



DIPARTIMENTO
SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA



Ministero della Salute



istituto zooprofilattico sperimentale
della puglia e della basilicata



Workshop 26 Maggio 2022

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

Videoconferenza

Istituto Superiore di Sanità



*Estensione del metodo EN 13751 (PSL) ad
alcune varietà di frutta*

Emanuela Bortolin

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il lavoro è stato svolto dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata (IZSPB) nell'ambito del progetto "Sviluppo di procedure analitiche basate sulla tecnica della luminescenza fotostimolata per l'identificazione di frutta fresca, essiccata e a guscio" finanziato dal Ministero della Salute.

L'obiettivo dello studio è stato quello di validare sulla frutta il metodo CEN EN 13751 basato sulla luminescenza fotostimolata (Photo-Stimulated Luminescence - PSL), già in uso in alcuni laboratori del controllo ufficiale per l'identificazione di molluschi e crostacei e diversi prodotti vegetali (aglio e cipolle, funghi e legumi essiccati, erbe, spezie e ingredienti per integratori a base di piante esclusi gli estratti vegetali).

Il metodo più idoneo per l'identificazione della frutta irradiata è il CEN EN 1788, basato sulla tecnica della termoluminescenza che richiede, però, tempi di analisi lunghi (estrazione dei silicati dalla matrice alimentare e doppia misura sullo stesso campione) e la disponibilità di una sorgente di radiazioni ionizzanti per la taratura del campione. Per alcune matrici di frutta vengono utilizzati anche il metodo CEN EN 13784 (DNA comet assay), il metodo HS-SPME GC-MS (messo a punto e validato dall'IZSPB) e i metodi CEN EN 13708 e 1787 basati sulla tecnica della risonanza di spin elettronico che, tuttavia, non forniscono sempre risultati affidabili.

Il metodo CEN EN 13751 consentirebbe uno screening rapido dei prodotti attraverso l'uso di uno strumento portatile di basso costo e facile da usare.

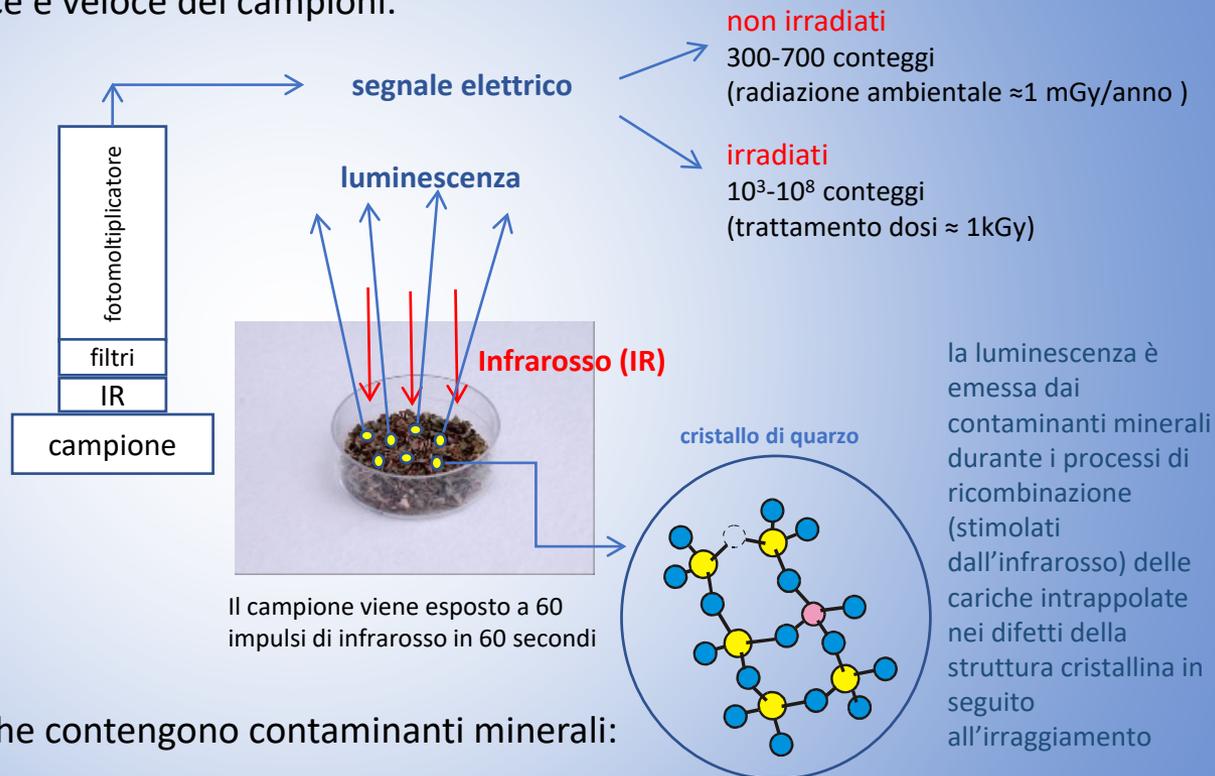
Il metodo CEN EN 13751: principio

Il metodo EN 13751 consente di identificare i prodotti irradiati attraverso la misura dell'intensità della luminescenza prodotta dal campione sotto stimolazione con radiazione infrarossa (luminescenza fotostimolata, Photo-Stimulated Luminescence - PSL).

Per le analisi si utilizza uno strumento di piccole dimensioni, basso costo e facile da usare che consente test rapidi dopo una preparazione semplice e veloce dei campioni.



la misura viene eseguita sul campione tal quale



Il metodo è applicabile agli alimenti che contengono contaminanti minerali:

- prodotti vegetali che crescono all'aria aperta (esposti alla polvere)
- frutti di mare che contengono sabbia nell'intestino o su gusci e carapace

Il metodo CEN EN 13751: campo di applicazione

Nel corso di test intercomparativi internazionali organizzati dal SURRC (Scozia, UK) il metodo è stato validato per gamberetti, erbe essiccate, spezie e condimenti vegetali.

ERBE SPEZIE E CONDIMENTI (40 specie diverse, 317 aliquote non irradiate, 345 aliquote irradiate)

Schema decisionale per la classificazione dei campioni con il metodo CEN EN 13751

conteggi $< T_1$ (700)	negativo	non irradiato
T_1 (700) $<$ conteggi $< T_2$ (5000)	intermedio	indeterminato
conteggi $> T_2$ (5000)	positivo	irradiato

Risultati test di validazione

Non Irradiati			Irradiati		
corretti	intermedi	falsi positivi	corretti	intermedi	falsi negativi
78,5 %	19,3%	2,2%	93%	6,7%	0,3%

elevato contenuto di minerali

(10^3 - 10^8 conteggi)

basso contenuto di minerali

Il metodo viene usato per lo screening dei campioni. I risultati intermedi e positivi richiedono una seconda analisi di conferma (anche con lo stesso metodo dopo irraggiamento in laboratorio a 1 kGy per controllare il contenuto di minerali)

Il metodo CEN EN 13751: campo di applicazione

ALTRE MATRICI VEGETALI

In linea di principio, il metodo EN 13751 può essere applicato a tutte le matrici vegetali che crescono esposte all'aria.

Nel Piano nazionale è indicato, oltre che per l'identificazione di erbe e spezie, anche per **funghi e legumi essiccati** (interconfronto nazionale - III round: funghi essiccati).

In letteratura sono riportati risultati relativi all'applicazione del metodo EN 13751 anche alla **frutta**. Si tratta, tuttavia, di un numero limitato di lavori in cui sono stati presi in considerazione alcuni tipi di prodotti. Sono state esaminate melagrane (Shahbaz et al., 2013), agrumi, kiwi, uva (Jo et al., 2006, 2008, 2015, 2020), banane, frutta essicata come albicocche, fichi, uvetta e diversi tipi di frutta a guscio (Chung et al. 2004; Mangiacotti et al., 2009; Jo et al., 2016; Bortolin et al., 2019).

In Bortolin et al. (2019) sono riportati anche i risultati di un interconfronto, eseguito nel corso di un progetto finanziato dal Ministero della Salute su alcune varietà di frutta fresca e a guscio, al quale hanno partecipato anche molti dei laboratori italiani impegnati nel controllo ufficiale.

I risultati ottenuti da autori diversi non sono sempre concordi. I dati riportati indicano, tuttavia, che la frutta essicata e a guscio risulta in genere più sensibile alle radiazioni ionizzanti rispetto a quella fresca con conteggi totali anche molto elevati per i campioni irradiati. I prodotti freschi mostrano una variabilità più marcata nella risposta dei campioni irradiati con conteggi molto spesso al di sotto della soglia di positività (se non addirittura negativi).

PROGETTO

Complessivamente sono state testate **15 matrici di frutta**: 7 di frutta fresca, 4 di frutta essiccata, 4 di frutta a guscio.

Studio preliminare

Sono state esaminate **10 matrici di frutta fresca(7) ed essiccata(3)** testando, quando possibile parti diverse del frutto (buccia, foglie, picciolo).

Test di validazione interlaboratorio

Sono state selezionate **8 matrici: 2 di frutta fresca, 2 di frutta essiccata e 4 di frutta a guscio** scelte tra quelle risultate promettenti nello studio preliminare e in test precedenti.

Al test hanno partecipato i **4 laboratori** del controllo ufficiale dotati della strumentazione e delle competenze necessarie: **ATS-Milano, ISS, IZS Lazio e Toscana, IZS Puglia e Basilicata.**

A ciascun laboratorio sono stati inviati **24 campioni** (8 non irradiati e 16 irradiati) e il modulo per l'inserimento dei dati.

Analisi: **ottobre – novembre 2021.**

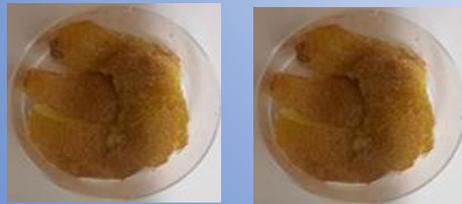
Invio del **report finale** con i risultati: 15 febbraio 2022.

Le analisi sono state ripetute (su nuove aliquote), a distanza di tempo, dall'ISS e dall'IZSPB per verificare l'applicabilità del metodo durante la *shelf life* del prodotto (in corso).

Studio preliminare

ananas
arance
clementine
kiwi
limoni
mango
papaya

datteri
prugne secche
uvetta



2 aliquote/campione

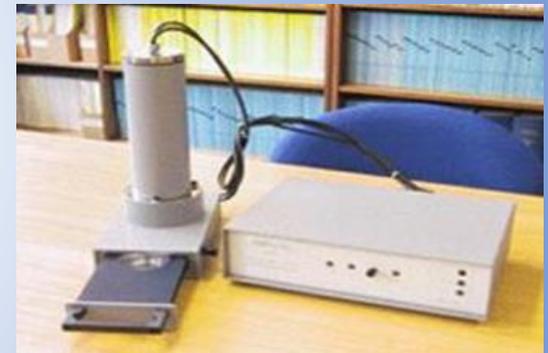
Per ogni matrice sono stati esaminati 3 campioni, uno non irradiato e due irradiati

0kGy 0,5 kGy 1 kGy

L'irraggiamento è stato effettuato con un **irraggiatore biologico a raggi X** della ditta RAD SOURCE inc, presso il laboratorio dell'IZSPB

Le misure sono state eseguite con il lettore PSL a singola stimolazione (IR) della SUERC (Scotland)

Le misure PSL sono state eseguite sul frutto intero o su parti di buccia poste all'interno di capsule Petri monouso con la parte esterna contenente i minerali rivolta verso l'alto (esposta all'IR).



2 aliquote/campione

Studio preliminare: risultati frutta fresca

Matrice	0 kGy		0,5 kGy		1 kGy	
	A	B	A	B	A	B
<i>Ananas (buccia)</i>	370	286	780	754	712	558
<i>Ananas (foglie)</i>	401	388	545	541	1069	802
<i>Arance</i>	478	491	31536	27947	25453	75104
<i>Clementine</i>	375	343	3235	465	1138	2985
<i>Kiwi</i>	396	357	35483	55697	15121	30808
<i>Limoni</i>	397	435	3005	2473	3691	2221
<i>Mango (buccia)</i>	258	489	7378	7918	17802	82463
<i>Mango (picciolo)</i>					269364	
<i>Papaya</i>	249	232	1327	4532	4265	3261

- variabilità nel contenuto di minerali (dovuta a buccia più o meno liscia e/o ai lavaggi)
- differenze anche tra aliquote dello stesso campione (contaminazione disomogenea sulla buccia)
- solo **arance** , **kiwi** e **mango** forniscono risposte positive dopo irraggiamento
- alcune parti del frutto sono più contaminate

Studio preliminare: risultati frutta essiccata

Matrice	0 kGy		0,5 kGy		1 kGy	
	A	B	A	B	A	B
<i>Datteri</i>	456	183	3988	5737	15827	7280
<i>Prugne secche</i>	494	366	857	1152	1774	3618
<i>Uvetta</i>	501	442	538058	725344	878725	839301

- l'uvetta irradiata risulta molto sensibile alle radiazioni ionizzanti - risultati positivi con conteggi molto elevati
- i datteri essiccati irradiati forniscono risultati ben al di sopra della soglia di positività solo a 1kGy
- le prugne essiccate irradiate forniscono risultati intermedi vicini alla soglia di negatività

Test interlaboratorio

Test intercomparativo per la validazione interlaboratorio su 8 matrici, 2 di frutta fresca, 2 di frutta essiccata e 4 di frutta a guscio:

arance, kiwi, fichi secchi, uvetta, arachidi, nocciole, noci e pistacchi

Per ogni matrice sono stati preparati 3 campioni, uno non irradiato e due irradiati:

0kGy

0,5 kGy

1 kGy

L'irraggiamento è stato effettuato con un **irraggiatore biologico a raggi X** della ditta RAD SOURCE inc, presso il laboratorio dell'IZSPB.

Al test hanno partecipato **4 laboratori** del controllo ufficiale: **ATS-Milano ISS IZSLT IZSPB**.

A ciascun laboratorio sono stati inviati **24 campioni** (8 non irradiati e 16 irradiati) opportunamente codificati per non rendere noto il trattamento effettuato.

E' stato chiesto di analizzare **4 aliquote** per campione di cui almeno una contenente, se possibile, anche parti del/o vicine al **picciolo**.



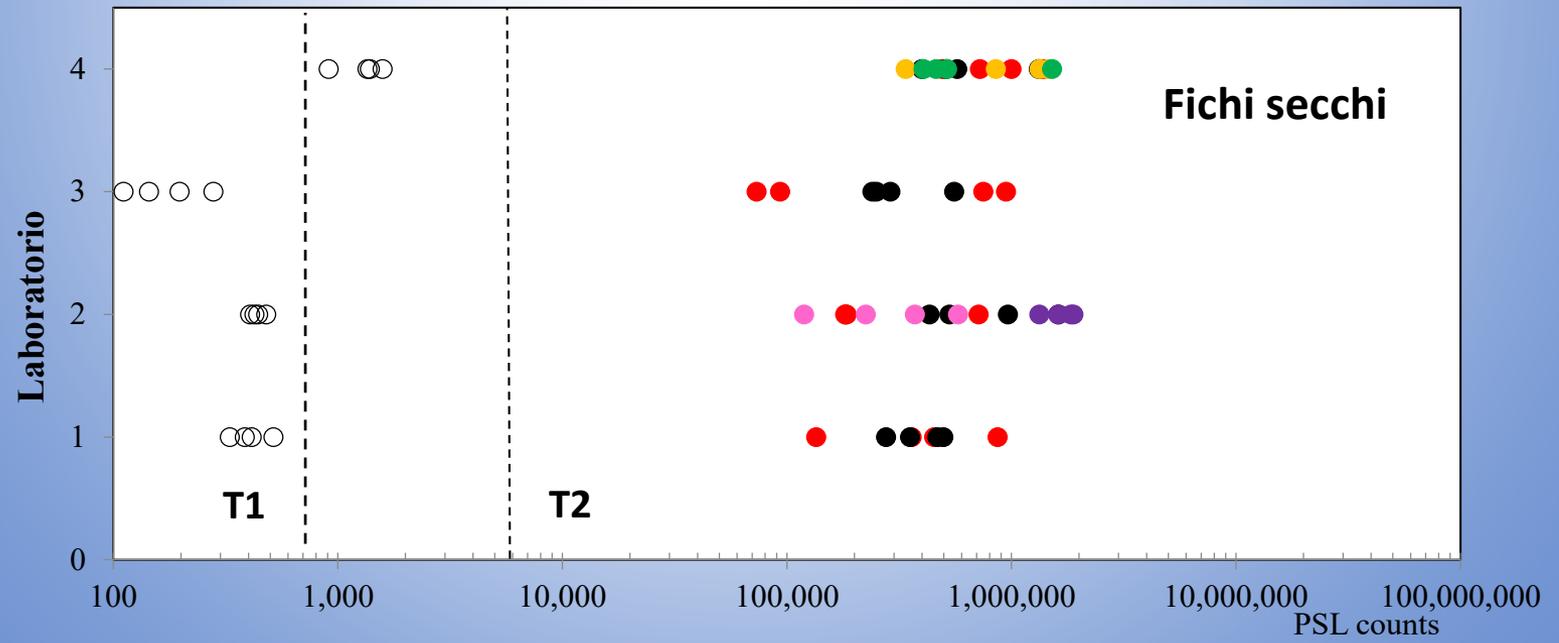
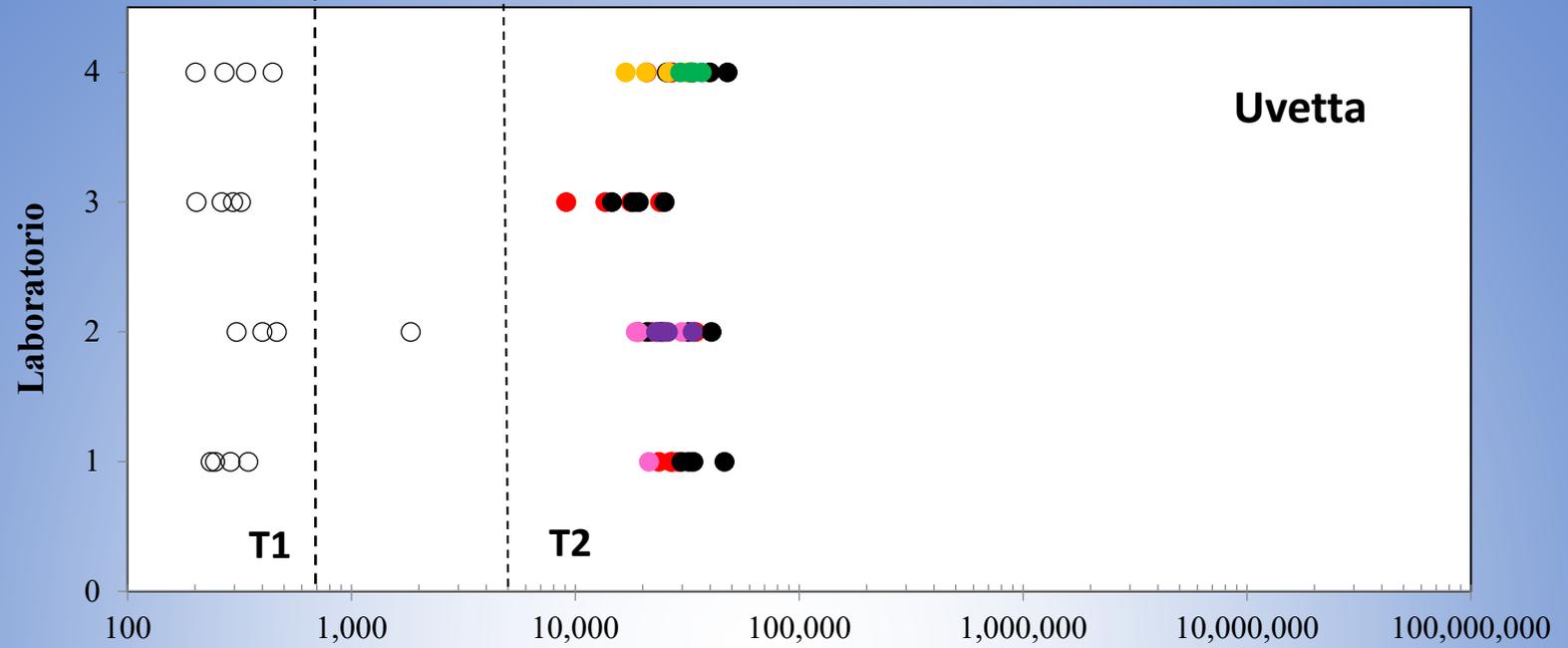
In totale sono stati esaminati **96 campioni di cui 32 non irradiati e 64 irradiati**.

Complessivamente sono state eseguiti **384 test**, **256** su aliquote di campioni irradiati e **128** su aliquote di campioni non irradiati.

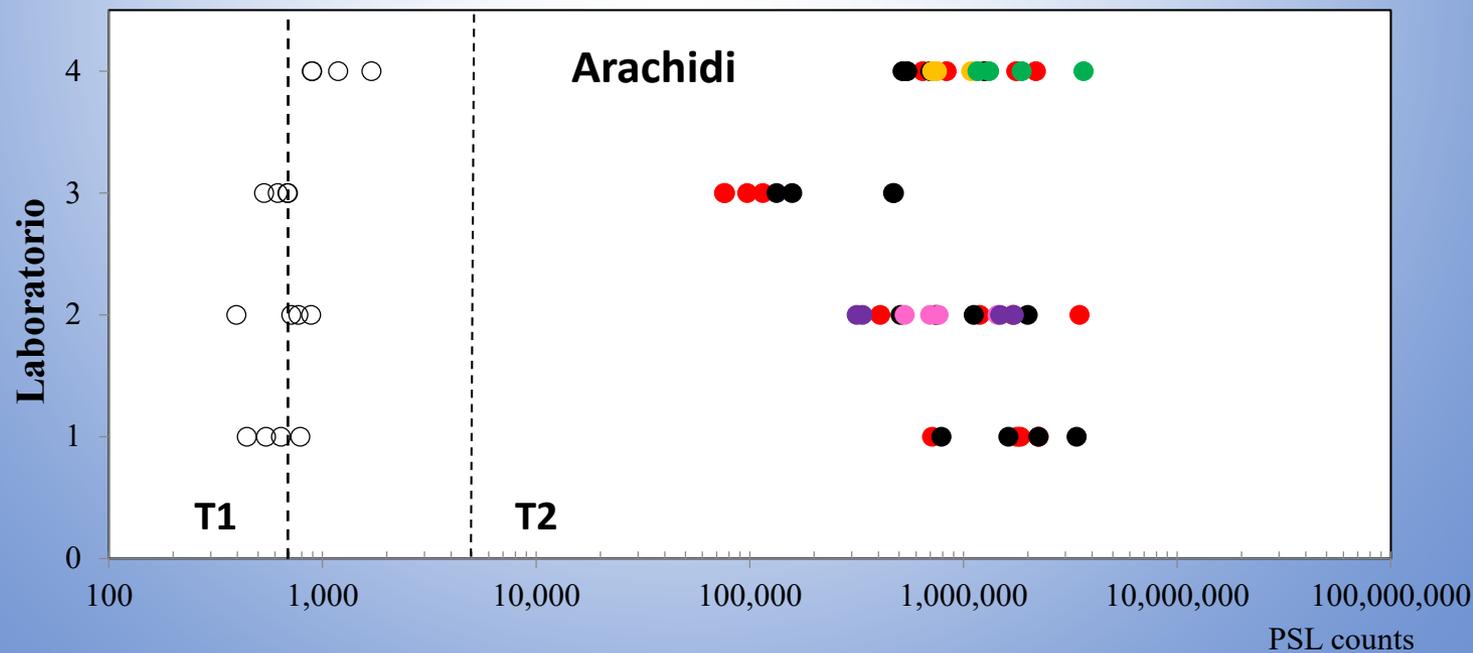
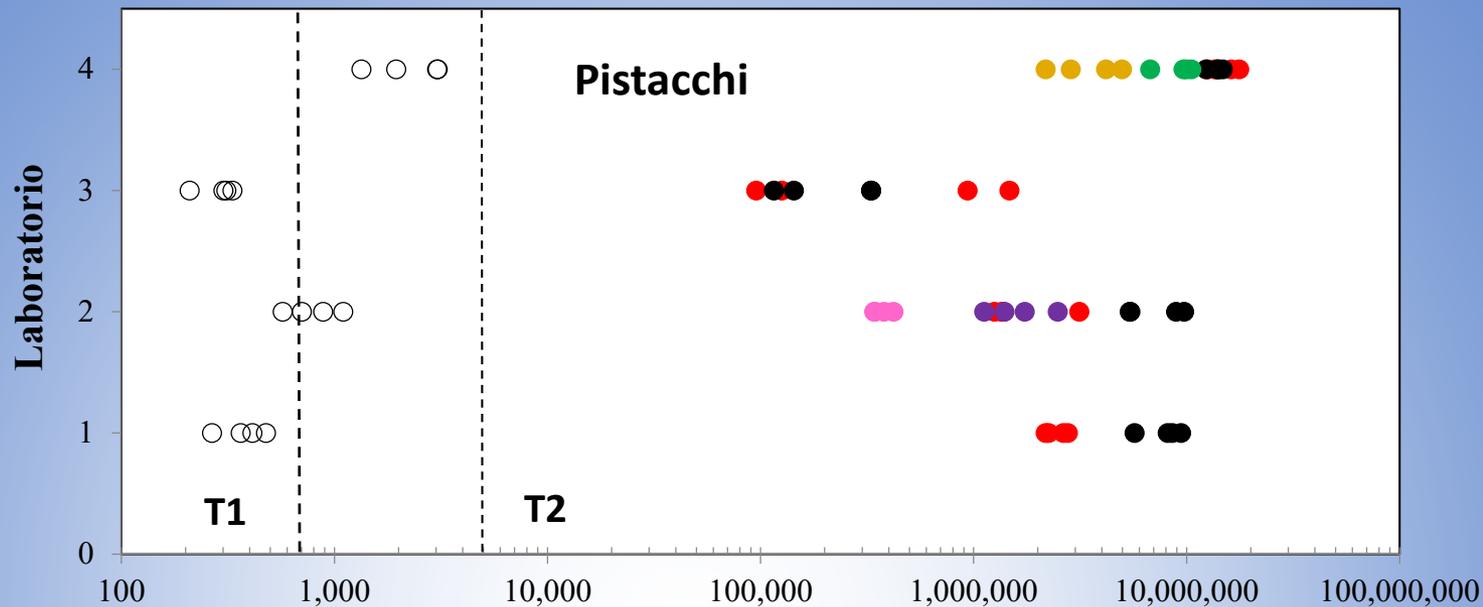
Le analisi sono state eseguite entro le prime 7 settimane dall'irraggiamento.

L'IZSPB e l'ISS hanno ripetuto le analisi a distanza di tempo, dopo circa 3 e 7 mesi per verificare la stabilità del segnale nel tempo.

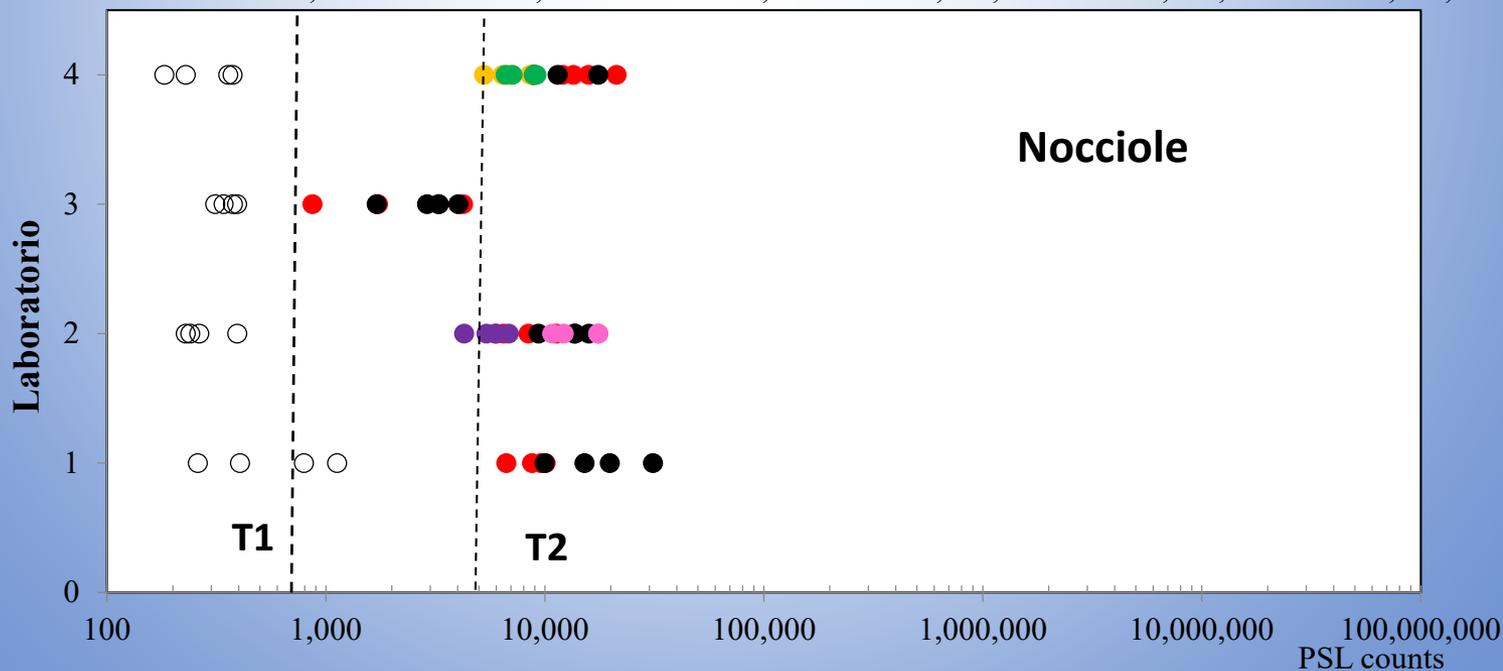
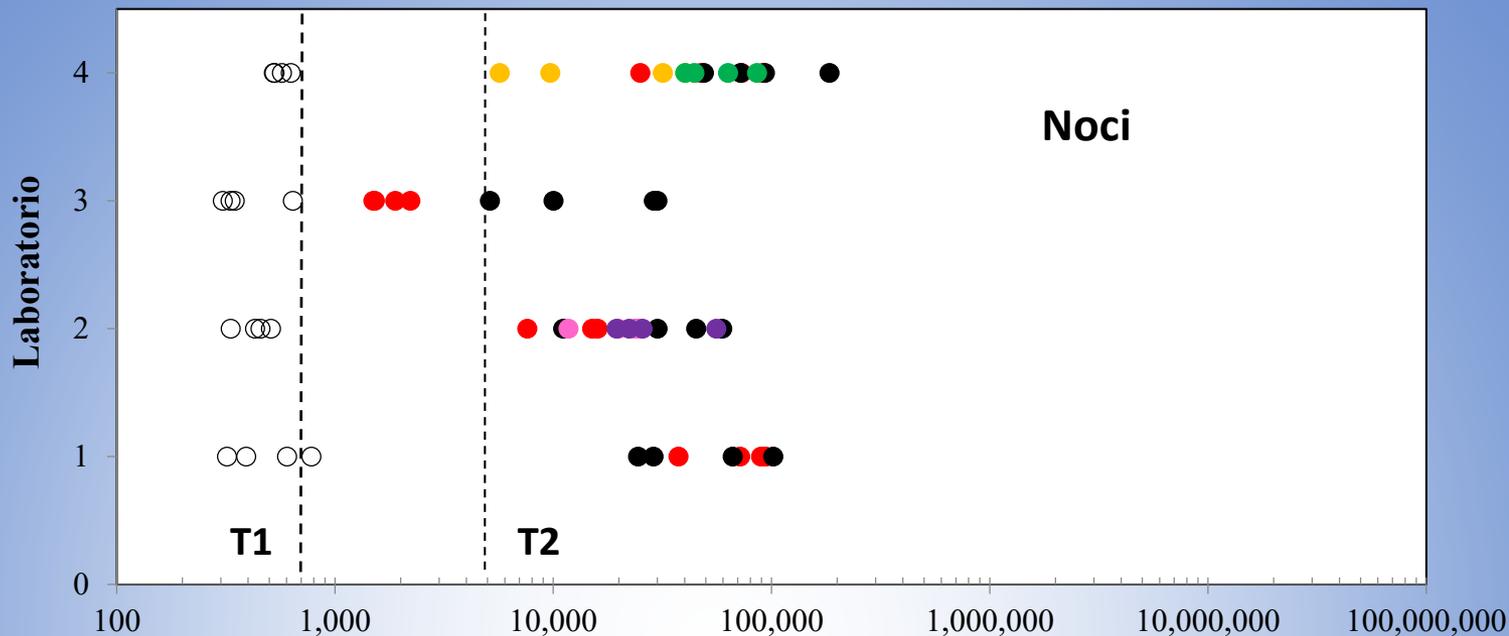
○ non irradiati ● 0,5 kGy ● 1 kGy ● 0,5 kGy 3 mesi ● 1 kGy 3 mesi ● 0,5 kGy 7 mesi ● 1 kGy 7 mesi

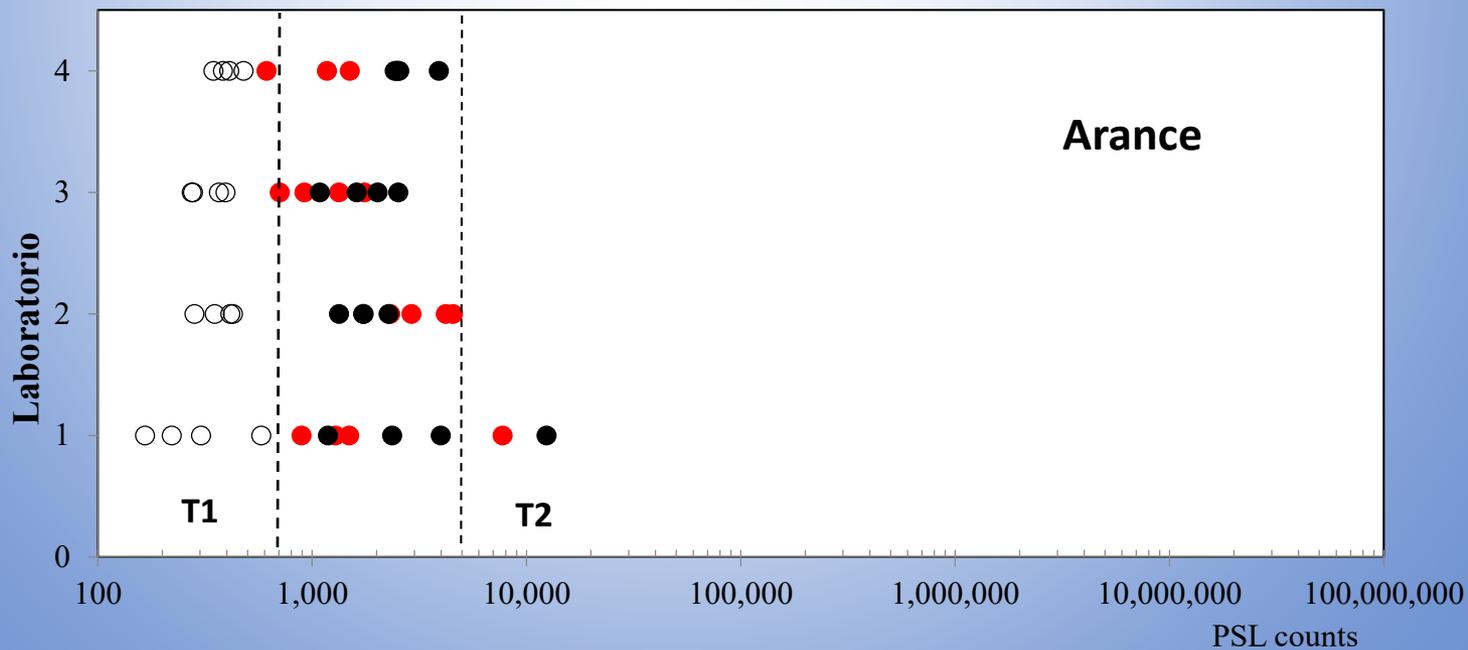
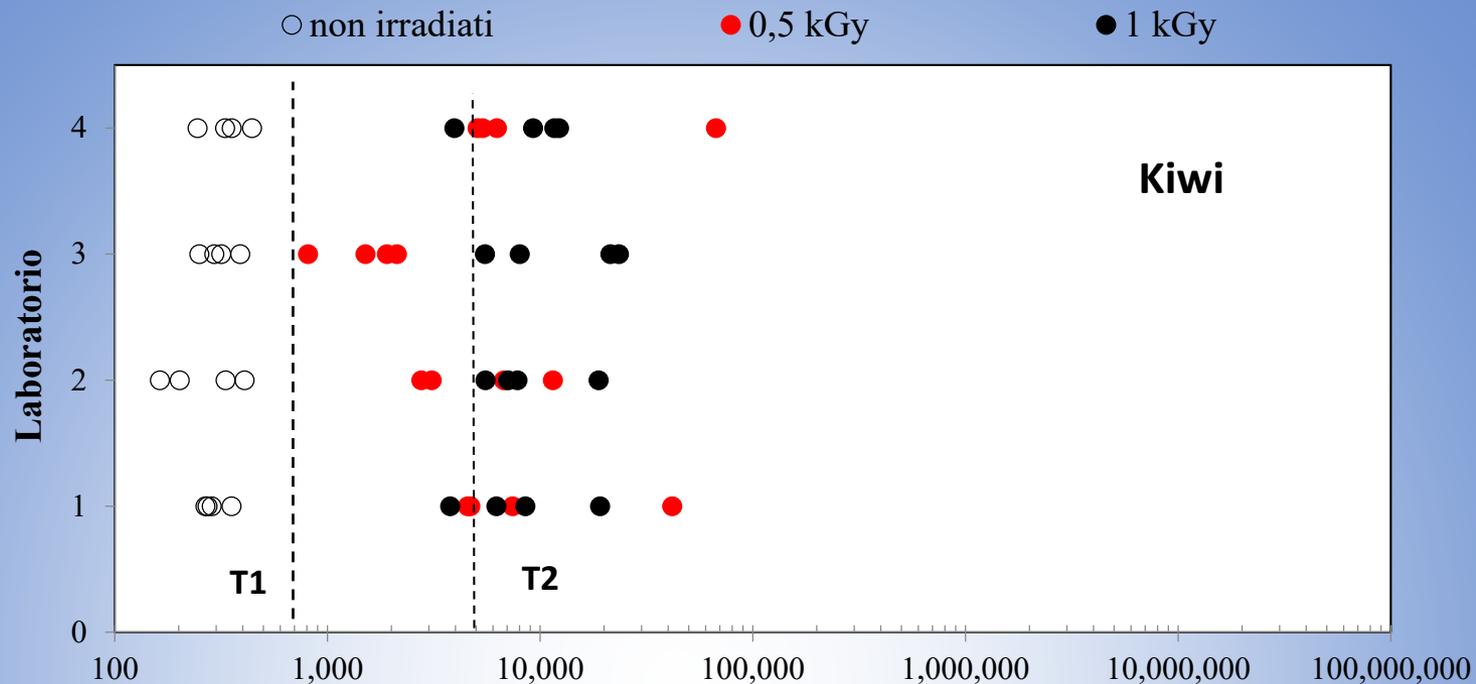


○ non irradiati ● 0,5 kGy ● 1 kGy ● 0,5 kGy 3 mesi ● 1 kGy 3 mesi ● 0,5 kGy 7 mesi ● 1 kGy 7 mesi



○ non irradiati ● 0,5 kGy ● 1 kGy ● 0,5 kGy 3 mesi ● 1 kGy 3 mesi ● 0,5 kGy 7 mesi ● 1 kGy 7 mesi





KIWI 0,5 kGy

Lab 1 04 0,5 kGy	Kiwi	A	27/10/21	4571	77 Intermedio	Irraggiato	Riportati i dati più alti per l'esito finale. Piastra D : picciolo
		B	27/10/21	7427	94 Positivo		
		C	27/10/21	4700	78 Intermedio		
		D	27/10/21	41768	208 Positivo		

Lab 2 04	Kiwi	A	29/11/21	6760	101 Positivo	Non interpretabile	l'aliquota D contiene la calotta della buccia
		B	29/11/21	2767	78 Intermedio		
		C	29/11/21	3093	80 Intermedio		
		D	29/11/21	11481	122 Positivo		

Lab 3 04	Kiwi	A	08/11/21	1509	72 Intermedio	Non interpretabile	Il campione A e C : buccia con picciolo B e D : buccia senza picciolo.
		B	08/11/21	810	64 Intermedio		
		C	25/11/21	2120	66 Intermedio		
		D	25/11/21	1904	65 Intermedio		

Lab 4 04	Kiwi	A	18/10/21	6257	105 Positivo	Irraggiato	La piastra C conteneva il picciolo
		B	18/10/21	5083	99 Positivo		
		C	18/10/21	67091	268 Positivo		
		D	18/10/21	5369	101 Positivo		

3/4 laboratori registrano conteggi più elevati per le aliquote contenenti parti del/vicine al picciolo

KIWI 1 kGy

09	Kiwi	1 kGy	A	27/10/21	8517	99 Positivo	Irraggiato	Riportati i dati più alti per l'esito finale. Piastra D : picciolo
			B	27/10/21	3779	71 Intermedio		
			C	27/10/21	6225	87 Positivo		
			D	27/10/21	19146	143 Positivo		

09	Kiwi	1 kGy	A	29/11/21	7070	102 Positivo	Irraggiato	l'aliquota D contiene la calotta della buccia
			B	29/11/21	7822	106 Positivo		
			C	29/11/21	5528	94 Positivo		
			D	29/11/21	18850	149 Positivo		

09	Kiwi	1 kGy	A	30/11/21	8019	108 Positivo	Irraggiato	Il campione B e C: buccia con picciolo A e D: buccia senza picciolo.
			B	30/11/21	5503	88 Positivo		
			C	30/11/21	23458	160 Positivo		
			D	30/11/21	21408	154 Positivo		

2/3 laboratori registrano conteggi più elevati per le aliquote contenenti parti del/vicine al picciolo

ARANCE

Lab 1 14 1kGy	Arance	A	26/10/21	3983	73 Intermedio	Irraggiato	Riportato il dato più alto per l'esito finale. Piastra D : picciolo
		B	26/10/21	2360	61 Intermedio		
		C	26/10/21	1184	50 Intermedio		
		D	26/10/21	12390	117 Positivo		

Lab 3 14	Arance	A	08/11/21	1086	66 Intermedio	Non interpretabile	Il campione C: buccia con picciolo A, B e D: buccia senza picciolo.
		B	08/11/21	2522	76 Intermedio		
		C	30/11/21	2022	66 Intermedio		
		D	30/11/21	1614	62 Intermedio		

Lab 1 16 0,5 kGy	Arance	A	26/10/21	891	47 Intermedio	Irraggiato	Riportato il dato più alto per l'esito finale. Piastra D : picciolo
		B	26/10/21	1487	53 Intermedio		
		C	26/10/21	1284	51 Intermedio		
		D	26/10/21	7738	95 Positivo		

Lab 3 16	Arance	A	08/11/21	706	63 Intermedio	Non interpretabile	Il campione C: buccia con picciolo A, B e D: buccia senza picciolo.
		B	08/11/21	919	64 Intermedio		
		C	30/11/21	1334	60 Intermedio		
		D	30/11/21	1753	64 Intermedio		

FICHI SECCHI

Lab 1 15 1kGy	Fichi secchi	A	27/10/21	467937	685	Positivo	Irraggiato	Piastra D: piccolo
		B	27/10/21	276168	527	Positivo		
		C	27/10/21	353374	596	Positivo		
		D	27/10/21	497294	706	Positivo		

Lab 1 19 0,5kGy	Fichi secchi	A	27/10/21	452571	674	Positivo	Irraggiato	Piastra D: piccolo
		B	27/10/21	866856	932	Positivo		
		C	27/10/21	134884	369	Positivo		
		D	27/10/21	358968	600	Positivo		

Non sono state osservate differenze significative tra campioni con e senza picciolo

Test interlaboratorio: riepilogo risultati

Matrice	0 kGy			0.5 kGy			1 kGy		
	N	I	P	N	I	P	N	I	P
Arance	16	0	0	1	14	1	0	15	1
Kiwi	16	0	0	0	8	8	0	2	14
Fichi	12	4	0	0	0	16	0	0	16
Uvetta	15	1	0	0	0	16	0	0	16
Arachidi	8	8	0	0	0	16	0	0	16
Pistacchi	9	7	0	0	0	16	0	0	16
Nocciole	14	2	0	0	4	12	0	4	12
Noci	15	1	0	0	4	12	0	0	16

- Fichi secchi, uvetta, arachidi e pistacchi irradiati forniscono tutti risultati positivi con conteggi elevati
- Arance, kiwi e, in misura minore, noci e nocciole irradiati forniscono risultati non positivi (intermedi) per i campioni irradiati. **I risultati intermedi, tuttavia, non precludono la corretta classificazione dei campioni per i quali è prevista una seconda analisi con un metodo di conferma.**

Conclusioni

Sono state esaminate 15 matrici di frutta fresca, essiccata e a guscio. I prodotti hanno mostrato sensibilità alle radiazioni ionizzanti molto diverse con risultati per i campioni irradiati che vanno da poche centinaia di conteggi (ananas) a milioni di conteggi (pistacchi). Questi dati rivelano un contenuto di minerali contaminanti molto variabile tra le diverse matrici (possibili cause: caratteristiche della buccia del frutto, processi di pulizia prima della commercializzazione). Variabilità notevole anche tra le risposte di aliquote dello stesso campione.

La frutta essiccata (specialmente arachidi, pistacchi, fichi secchi, uvetta) presenta una sensibilità elevata con conteggi totali per i campioni irradiati nell'intervallo ($10^5 - 10^8$).

I prodotti freschi presentano sensibilità diverse e piuttosto basse. Sono state osservate differenze anche tra campioni dello stesso tipo di frutto (arance e kiwi) provenienti da lotti o produttori diversi. La maggior parte dei campioni irradiati di frutta fresca (ananas, clementine, limoni, papaya) hanno fornito risultati intermedi con conteggi anche molto bassi e vicini al limite di negatività (ananas, clementine). I risultati intermedi non precludono la corretta classificazione dei campioni per i quali è prevista una seconda analisi con un metodo di conferma. Tuttavia, data la variabilità della risposta anche tra frutti dello stesso tipo, si ritiene necessario approfondire lo studio esaminando campioni di diversa provenienza per escludere l'occorrenza di falsi negativi.

In tutti i casi, una seconda misura PSL di calibrazione eseguita sul campione dopo irraggiamento a 1 kGy in laboratorio permetterebbe di verificarne il contenuto di minerali ed arrivare ad una classificazione corretta.

Bibliografia

- E. Bortolin, B. Carratù, A.E Chiaravalle, M.T. Dischiavi, R. Gargiulo, M. Mangiacotti, G. Marchesani, M.C. Quattrini, M. Tomaiuolo, C. Boniglia. Detection of irradiated plant foods by photo- and thermally-stimulated Luminescence. *Food Control*, 2019, 105: 113-122.
- Chung, H.W., Delincé, H., Han, S.B., Hong, J.H., Kim, H.Y., Kim, M.C., Byun, M.W. & Kwon, J.H. (2004). Trials to identify irradiated chestnut (*Castanea bungena*) with different analytical techniques. *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 179-182.
- EN 1788. (2001). *Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated*. Belgium: European Committee for Standardization Brussels.
- EN 1787 (2000). *Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy*. Belgium: European Committee for Standardisation, Brussels.
- EN 13708 (2002). *Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy*. Belgium: European Committee for Standardisation, Brussels.
- EN 13751. (2009). *Detection of irradiated food using photostimulated luminescence*. Belgium: European Committee for Standardization Brussels.
- Jo, D., Kwon, J. H. Detection of radiation-induced markers from parts of irradiated kiwifruits. *Food Control* 2006, 17, 617-621.
- Jo, D., Kim, B.K., Kausar, T., & Kwon, J.H. (2008). Study of Photostimulated- and Thermo-luminescence Characteristics for Detecting Irradiated Kiwifruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1180-1183.
- Mangiacotti, M., Chiaravalle, A. E., Marchesani, G., De Sio, A., Boniglia, C., Bortolin, E., & Onori, S. (2009). Detection of irradiated chestnuts: preliminary study using three analytical techniques. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 695-698.
- Shahbaz, H.M., Akram, K., Ahn, J.J. & Kwon, J.,H. (2013). Investigation of Radiation-Induced Free Radicals and Luminescence Properties in Fresh Pomegranate Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4019-4025.
- Jo, Y., Sanyal, B., Chung, N., Lee, H. G., Park, Y., Park, H. J. & Kwon, J.H. (2015). Calibrated photostimulated luminescence is an effective approach to identify irradiated orange during storage. *Radiation Physics and Chemistry*, 111, 81-86.
- Jo Y., Kyung H.K., Park H.J., & Kwon J.H. (2016). Irradiated fruits can be identified by detecting radiation-induced markers with luminescence and ESR analyses for different trading fruits. *Applied Biological Chemistry*, 59, 59-65.
- Jo, Y., Ameer, K., Chung, N., Kang, Y.H., Ahn, D.U., Kwon, J.H. (2020). E-sensing, calibrated PSL, and improved ESR techniques discriminate irradiated fresh grapefruits and lemons. *J Food Sci Technol*, 57(1), 364-374 <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04068-y>
- Sanderson D.C.W, Carmichael L.A., & Fisk S. (2003a). Photostimulated Luminescence Detection of Irradiated Herbs, Spices and Seasonings : An International Collaborative Trial. *AOAC International* (5) 990-997.

GRAZIE
PER
L'ATTENZIONE!

