-ottobre 2004 erano stati trovati sul mercato in Germania campioni di **noci e pistacchi** che risultavano **positivi applicando il metodo EN 1787 ai gusci** ma non erano dichiarati come tali in etichetta. L'analisi era stata ripetuta, su richiesta del distributore, con il **metodo** gascromatografico **GC/MS EN 1785** che **non aveva confermato** il risultato positivo. Il metodo **EN 1787** era stato poi ripetuto sulle **partizioni interne dei gusci** che risultavano **negative**.

Butz and Hildbrand (2006) sospettando si trattasse di un effetto dovuto alla pratica dello «**sbiancamento**» (**bleaching**) dei gusci diffusa in alcuni paesi (Stati Uniti) avviano uno studio su **noci e pistacchi**. Alcuni dei campioni vengono **irradiati (0.5, 1.0 e 5.0 kGy)** altri vengono **trattati con** soluzioni di **perossido di idrogeno** (acqua ossigenata) o **ipoclorito di sodio**.

Le analisi vengono eseguite con i metodi EN 1787 e GC/MS e ripetute nei 30 giorni successivi al trattamento. Il metodo EN 1787 evidenzia la presenza negli spettri ESR dei gusci i segnali tipici dei radicali della cellulosa anche nei campioni non irradiati ma **trattati con perossido di idrogeno**; il metodo EN GC/MS al contrario non dà evidenza di irraggiamento.

gusci irradiati	→	positivi con EN 1787, positivi con EN 1785
gusci «sbiancati»	→	positivi con EN 1787, negativi con EN 1785

I **segnali ESR** indotti nei **gusci** dall'irraggiamento **decadono** nel tempo

I **segnali ESR** indotti nei **gusci** dal **trattamento chimico** (perossido) rimangono **stabili** nel tempo.

STUDIO SU NOCI E NOCCIOLE «SBIANCATE» (Werner et al., 2020)

Werner et al. (2020) partendo dai risultati di Butz and Hildebrand (2006) avviano uno studio per verificare l'effetto dello «sbiancamento» sullo spettro ESR di campioni di noci e nocciole.

Metà dei campioni vengono irradiati (3, 6, 9 e 12 kGy) e l'altra metà trattati con perossido di idrogeno (acqua ossigenata).

2 laboratori partecipano allo studio: AERIAL (Strasburgo) e CVUA (Karlsruhe)

Spettrometri: ESR Magnetech MS 5000, X-Band; Escan Bruker, X-Band.

Le analisi vengono eseguite con il metodo EN 1787 e ripetute nei 12 mesi successivi al trattamento.

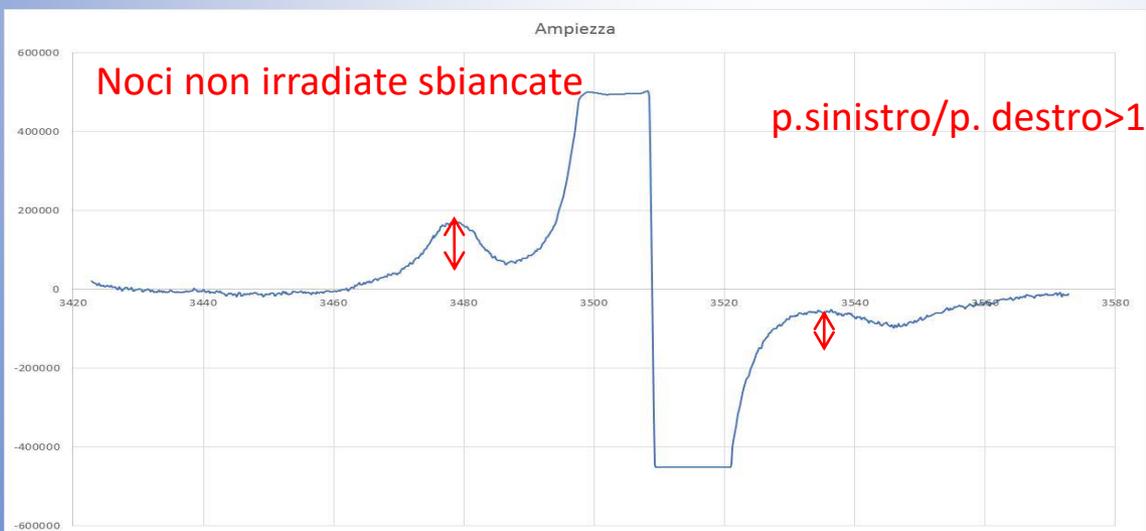
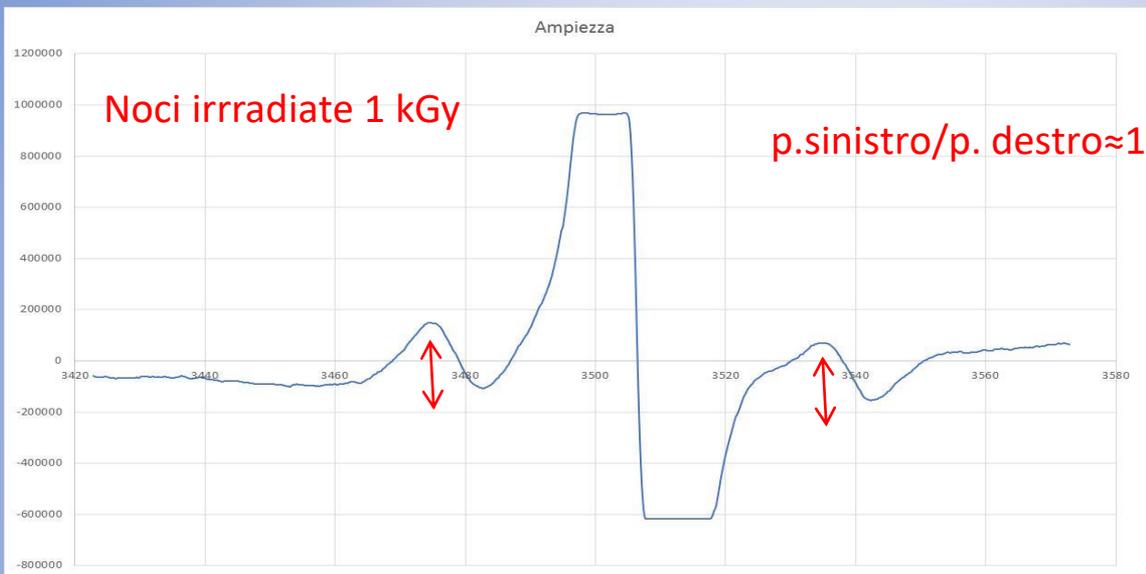
Il metodo EN 1787 evidenzia la presenza negli spettri ESR dei gusci dei segnali tipici dei radicali della cellulosa anche nei campioni non irradiati ma trattati con perossido di idrogeno.

I segnali ESR indotti dall'irraggiamento appaiono diversi da quelli indotti dal trattamento chimico (perossido). Le intensità dei picchi laterali sinistro e destro sono più o meno uguali negli spettri dei campioni radioindotti e diverse in quelli dei campioni trattati chimicamente.

gusci irradiati	→	positivi con EN 1787	-	p.sinistro/p. destro≈1
gusci «sbiancati»	→	positivi con EN 1787	-	p. sinistro/p. destro>1

Il limite inferiore risulta significativamente (95%) diverso da quello superiore (analisi statistica con ANOVA) per le nocciole e la maggior parte dei campioni di noci fino a 12 mesi dal trattamento chimico/irraggiamento.

Le intensità (altezze picco-picco) dei segnali laterali sinistro e destro sono più o meno uguali negli spettri dei campioni radioindotti mentre sono notevolmente diverse in quelli dei campioni trattati chimicamente.



Questi risultati suggeriscono un criterio per distinguere gli irradiati dagli «sbiancati» basato sulla valutazione del rapporto tra le intensità dei segnali laterali.

$\text{sin}/\text{des} \approx 1$ \rightarrow irradiati
 $\text{sin}/\text{des} > 1$ \rightarrow «sbiancati»

Va segnalato, tuttavia, che potrebbero esserci difficoltà nella misura delle altezze dei picchi satelliti che possono essere estremamente deboli e quindi difficili da rivelare con alcuni spettrometri ESR.

Difficoltà nel distinguere «sbiancati e irradiati» da «sbiancati ma non irradiati».

Il criterio va comunque sottoposto a validazione prima di essere applicato.

REVISIONE EN 1787

Gli esperti hanno concordato di segnalare tra le limitazioni del metodo la possibilità di avere **falsi positivi** dovuti a segnali ESR indotti dal trattamento chimico per lo sbiancamento dei gusci .

La versione revisionata è stata approvata ed è in corso di pubblicazione.

Nel **Piano Nazionale 2020-22**, in accordo con quanto riportato nello Standard europeo, viene specificato che esiste «rischio di falsi positivi con noci e nocciole trattate con sostanze chimiche per lo sbiancamento del guscio»

Conclusioni

- Segnalata alla UE la necessità di riprendere la ricerca sui metodi di identificazione degli alimenti irradiati nell'ambito di programmi di ricerca dedicati
- Confermate criticità nell'applicazione dei metodi EN 1787 ed EN 13708 ad alcune matrici - elaborate e approvate le versioni revisionate che verranno pubblicate a breve
- Approvati tutti gli altri metodi per l'applicazione nel controllo ufficiale fino alla prossima revisione
- Segnalati metodi alternativi basati su GC/MS più affidabili e veloci.

Bibliografia

Variyar P.S., Chatterjee S., Sajilata M.G., Singhal R.S., Sharma A. Natural existence of 2-Alkylcyclobutanones. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 pp. 11817-11823

Ahn J.-J., Akram K., Kwon. J. Electron Spin Resonance Analyses of Grinding- and Radiation-Induced Signals in Raw and Refined Sugars. *Food Anal. Methods*. DOI:10.1007/s12161-012-9364-z

Thamaphat K., Limsuwan P., Meejoo S. ESR Spectrometer as a Possible Tool for Rapid Analysis of Cane Sugar Purity. *Chin. Phys. Lett.* 2007, 24 (12) p. 3524. Available at: <http://iopscience.iop.org/0256-307X/24/12/064>

Thamaphat K. Electron spin resonance investigation of free radicals produced in pulverized non-irradiated sugar. *Int. J. Mod. Phys. B.* 2011, 25 (17) pp. 2383–2391

Butz B. and Hildebrand, A. Bleaching of Walnuts and Pistachios –Effects on the Detection of irradiated food by using ESR spectroscopy and GC/MS. *DLR.* 2006, 4 pp. 154–157

Werner, D., Straub, I., Zumsteeg, V., Kuntz, F. Identification of bleached and irradiated walnuts and hazelnuts by ESR spectroscopy, *Radiat. Phys.Chem.*, 173, August 2020
DOI:10.1016/j.radphyschem.2020.108882

GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE!

