

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Trattamento degli alimenti  
con radiazioni ionizzanti**

A cura di  
Concetta Boniglia (a), Sandro Onori (b)  
e Orazio Sapora (c)

*(a) Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari*

*(b) Dipartimento di Tecnologie e Salute*

*(c) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**04/21**

Istituto Superiore di Sanità

**Il trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti.**

A cura di Concetta Boniglia, Sandro Onori e Orazio Sapura  
2004, 112 p. Rapporti ISTISAN 04/21

Il problema del trattamento delle derrate alimentari con radiazioni ionizzanti è di particolare attualità nei Paesi della Comunità Europea, e in particolare in Italia, a causa dell'emanazione del DL.vo 30 gennaio 2001 n. 94, che dà attuazione alle direttive comunitarie 1999/2/CE e 1999/3/CE, relative al riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri. A partire dal 20 marzo 2001, tutti gli alimenti irradiati immessi sul mercato devono quindi rispondere alle disposizioni delle suddette direttive. A tutela del consumatore, oltre alle rassicurazioni sulla sicurezza nutrizionale e tossicologica di tali prodotti, viene introdotto l'importante concetto dei controlli ufficiali che tutti gli Stati membri devono effettuare sui prodotti in fase di commercializzazione. Questi controlli servono ad identificare un alimento come irradiato o non irradiato permettendo la verifica della corrispondenza dell'etichettatura alla normativa vigente. Per l'Italia, il DL.vo 30 gennaio 2001 n. 94 affida all'Istituto Superiore di Sanità il compito di individuare i metodi di identificazione applicabili sul territorio dalle autorità sanitarie territorialmente competenti.

*Parole chiave:* Alimenti irradiati, Identificazione degli alimenti irradiati, Sicurezza degli alimenti irradiati

Istituto Superiore di Sanità

**Ionising radiation treatment of foodstuffs.**

Edited by Concetta Boniglia, Sandro Onori and Orazio Sapura  
2004, 112 p. Rapporti ISTISAN 04/21 (in Italian)

Ionising radiation treatment of foodstuffs is an actual subject in the European Community's Member States, particularly in Italy, thanks to the approval of a national legislation (Decree n. 94 of January 30, 2001) implementing the European Directives 1999/2/CE and 1999/3/CE on the approximation of the laws of the Member States. Consequently, starting from March 20, 2001, irradiated food on the Italian markets must comply with the previous mentioned directives. Member States are requested to implement methods to detect treatment with ionising radiation at the product marketing stage. The Italian Decree n. 94/2001 gives the Istituto Superiore di Sanità (the Italian National Institute of Health) the duty to select detection methods to be applied on a regional scale by the competent local health bodies.

*Key words:* Irradiated food, Food irradiation detection, Wholesomeness of irradiated food

La riproduzione di stralci di norme UNI è stata autorizzata da UNI Ente Nazionale Italiano di Unificazione. L'unica versione che fa fede è quella originale reperibile in versione integrale c/o UNI, via Battistotti Sassi 11/b 20133 Milano, tel. 02700241, fax 0270105992, e-mail [diffusione@uni.com](mailto:diffusione@uni.com). Le norme UNI si possono consultare liberamente presso la rete dei Punti UNI, il cui elenco è riportato all'indirizzo [http://www.uni.com/it/mondo\\_uni/punti\\_uni.htm](http://www.uni.com/it/mondo_uni/punti_uni.htm).

Per informazioni su questo documento scrivere a: [boniglia@iss.it](mailto:boniglia@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

# INDICE

<b>Introduzione</b> <i>Paolo Aureli</i> .....	1
<b>Aspetti normativi: applicazioni e sviluppi</b> <i>Concetta Boniglia</i> .....	5
<b>Basi biofisiche della interazione radiazioni-materia</b> <i>Antonio Faucitano</i> .....	13
<b>Sicurezza d'uso: aspetti nutrizionali e organolettici</b> <i>Elisabetta Sanzini</i> .....	28
<b>Sicurezza d'uso: aspetti tossicologici</b> <i>Orazio Sapora</i> .....	33
<b>Impianti di irraggiamento e dosimetria</b> <i>Piergiorgio Fuochi, Marco Lavalle</i> .....	50
<b>Identificazione degli alimenti irradiati</b> <i>Concetta Boniglia</i> .....	69
<b>Metodi fisici di identificazione</b> <i>Sandro Onori</i> .....	76
<b>Metodi chimici di identificazione</b> <i>Stefania Giammarioli</i> .....	89
<b>Metodi microbiologici di identificazione</b> <i>Paolo Aureli</i> .....	98
<b>Metodi biologici di identificazione</b> <i>Orazio Sapora, Beatrice Di Carlo</i> .....	104



## INTRODUZIONE

Paolo Aureli

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'irraggiamento dei prodotti alimentari è stato proposto da lunga data, in alternativa ad altre tecnologie, per controllare la sopravvivenza e la moltiplicazione dei microrganismi nelle materie prime alimentari, utilizzate dall'industria per la produzione di alimenti, al fine di assicurarne una più lunga conservabilità (nel caso dei vegetali con l'inibizione della germogliazione; nel caso della frutta con l'induzione del ritardo nella maturazione; nel caso dei cereali con l'inattivazione degli infestanti) e un più alto grado di sicurezza.

In effetti, le modifiche introdotte negli ultimi decenni negli stili di vita dei consumatori, in parte legate allo sviluppo industriale e all'urbanizzazione, hanno reso particolarmente rilevante il problema della disponibilità di prodotti alimentari sicuri. Infatti, la contaminazione degli alimenti da pericoli biologici è stata ed è ancora oggi uno dei problemi di sanità pubblica di maggior rilevanza nei Paesi industrializzati nonostante i notevoli sforzi fatti per prevenirla e le malattie trasmesse dagli alimenti continuano a contribuire in maniera rilevante alla loro morbilità. Emblematiche a questo proposito sono le stime fatte negli Stati Uniti dai *Centers for Diseases Control and Prevention* (1) secondo le quali ogni anno le malattie trasmesse da alimenti provocheranno circa 76 milioni di malati, 325.000 ospedalizzazioni e 5.000 morti.

Varie disposizioni legislative in vigore nei Paesi industrializzati (in Italia, le regole di igiene alimentare fissate dall'attuazione della direttiva 93/43/CEE del Consiglio relativa all'igiene delle derrate alimentari, nonché le varie direttive del Consiglio recepite che regolano la produzione e l'immissione sul mercato di prodotti di origine animale) prevedono un elevato livello di tutela dei consumatori per tutte le derrate alimentari e sono generalmente ritenute come garanzie essenziali della sicurezza. L'esperienza ha dimostrato che il rispetto severo di queste regole si rivela sufficientemente efficace ai fini della sicurezza alimentare. Tuttavia, è anche noto che talune derrate, in ragione di limiti inerenti al processo di produzione, possono presentare un rischio microbiologico residuo.

Vari fattori possono, infatti, concorrere a mantenere una contaminazione alimentare residua e tra questi il ricorso all'allevamento e alla coltivazione intensivi, la globalizzazione del commercio delle derrate alimentari, la complessità della catena distributiva, il ricorso a trattamenti tecnologici blandi (le *mild technology*) per assicurare caratteristiche organolettiche migliori, la formazione del personale addetto alla manipolazione degli alimenti. A loro volta proprio questi fattori hanno finito per comportare un aumento dei rischi alimentari perché: pericoli biologici impreveduti (i cosiddetti patogeni emergenti) si sono aggiunti negli ultimi venti anni ai pericoli alimentari tradizionali; le materie prime e i prodotti finiti possono più facilmente contaminarsi; le persone esposte ai pericoli e quelle coinvolte negli episodi di tossinfezione alimentare possono essere molto più numerose.

È intorno agli anni '70 che si valuta in maniera concreta la possibilità di ricorrere nell'industria alimentare all'irraggiamento delle derrate come soluzione finale in grado di risolvere il problema del deterioramento e quello della sicurezza igienica. Tuttavia, la sua conclusiva adozione è stata, in un primo momento, rallentata dalla necessità di acquisire tutti i pareri scientifici non solo sul fatto che producesse gli effetti desiderati ma anche che non avrebbe causato effetti inaccettabili dal punto di vista tossicologico, nutrizionale e microbiologico e, successivamente, limitata dalla percezione dei consumatori sui rischi ad essa attribuiti e dalle azioni delle relative organizzazioni di difesa.

La prima apertura all'uso di tale tecnologia è venuta dai lavori di un comitato misto di esperti dell'organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO), dell'Agenzia per l'Energia Atomica (*International Atomic Energy Agency*, IAEA) e della *World Health Organization* (WHO) che, nel 1980, hanno portato alla pubblicazione di un rapporto (2), a giusto titolo considerato una pietra miliare in questo campo, nel quale si affermava che "... l'irraggiamento di qualunque alimento con dosi medie o inferiori a 10 KGy non presenta rischi tossicologici e non comporta problemi nutrizionali o microbiologici...". Aperture su tale tecnologia sono successivamente venute da esperti consultati dalle Autorità nazionali di taluni Paesi e dal Comitato Scientifico per l'Alimentazione della CEE (Comunità Economica Europea).

Sulla base di tali elementi di giudizio, alcuni Paesi dell'Unione Europea (UE) hanno autorizzato l'irraggiamento di derrate alimentari diverse, quali piante aromatiche, patate, cipolle aglio, gomma arabica, scalogno, frutta, cereali, carne di pollo, pesce e molluschi, alimenti destinati a pazienti che richiedono, dietro consiglio medico, alimenti sterilizzati, ecc. (3).

Anche in Italia, in base a quanto previsto dall'art. 7 della legge 30 aprile 1962 n. 283, le Autorità Sanitarie hanno esaminato la questione e convenuto già dal 1973 (4) di autorizzare l'irraggiamento di patate, cipolle e aglio a scopo anti-germogliativo e più recentemente, dal 1996, hanno autorizzato il trattamento delle erbe e spezie (5). Le norme, che disciplinano tale trattamento, fissano la dose utilizzabile e prevedono, anticipando norme comunitarie, a tutela del diritto alla scelta dei consumatori, che le confezioni contengano la dicitura "irradiato". Le norme, tuttavia, non hanno previsto modalità di controllo sul prodotto limitandosi a considerare solo la validità e la rispondenza dei metodi di dosimetria in uso all'impianto.

A livello comunitario, sulla base dei lavori della FAO/IAEA/WHO, il Comitato Scientifico per l'Alimentazione Umana ha formulato pareri sugli alimenti irradiati nel 1986, 1992 e 1998 e ha espresso pareri favorevoli sull'irraggiamento di un certo numero di alimenti (frutta, verdura, cereali, tuberi amidacei, spezie e condimenti, pesci, crostacei, carni fresche, pollame, camembert al latte crudo, cosce di rana, gomma arabica, caseina/caseinati, ovalbumina, fiocchi di cereali, farina di riso, prodotti a base di sangue). Tuttavia, l'irraggiamento degli alimenti è stato disciplinato solo di recente con l'emanazione della direttiva quadro 1999/2/CE (6), che copre gli aspetti generali e tecnici dell'attuazione del processo, l'etichettatura degli alimenti irradiati e le condizioni di autorizzazione per l'irraggiamento degli alimenti, e con la direttiva di applicazione 1992/3/CE (7), che stabilisce un elenco comunitario di alimenti e di loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti; attualmente la lista positiva contiene una sola categoria di alimenti quella delle erbe aromatiche, spezie e condimenti vegetali.

È proprio con la direttiva quadro 1999/2/CE, però, che diventa obbligatorio per le autorità svolgere controlli sui prodotti irradiati. Infatti, tale direttiva prevede che, a partire dal 20 marzo 2001, le autorità sanitarie nazionali vigilino che gli alimenti e i loro ingredienti irradiati ottemperino alle disposizioni della direttiva e trasmettano alla Commissione i risultati dei controlli effettuati non solo negli impianti al fine di accertare la categoria dei prodotti trattati, le quantità e le dosi ma anche, fatto innovativo, quelli effettuati sui prodotti nella fase di commercializzazione.

La stessa norma prevede, inoltre, che gli Stati Membri vegliano affinché i metodi di analisi utilizzati per individuare se un prodotto sia stato trattato con radiazioni ionizzanti siano standardizzati o convalidati, o comunque che siano tali entro il 1° gennaio 2003. Ciò vuol dire adottare metodi conformi alle disposizioni dei paragrafi 1 e 2 dell'allegato della direttiva 85/591/CEE (cioè a dire i metodi debbono soddisfare i criteri di: a) specificità; b) esattezza; c) precisione; ripetibilità nello stesso laboratorio e riproducibilità nel tempo nello stesso laboratorio o in laboratori differenti; variabilità; d) limite di rivelazione; e) sensibilità; f)

praticabilità e applicabilità); inoltre la norma prevede che gli Stati Membri informino la Commissione dei metodi utilizzati.

Dall'entrata in vigore della direttiva fino al dicembre 2001 otto Stati Membri (Austria, Germania, Grecia, Finlandia, Irlanda, Paesi Bassi, Svezia e Regno Unito) hanno comunicato i risultati dei controlli sui prodotti immessi sul mercato. In totale sono stati esaminati 6.500 campioni di cui circa l'1,5% sono risultati irradiati ma non etichettati come tali. Il tipo di alimento sottoposto a controllo varia da Stato a Stato: si tratta per lo più di erbe, spezie, o alimenti che le contengono, di cosce di rana, gamberi, gamberetti e verdure. Tuttavia nel Regno Unito le autorità hanno riscontrato il 42% di alcuni integratori alimentari di tipo erboristico irradiati. Si tratta per lo più di prodotti contenenti o a base di aloe, medicago sativa, uncaria tomentosa, arpagofito, aglio, zenzero, ginkgo biloba, ginseng, guaranà, kava kava, serenoa repens, curcuma. Poiché nella quasi totalità dei casi si tratta di prodotti per i quali il trattamento con radiazioni non è autorizzato nella UE, il risultato solleva interrogativi sulla situazione esistente in altri Paesi.

In Italia, l'art. 17 del decreto di recepimento (8) delle direttive comunitarie sopracitate prevede lo svolgimento di controlli da parte delle autorità sanitarie territorialmente competenti nell'ambito dei controlli ufficiali utilizzando i metodi individuati dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Proprio per questo, del tutto recentemente, il Ministero della Salute ha investito l'ISS della questione di indicare i metodi idonei alla rilevazione del trattamento con radiazioni ionizzanti.

Del problema delle tecniche analitiche per determinare se gli alimenti fossero stati o meno sottoposti a radiazioni ionizzanti, questo Istituto ha cominciato ad occuparsi più di una decina di anni fa concentrando l'attenzione dapprima sullo sviluppo di metodiche principalmente atte a fornire indicazioni di natura qualitativa e in tempi più recenti anche alla misurazione della dose di radiazioni assorbita dall'alimento. In particolare, tale attività si è sviluppata sulla scia di specifici programmi di ricerca di organismi internazionali (la divisione mista FAO/IAEA per le Tecnologie Nucleari nell'Agricoltura e nella Produzione di Alimenti meglio nota come *Analytical Detection Methods for the Irradiation Treatment*, ADMIT) e comunitari (lo *European Commission Reference Bureau* meglio noto come BCR, *Bureau Communautaire de Référence*). In particolare, quest'ultimo organismo, nei primi anni '90, ha avviato un programma di ricerca biennale per lo sviluppo e la validazione di metodi per alimenti trattati con radiazioni ionizzanti, al quale questo Istituto ha collaborato, conclusosi con la messa a punto di un certo numero di efficienti metodi di analisi. Nel 1993 la Commissione Europea ha dato mandato allo *European Committee for Standardization* (Comitato Europeo di Normazione, CEN) di standardizzare tali metodi e per tale scopo il CEN ha creato il gruppo di lavoro "Irradiated Foodstuffs of the Technical Committee 275 Food Analysis- Horizontal Methods" (CEN/TC275/WG8) che ha iniziato i suoi lavori nel novembre del 1993 pervenendo fino ad oggi alla definizione di 9 metodi di analisi. Grazie a questa pregressa collaborazione con i gruppi tecnici comunitari che hanno messo a punto i metodi di riconoscimento degli alimenti irradiati, l'Istituto ha potuto fornire al Ministero della Salute la liste delle metodiche che avrebbero potuto trovare una immediata applicazione nei laboratori pubblici incaricati del controllo ufficiale tenendo conto anche della strumentazione comunemente in essi reperibile.

Pertanto, per consentire ai laboratori incaricati del controllo ufficiale di acquisire diretta esperienza sull'uso di queste metodiche, il Laboratorio Alimenti (oggi Centro Nazionale per la Qualità degli alimenti e per i Rischi Alimentari) in collaborazione con quello di Tossicologia e di Fisica dell'ISS hanno ritenuto opportuno organizzare nel dicembre del 2002 il corso sui metodi di identificazione degli alimenti irradiati al fine di fornire le conoscenze di base sui metodi e sulle tecniche di rilevamento allo scopo di formare esperti nelle strutture deputate al controllo ufficiale. Non va, infatti, dimenticato che la possibilità di accrescere la fiducia dei

consumatori per gli alimenti trattati con radiazioni ionizzanti passa obbligatoriamente per la consapevolezza di un sistema pubblico di controllo efficiente ed efficace.

## Bibliografia

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5(5):607-25.
2. World Health Organization. *Wholesomeness of irradiated food: report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee*. Geneva: WHO; 1981. (WHO Technical Report Series, No. 659).
3. World Health Organization. International Consultative group on food irradiation (ICGFI). *Task Force meeting on the Use of Irradiation to Ensure Hygienic Quality of Food, 14-18 July, Vienna, Austria*. Geneva: WHO; 1987. (WHO/EHE/FOS/87.2).
4. Italia. Decreto Ministeriale 30 agosto 1973. Autorizzazione al trattamento mediante radiazioni gamma, a scopo anti-germogliativo di patate, cipolle ed aglio. *Gazzetta Ufficiale* n. 254, 1 ottobre 1973.
5. Italia. Decreto Ministeriale 18 luglio 1996. Regolamento riguardante il trattamento con radiazioni ionizzanti di erbe aromatiche essiccate, spezie e condimenti a base di erbe aromatiche essiccate e di spezie. *Gazzetta Ufficiale* n. 204, 31 agosto 1996.
6. Direttiva 1999/2/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti, *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L 066 del 13.03.1999.
7. Direttiva 1999/3/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 che stabilisce un elenco comunitario di alimenti e loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L 066 del 13.03.1999.
8. Italia. Decreto Legislativo 30 gennaio 2001, n. 94. Attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1993/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti, *Gazzetta Ufficiale* n. 79, 4 aprile 2001.

## ASPETTI NORMATIVI: APPLICAZIONI E SVILUPPI

Concetta Boniglia

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### Quadro giuridico

Il trattamento degli alimenti e dei loro ingredienti con radiazioni ionizzanti è regolamentato dalle direttive 1999/2/CE (1) e 1999/3/CE (2) relative al riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri, entrate in vigore il 20 settembre 2000. A partire dal 20 marzo 2001, tutti gli alimenti irradiati e i loro ingredienti immessi sul mercato europeo devono quindi ottemperare alle disposizioni delle suddette direttive.

Più precisamente la direttiva quadro 1999/2/CE copre gli aspetti generali e tecnici dell'attuazione del processo, mentre la direttiva di applicazione 1999/3/CE stabilisce un elenco comunitario di alimenti e loro ingredienti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti.

L'emanazione di direttive comunitarie nasce dalla esigenza di armonizzare le differenze tra le legislazioni nazionali e quindi tra le relative condizioni di impiego dell'irraggiamento, che potrebbero condizionare la libera circolazione dei prodotti alimentari nonché, dall'esigenza di tutelare i consumatori per i quali l'irradiazione costituisce un motivo di preoccupazione e un tema di pubblica discussione.

In questa ottica la direttiva quadro stabilisce il campo di applicazione dell'irraggiamento, le finalità e le condizioni del trattamento, ivi comprese le sorgenti di radiazioni che possono essere utilizzate, le dosi che possono essere applicate e i requisiti igienici dei prodotti alimentari da sottoporre al trattamento stesso.

Per quanto riguarda le *condizioni per l'autorizzazione* al trattamento, la direttiva comunitaria prevede che il trattamento possa essere ammesso solo se:

- esiste una giustificata e ragionevole necessità tecnologica;
- costituisce un beneficio per il consumatore;
- non presenta rischi per la salute;
- non viene utilizzato per sostituire misure igieniche e sanitarie o buone prassi di fabbricazione cioè solo se gli alimenti sono sani e in buone condizioni al momento dell'applicazione del trattamento stesso.

Per quanto riguarda le *condizioni del trattamento* la normativa vigente stabilisce che esso sia effettuato soltanto mediante i seguenti tipi di radiazioni ionizzanti:

- raggi gamma emessi da radionuclidi  $^{60}\text{Co}$  o  $^{137}\text{Cs}$ ;
- raggi X emessi da sorgenti artificiali attivate ad un livello energetico nominale pari o inferiore a 5 MeV;
- elettroni emessi da sorgenti artificiali attivate ad un livello energetico nominale pari o inferiore a 10 MeV.

La direttiva prevede inoltre, a maggiore garanzia del processo tecnologico, che il trattamento dei prodotti con radiazioni ionizzanti debba avvenire solo in *impianti muniti di autorizzazione*. Tali impianti devono quindi rispondere alle norme internazionali di buona tecnica di irraggiamento raccomandate dal Comitato congiunto FAO/OMS (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organizzazione Mondiale della Sanità*) del *Codex Alimentarius* (3) e hanno quindi l'obbligo di tenere per ciascuna sorgente di radiazioni utilizzata un registro in cui vengono indicati per ogni lotto di produzione la natura e la quantità dei

prodotti irradiati, il richiedente del trattamento, il destinatario dei prodotti, la data dell'irraggiamento, i materiali dei contenitori utilizzati nonché tutti i dati di dosimetria per il controllo del processo di irraggiamento.

Infine, a maggiore tutela della libera scelta del consumatore, la direttiva quadro stabilisce che i prodotti trattati con radiazioni ionizzanti debbano essere correttamente *etichettati* e cioè riportare la dicitura "irradiato" in etichetta, se venduti confezionati, o su un cartello in prossimità del recipiente che li contiene, se venduti sfusi. Lo stesso obbligo vige se un prodotto irradiato è utilizzato come ingrediente cioè la stessa dicitura deve accompagnare la sua denominazione nell'elenco degli ingredienti a prescindere dalla percentuale con cui esso è presente. Le norme relative all'etichettatura prevedono inoltre che i prodotti alimentari se irradiati debbano riportare l'indicazione della denominazione e dell'indirizzo dell'impianto che ha effettuato il trattamento o il suo numero di riferimento.

La direttiva comunitaria come già accennato, oltre a coprire gli aspetti generali e tecnici dell'attuazione del processo, ha previsto l'adozione di un *elenco positivo* di prodotti che, ad esclusione di tutti gli altri, possono essere trattati con radiazioni ionizzanti. Allo stato attuale il Consiglio e il Parlamento europeo si sono accordati su una sola categoria di alimenti "le erbe, le spezie essiccate e i condimenti vegetali" che possono essere irradiate alla *dose massima di 10 KGy*. La direttiva quadro prevede comunque l'obbligo per la Commissione di presentare entro il 31 dicembre 2000, una proposta tendente a completare l'elenco comunitario degli alimenti ammessi al trattamento che deve essere poi approvata tramite la procedura di codecisione. Nel frattempo gli stati membri possono mantenere le autorizzazioni nazionali vigenti, a condizione che l'irradiazione e l'immissione sul mercato siano effettuate in conformità alle disposizioni dettate dalla direttiva e che il trattamento dei prodotti alimentari abbia ricevuto il parere favorevole del Comitato Scientifico dell'Alimentazione umana.

Ogni stato membro in questa *fase transitoria* può altresì:

- autorizzare il trattamento dei prodotti alimentari per i quali un altro stato membro ha mantenuto le autorizzazioni preesistenti;
- continuare a mantenere le restrizioni e i divieti nazionali preesistenti sul trattamento con radiazioni ionizzanti dei prodotti non compresi nel primo elenco positivo.

La direttiva comunitaria 1999/2/CE pone infine l'accento sulla necessità da parte di ogni stato membro di effettuare non solo *controlli* sugli impianti di irraggiamento ma anche, fatto del tutto innovativo, di effettuare controlli sui prodotti in fase di commercializzazione al fine di assicurare la conformità dei prodotti alle disposizioni vigenti, proteggere gli interessi del consumatore, tra cui quelli inerenti la corretta informazione, e assicurare la lealtà delle transazioni commerciali. Tali controlli, secondo quanto descritto nella direttiva quadro relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, devono essere condotti a partire dal 20 marzo 2001 e i risultati dei controlli devono essere comunicati alla Commissione.

Nell'ambito dei controlli la direttiva stabilisce inoltre che i metodi di analisi adottati per l'identificazione degli alimenti irradiati in fase di commercializzazione, devono essere conformi ai criteri di valutazione dei metodi di analisi riportati nelle relative direttive comunitarie cioè devono essere valutati e validati e, ai fini del controllo ufficiale, applicati solo nei laboratori autorizzati.

Nel nostro Paese, le direttive comunitarie relative agli alimenti irradiati e loro ingredienti sono state recepite con il DL.vo 30 gennaio 2001 (4). Il decreto di recepimento si inserisce in un quadro normativo che già prevede una disciplina generale in materia di radiazioni ionizzanti e, per quanto riguarda più specificatamente gli alimenti, si colloca nel quadro normativo già tracciato dai decreti legislativi del 1973 e 1996 che autorizzano rispettivamente l'irraggiamento di aglio, patate e cipolle (5) e di erbe aromatiche e spezie (6).

Uno degli aspetti innovativi della normativa nazionale riguarda il provvedimento di autorizzazione degli impianti che è subordinato al rilascio del nulla osta all'impiego, già previsto

per gli impianti che utilizzano radiazioni ionizzanti, ai sensi dell'art. 27 del DL.vo n. 230 del 1995 (7) e dell'autorizzazione sanitaria di cui all'art. 2 della legge 30 aprile 1962, n. 283. Inoltre per gli impianti viene inserita la figura del responsabile dell'osservanza di tutte le condizioni necessarie per garantire la corretta applicazione del trattamento.

Per quanto riguarda i controlli analitici degli alimenti irradiati in fase di commercializzazione, essi devono essere effettuati dalle autorità sanitarie territorialmente competenti individuate dal DL.vo 3 marzo 1993, che disciplina il controllo ufficiale degli alimenti. L'art. 17 del decreto di recepimento delle direttive comunitarie, demanda inoltre all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), in considerazione della pregressa collaborazione con i gruppi tecnici comunitari, il compito di individuare i metodi atti a rilevare il trattamento con radiazioni ionizzanti e di fornire il supporto tecnico-scientifico ai laboratori deputati al controllo ufficiale.

All'ISS, in base all'art. 1 della legge n. 282 del 30 aprile 1962, è anche affidato il compito delle analisi di revisione che si esplica attraverso l'esame del campione prelevato dalle strutture di vigilanza qualora risulti non conforme alle normative vigenti.

## Applicazioni della normativa

In Europa attualmente possono essere irradiati un certo numero di alimenti o loro ingredienti per i quali, avendo il Comitato Scientifico dell'Alimentazione umana espresso parere favorevole, sono state rilasciate le relative autorizzazioni. In virtù di quanto previsto dalla direttiva quadro ciascun stato membro può infatti mantenere le proprie autorizzazioni in attesa che venga completata la lista positiva comunitaria. In Tabella 1 viene riportato l'elenco delle tipologie alimentari autorizzate nei diversi stati membri pubblicate nel 2002 sulla gazzetta ufficiale europea (8).

**Tabella 1. Elenco dei prodotti autorizzati ad essere trattati con radiazioni ionizzanti**

Nazione	Tipologie alimentari
Belgio	Patate, cipolle, aglio, scalogno, pollame, cosce di rana e gamberi surgelati, albume d'uovo
Francia	Piante aromatiche surgelate, cipolle, aglio, scalogno, frutta e verdura secca, fiocchi e germi di cereali, farina di riso, gomma arabica, pollame, cosce di rana e gamberi surgelati, albume d'uovo, caseina e caseinati
Italia	Patate, aglio, cipolle
Paesi Bassi	Legumi, frutta e verdura secca, fiocchi di cereali, gomma arabica, cosce di rana e gamberi surgelati, pollame, albume d'uovo
Regno Unito	Patate, cipolle, aglio, scalogno, legumi, frutta e verdura fresca e secca (inclusi funghi e pomodori), cereali, pollame, pesci e molluschi

La Commissione nel 2002 ha anche aggiornato e pubblicato l'elenco degli impianti autorizzati al trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti (9). Gli impianti commerciali conformi alla normativa vigente sono complessivamente 15, distribuiti diversamente tra il Belgio, la Germania, la Danimarca, la Spagna, la Francia, i Paesi Bassi e il Regno Unito.

In base alle comunicazioni ricevute dagli stati membri, la Commissione delle comunità europee, nell'ottobre del 2002 (10), ha anche pubblicato una relazione che riporta i dati relativi al trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti nel periodo compreso tra settembre 2000 e dicembre 2001.

Il quantitativo di alimenti che è stato irradiato nel suddetto periodo corrisponde a circa 22000 tonnellate; nella Figura 1 vengono mostrate le quantità di alimenti irradiati relative a ciascun stato membro che ha effettuato il trattamento nel suddetto periodo mentre nella Figura 2 vengono mostrate le percentuali delle diverse tipologie di alimenti sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti.

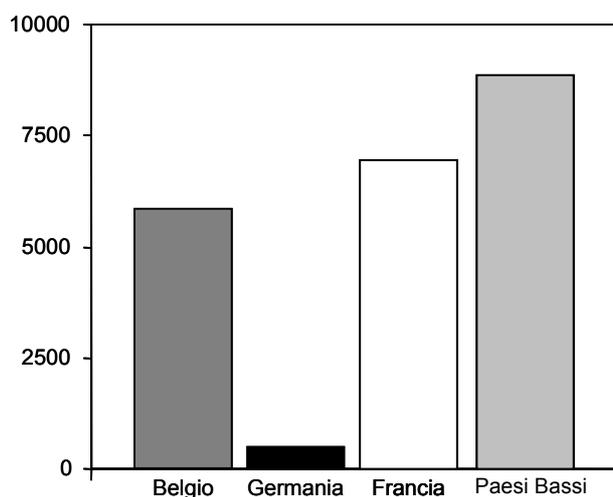


Figura 1. Quantità di alimenti (tonnellate) irradiati nell'Unione Europea nel 2001

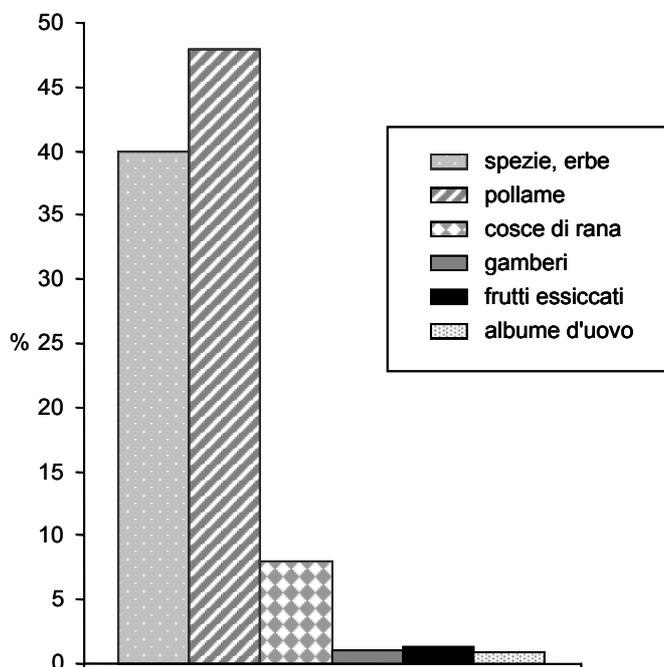


Figura 2. Tipologie di alimenti irradiati nell'Unione Europea nel 2001

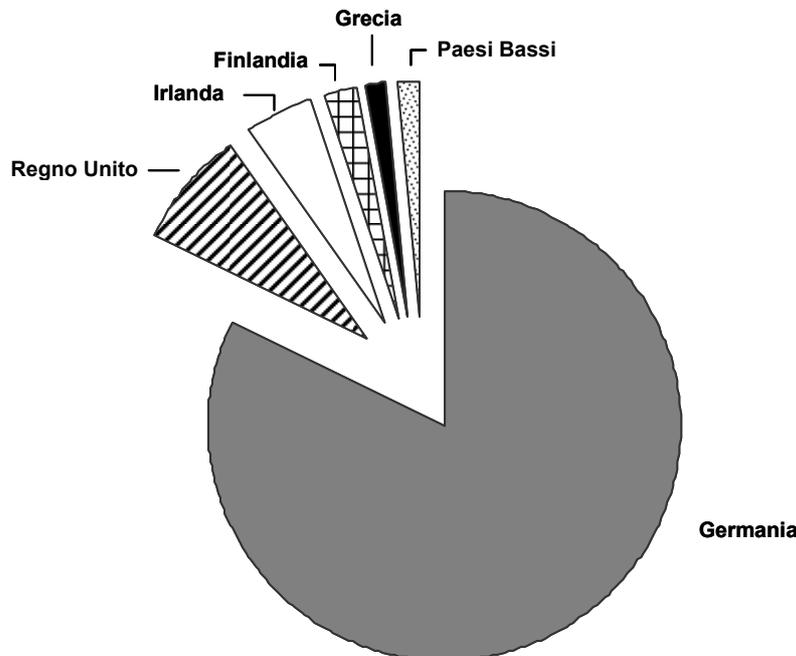
Tra gli alimenti irradiati o loro ingredienti appare evidente la netta prevalenza del pollame, delle spezie e delle erbe seguite dalle cosce di rana. Una bassissima percentuale di alimenti irradiati è rappresentata invece dai gamberi, dai frutti essiccati e dall'albume d'uovo.

È importante sottolineare comunque che i volumi di alimenti trattati sono per lo più molto piccoli in rapporto a quelli non trattati ad eccezione delle cosce di rana, e in misura minore dei gamberetti, che, ad esempio in Francia, sono sempre irradiati.

Inoltre, rispetto alle categorie di alimenti per le quali alcuni Paesi membri hanno mantenuto le autorizzazioni nazionali antecedenti alla direttiva comunitaria (Tabella 1), in realtà solo un numero ristretto di tipologie alimentari o di loro ingredienti viene effettivamente irradiato.

In Italia per esempio nonostante l'irraggiamento di aglio, patate e cipolle sia stato consentito già dal 1973 e quello delle erbe e spezie dal 1996, fino ad ora nessuno dei sopra citati alimenti è stato mai sottoposto nel nostro Paese al trattamento con radiazioni ionizzanti.

Indipendentemente dalla circostanza che venga effettuato o meno il trattamento con radiazioni ionizzanti sul proprio territorio, ciascuno stato membro, con l'apertura dei mercati europei, si trova comunque costretto ad affrontare l'immissione sul mercato interno di prodotti trattati in altri Paesi europei e, secondo quanto previsto dalla direttiva comunitaria, ad espletare i controlli sul prodotto in fase di commercializzazione. Al momento attuale, secondo i dati forniti nel 2002 dalla Comunità Europea, numerosi sono i Paesi che hanno effettuato i controlli previsti (Figura 3).



**Figura 3. Controlli effettuati nell'Unione Europea nel 2001**

Come mostrato nella Figura 3, la Germania, nonostante nel 2001 abbia irradiato un quantitativo minore di alimenti (472 t su 22000 t) rispetto alla Francia, Paesi Bassi e Belgio, risulta in effetti essere lo stato che ha effettuato il maggior numero di controlli, circa il 90% del totale di quelli espletati su scala europea. Un piccolissimo numero di controlli è stato effettuato anche dall'Austria e dalla Svezia (che non compaiono in figura data l'esiguità dei controlli).

effettuati) mentre in Italia così come in Spagna, Francia, Lussemburgo, Portogallo e Danimarca non sono stati effettuati controlli analitici sui prodotti irradiati.

I controlli, secondo i dati riportati dalla commissione, sono stati condotti su più di 6500 campioni privi in etichetta della dicitura “irradiato” costituiti per la maggior parte da erbe e spezie (40%) seguiti da prodotti della pesca, prodotti di carne e in più piccola percentuale da frutti a guscio, verdure e integratori dietetici a base di erbe.

I risultati dei controlli indicano che la quasi totalità dei campioni testati (98,4%) sono conformi all’etichettatura (cioè non irradiati) mentre solo una piccola parte è risultata irradiata ma non correttamente etichettata. La maggior parte dei prodotti non conformi alle norme di etichettatura è rappresentata da erbe e spezie, da integratori a base di erbe e da alcuni campioni di cosce di rana, gamberetti e verdure.

Nel Regno Unito le autorità hanno riscontrato che il 40% degli integratori a base di erbe presenti sul mercato è stato irradiato senza l’apposita etichetta. Si tratta di prodotti che contengono come ingredienti erbe quali aloe, ginkgo biloba, ginseng, guaranà, kava kava, per i quali l’Unione Europea non ha autorizzato il trattamento con radiazioni ionizzanti. La commissione a tale riguardo ha invitato gli stati membri ad effettuare controlli in questo settore al fine di accertare che le disposizioni della direttiva siano rispettate.

L’identificazione del problema degli integratori alimentari dimostra chiaramente come, per il rilevamento di eventuali frodi, sia importante effettuare regolarmente i controlli presso gli impianti e sui prodotti alimentari presenti sul mercato.

Dai dati forniti alla Commissione inoltre è risultato che alcuni dei campioni non conformi provenivano dagli Stati Uniti e dall’Indonesia. L’Europa deve quindi difendersi non solo dal mercato interno ma anche da quanto proviene dal resto del mondo dove l’irraggiamento degli alimenti è indiscutibilmente più accettato e diffuso.

Su scala mondiale, infatti, il trattamento degli alimenti con radiazioni è attualmente effettuato in circa 80 impianti commerciali distribuiti in poco più di 40 Paesi e circa 60 tipologie diverse di alimenti sono ammessi al trattamento. Solo negli Stati Uniti, dove l’irradiazione è largamente diffusa, sono presenti 20 impianti. Nella Tabella 2 vengono riportati i prodotti autorizzati dalla *Food and Drug Administration* (FDA) con le relative dosi e lo scopo per il quale vengono irradiati (11).

**Tabella 2. Applicazioni delle radiazioni ionizzanti accettate in USA dalla FDA**

Prodotto	Dose (KGy)	Scopo del trattamento	Data
Frumento, farina di frumento	0,2-0,5	Disinfestazione dagli insetti	1963
Patate	0,05-0,15	Antigerminazione	1964
Carne di maiale	0,3-1	Controllo <i>Trichinella spiralis</i>	1985
Enzimi disidratati	massimo 10	Controllo microbiologico	1986
Frutta	massimo 1	Disinfestazione e ritardo della maturazione	1986
Vegetali freschi	massimo 1	Disinfestazione	1986
Erbe e spezie e condimenti vegetali	massimo 30	Controllo microbiologico	1986
Carne di pollo fresca o congelata	massimo 3	Controllo microbiologico	1990
Carne congelata confezionata*	minimo 44	Sterilizzazione	1995
Carne cruda refrigerata	massimo 4,5	Controllo microbiologico	1997
Carne cruda congelata	massimo 7	Controllo microbiologico	1997

\* utilizzata solo nei programmi di volo spaziali

## Sviluppi della normativa

Dall'inizio della sua applicazione ad oggi in Europa e nel mondo, il trattamento con radiazioni ionizzanti ha coinvolto un numero sempre maggiore di Paesi e di diverse tipologie alimentari.

Nonostante il Comitato Scientifico dell'Alimentazione umana, basandosi sui lavori della FAO/IAEA/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency/World Health Organization*), abbia affermato che l'irraggiamento delle derrate alimentari fino alla dose massima di 10 KGy non presenti problemi di natura tossicologica, nutrizionale e microbiologica e nel 1986, 1992 e 1998 abbia espresso parere favorevole per l'irraggiamento di diversi tipi di alimenti, il trattamento con radiazione ionizzanti ha provocato e continua a provocare ancora oggi controversie relative alla sua applicazione.

Principalmente in Europa la tecnologia dell'irraggiamento stenta ad essere accettata, come dimostrato dai bassi volumi di alimenti irradiati, probabilmente a causa della scarsa informazione sui benefici che essa può offrire in termini di sicurezza alimentare.

Recentemente le controversie sull'applicazione dell'irraggiamento si sono inasprite in seguito a quanto riportato dal gruppo di studio della FAO/IAEA/WHO nel 1999 (12) che, prendendo in esame quanto pubblicato sull'argomento negli ultimi anni, ha concluso che il trattamento con dosi superiori a 10 KGy non pregiudica l'adeguatezza nutrizionale e la sicurezza tossicologica e microbiologica degli alimenti.

Discussioni in ambito internazionale si sono quindi aperte sulla proposta di abbattere il limite massimo di 10 KGy, finora consigliata per tutti gli alimenti, laddove naturalmente ne sia dimostrata la necessità tecnologica (migliore qualità igienica) e l'assoluta sicurezza per il consumatore.

Nell'aprile del 2003 (13), il Comitato Scientifico dell'Alimentazione umana, che viene sempre chiamato ad esprimere la propria opinione, ha comunque affermato che sebbene gli studi finora effettuati non abbiano mostrato effetti avversi in seguito all'assunzione di alimenti irradiati a dosi maggiori, non esiste una sufficiente evidenza sperimentale tale da supportare una tale proposta. Il Comitato ribadisce inoltre il concetto che per ciascun alimento continua ad essere appropriato specificare una dose massima e che gli alimenti irradiati dovrebbero continuare ad essere valutati individualmente.

## Bibliografia

1. Direttiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 66/16 del 13.3.1999.
2. Direttiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 febbraio 1999 che stabilisce un elenco comunitario degli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* n. L 66/24 del 13.3.1999.
3. CAC (Codex Alimentarius Commission). *Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of food*. Vol. 15. 1<sup>a</sup> ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 1984.
4. Italia. Decreto legislativo 30 gennaio 2001, n. 94. Attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1999/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale* n. 79, supplemento ordinario, 4 aprile 2001.

5. Italia. Decreto Ministeriale 30 agosto 1973. Autorizzazione al trattamento mediante radiazioni gamma, a scopo anti-germogliativo di patate, cipolle ed agli. *Gazzetta Ufficiale* n. 254, 1 ottobre 1973.
6. Italia. Decreto Ministeriale 18 luglio 1996. Regolamento riguardante il trattamento con radiazioni ionizzanti di erbe aromatiche essiccate, spezie e condimenti a base di erbe aromatiche essiccate e di spezie. *Gazzetta Ufficiale* n. 204, 31 agosto 1996.
7. Italia. Decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 230. Attuazione delle direttive 89/618/Euratom, 90/641/Euratom, 92/3/Euratom in materia di radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale* n. 136 - *Supplemento Ordinario* n. 74, 13 giugno 1995.
8. List of Member State's authorization of foods and ingredients which may be treated with ionising radiation. *Official J EC* 2002/C 174/03.
9. List of approved facilities for the treatment of food and food ingredients with ionising radiation in the Member States. *Official J EC* 2002/C 145/04.
10. Relazione della Commissione delle Comunità Europee relativa al trattamento mediante irradiazione degli alimenti nel periodo da settembre 2000 a dicembre 2001. COM(2002) 549 definitivo. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* C 255/2 del 23/10/2002. Disponibile all'indirizzo: [http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/bse/ann\\_rep\\_2000-2001\\_it.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/food/biosafety/bse/ann_rep_2000-2001_it.pdf);
11. Olson DG. Irradiation of Food. A publication of the Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition. *Food Technology* 1998;52:56-62.
12. *High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 KGy*. Geneva: WHO; 1999. (WHO Technical report series No:890).
13. European Commission. *Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food*. Bruxelles: European Commission; 2003. (SCF/CS/NF/IRR/24 Final 24 April 2003). Disponibile all'indirizzo: [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out193\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out193_en.pdf); ultima consultazione 12/10/04.

# BASI BIOFISICHE DELLA INTERAZIONE RADIAZIONI-MATERIA

Antonio Faucitano  
Dipartimento di Chimica Generale, Università di Pavia, Pavia

## Generalità sui meccanismi di interazione radiazioni-materia

### Radiazioni ionizzanti di natura elettromagnetica

Le radiazioni X e  $\gamma$  sono costituite da fotoni di energia  $E=hn$  e si differenziano dalle altre radiazioni dello spettro elettromagnetico solo per l'energia che è molto più elevata (Tabella 1).

**Tabella 1. Spettro delle radiazioni elettromagnetiche**

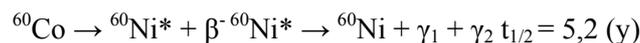
$\lambda$ (m)	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$	$10^{-12}$
Energia (eV)	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$
	Radioonde		Microonde		Infrarosso	Visibile	UV	Raggi X		Raggi $\gamma$		

I meccanismi di interazione dei fotoni X e  $\gamma$  con la materia sono molteplici e la loro importanza relativa dipende dall'energia del fotone (Tabella 2).

**Tabella 2. Meccanismi di interazione prevalente al variare dell'energia della radiazione**

Meccanismo	Ambito di energia (MeV)
Assorbimento fotoelettrico	0,01-0,1
Effetto Compton	0,1-10
Produzione di coppie	> 1,02
Collisioni elastiche	> 10

Il radioisotopo più impiegato come sorgente di radiazioni gamma nelle applicazioni industriali è il  $^{60}\text{Co}$  che decade a  $^{60}\text{Ni}$  emettendo due fotoni da 1,17 e 1,33 MeV: con queste energie l'effetto Compton è prevalente per materiali costituiti da atomi a basso numero atomico (C, O, N, H, ecc.), ed è in effetti l'unico meccanismo significativo (per l'acqua l'effetto Compton è dominante tra 0,1 e 4 MeV):



Nell'effetto Compton il fotone collide con un atomo del materiale subendo una deviazione dalla traiettoria incidente e cedendo parte della sua energia. Questa energia è in genere sufficiente ad estrarre un elettrone dall'atomo bersaglio. L'effetto primario dell'interazione Compton è pertanto la ionizzazione del materiale (Figura 1).

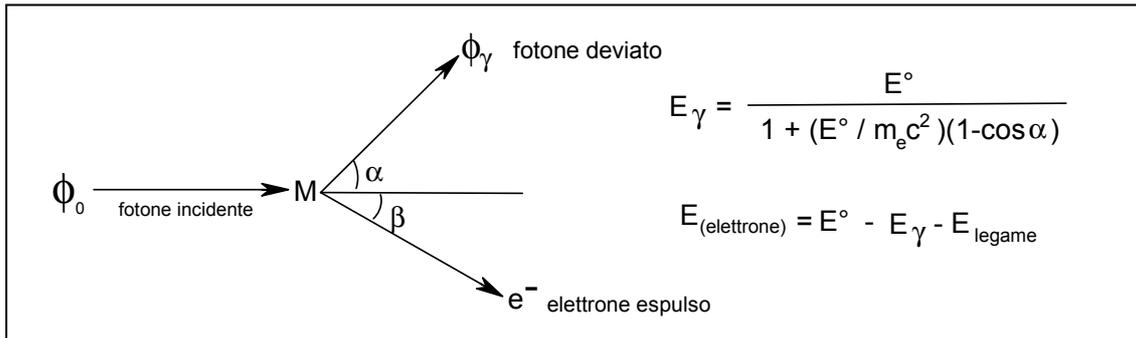


Figura 1. Schematizzazione dell'effetto Compton

In queste condizioni il coefficiente di massa per l'assorbimento di energia,  $\mu_a/r$  è proporzionale al rapporto  $Z/A$ ,

$$\mu_a / \rho \propto Z/A$$

dove  $Z = \sum_i Z_i$  (numero atomico complessivo),  $A = \sum_i A_i$  (peso molecolare),  $\rho =$  densità in  $\text{g/cm}^3$  e  $i$  è l'indice degli atomi costituenti la molecola.  $Z/A$  corrisponde alla densità elettronica del materiale espressa in moli di elettroni/g.

L'attenuazione dell'intensità del fascio di radiazioni nell'attraversamento del mezzo di spessore  $l$  cm e densità  $\rho$  ( $\text{g/cm}^3$ ) è descritta dall'equazione:

$$I = I^0 \exp[-(\mu/\rho) \times l \times \rho]$$

dove  $\mu/\rho$  è il coefficiente di attenuazione di massa che comprende i contributi di *scattering*, Compton elastico e anelastico e l'eventuale contributo degli altri meccanismi.

### Elettroni accelerati

I principali meccanismi di rilascio dell'energia nella materia da parte di fasci di elettroni accelerati e di particelle  $\beta^+$ ,  $\beta^-$  sono :

- a) emissione di radiazioni X (bremsstrahlung);
- b) collisioni anelastiche (interazione coulombiana con gli elettroni del materiale);
- c) *scattering* elastico.

L'emissione di raggi X è trascurabile per energie minori di 0,2 MeV ma cresce rapidamente e diventa dominante per  $E$  maggiori di 10 MeV. Cresce inoltre con l'aumentare del numero atomico  $Z$  del materiale.

Le interazioni anelastiche costituiscono il meccanismo principale nel campo di energia degli elettroni accelerati utile per le applicazioni industriali ( $E < 10$  MeV). La velocità di perdita dell'energia  $-dE/dl$ , descritta dall'equazione di Bethe-Bloch semplificata, risulta proporzionale alla densità elettronica  $Z/A$  del materiale e inversamente proporzionale al quadrato della velocità dell'elettrone:

$$-dE/dl \cong 2\pi N_{av} r_e m_e c^2 \rho(Z/A)(z^2/\beta^2) \times K$$

dove  $\beta = v/c$ ;  $r_e$ ,  $m_e$ ,  $z$ , sono rispettivamente il raggio, la massa e la carica dell'elettrone;  
 $K = [\ln(2m_e \gamma^2 v^2 W_{max}/I^2) - 2\beta^2]$ , dove  $I =$  energia di ionizzazione del materiale,  $W_{max}$  è l'energia massima ceduta nella singola collisione,  $\gamma = 1/(1-\beta^2)^{1/2}$ .

Come per le radiazioni elettromagnetiche, l'effetto principale indotto dagli elettroni nel materiale è pertanto la ionizzazione con una probabilità di interazione che è proporzionale alla densità elettronica del mezzo.

## Struttura della traccia

Un fascio di radiazioni ionizzanti produce nel mezzo attraversato una valanga di elettroni secondari che trasportano la maggior parte dell'energia iniziale. Secondo calcoli effettuati da Bethe più del 80% dell'energia iniziale è trasportata da elettroni con energia minore di 30 eV (Tabella 3).

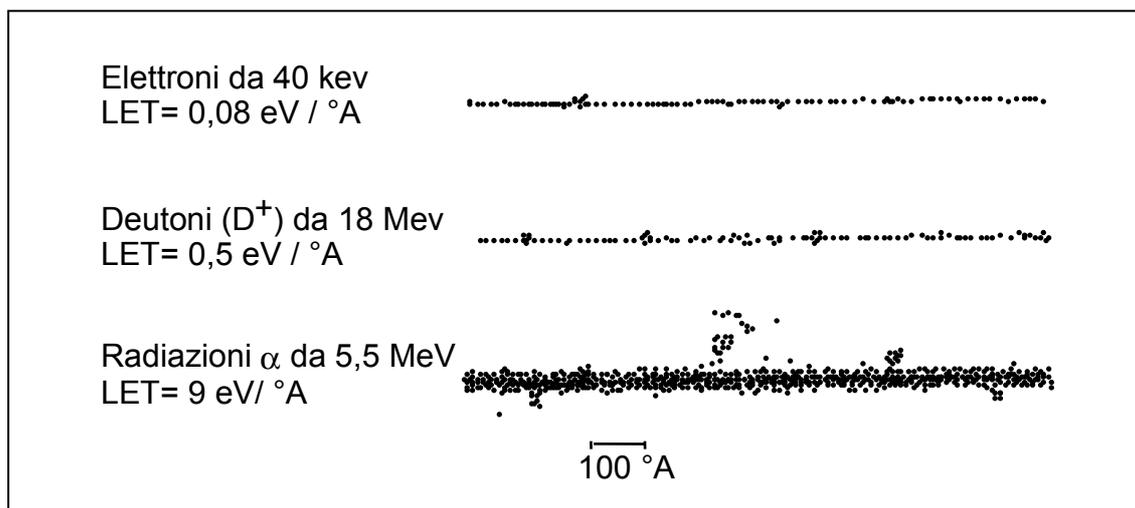
**Tabella 3. Percentuale di elettroni secondari di data energia prodotti da elettroni primari da 1 e 100 MeV**

Energia degli elettroni secondari (eV)	Elettroni primari da $10^3$ eV % dell'energia totale	Elettroni primari da $10^5$ eV % dell'energia totale
0-6,8	50,9	53,3
6,8-27	31,6	29,9
27-67	10,8	8,3
67-135	4,1	3,3
>135	2,7	2,6

Lungo il percorso della radiazione primaria si forma una scia (traccia, *track*) di specie radiolitiche (coppie ione-elettrone, specie eccitate, radicali) concentrate in piccole regioni dello spazio. Questi piccoli raggruppamenti di specie radiolitiche distribuiti in modo discontinuo lungo la traccia sono denominati *spur*, *blob* e raggi delta a seconda che la quantità di energia che li ha generati sia rispettivamente minore di 100 eV, compresa tra 100 e 500 eV o maggiore di 5000 eV. La densità delle *spur* lungo la traccia è determinata dal LET della radiazione.

Il LET (*Linear Energy Transfer*) è la misura della velocità di dissipazione dell'energia della radiazione lungo la traccia, si misura in eV/°A o J/m e cresce con la carica e la massa della particella e con il diminuire dell'energia.

Con radiazioni densamente ionizzanti (per esempio radiazioni  $\alpha$ ) le *spur* si sovrappongono dando origine ad una struttura "colonnare" della traccia (Figura 2).



**Figura 2. Schema di tracce di radiazioni a diverso LET in acqua: ogni punto rappresenta la deposizione di circa 20 eV di energia corrispondente approssimativamente alla formazione di una coppia catione-elettrone**

Sovrapposizione delle *spur* si ha anche per effetto dell'aumento del rateo di dose. Nelle *spur* l'elevata concentrazione favorisce reazioni bimolecolari tra le specie radiolitiche primarie, per esempio: *coupling* di radicali, neutralizzazione tra ioni, reazioni tra molecole eccitate. Le specie primarie che sfuggono alle reazioni intra-traccia diffondono nel mezzo dove completano il percorso reattivo generando prodotti finali della radiolisi. Un soluto eventualmente presente può interagire quasi esclusivamente con le specie che diffondono fuori dalle *spur*.

## Modificazioni chimiche indotte dalle radiazioni di alta energia nella materia

### Confronto tra energia delle radiazioni ed energie di legame e di ionizzazione

Sebbene le radiazioni rilascino gradualmente la loro energia lungo la traccia, l'energia dei singoli "pacchetti" (prevalentemente 5 -150 eV) è comunque spesso superiore alle energie di ionizzazione e dei legami chimici. A titolo di esempio nella Tabella 4 è riportato il confronto tra energie di ionizzazione e di legame con l'energia di fotoni di varia lunghezza d'onda nel campo spettrale compreso tra l'ultravioletto e le radiazioni  $\gamma$ .

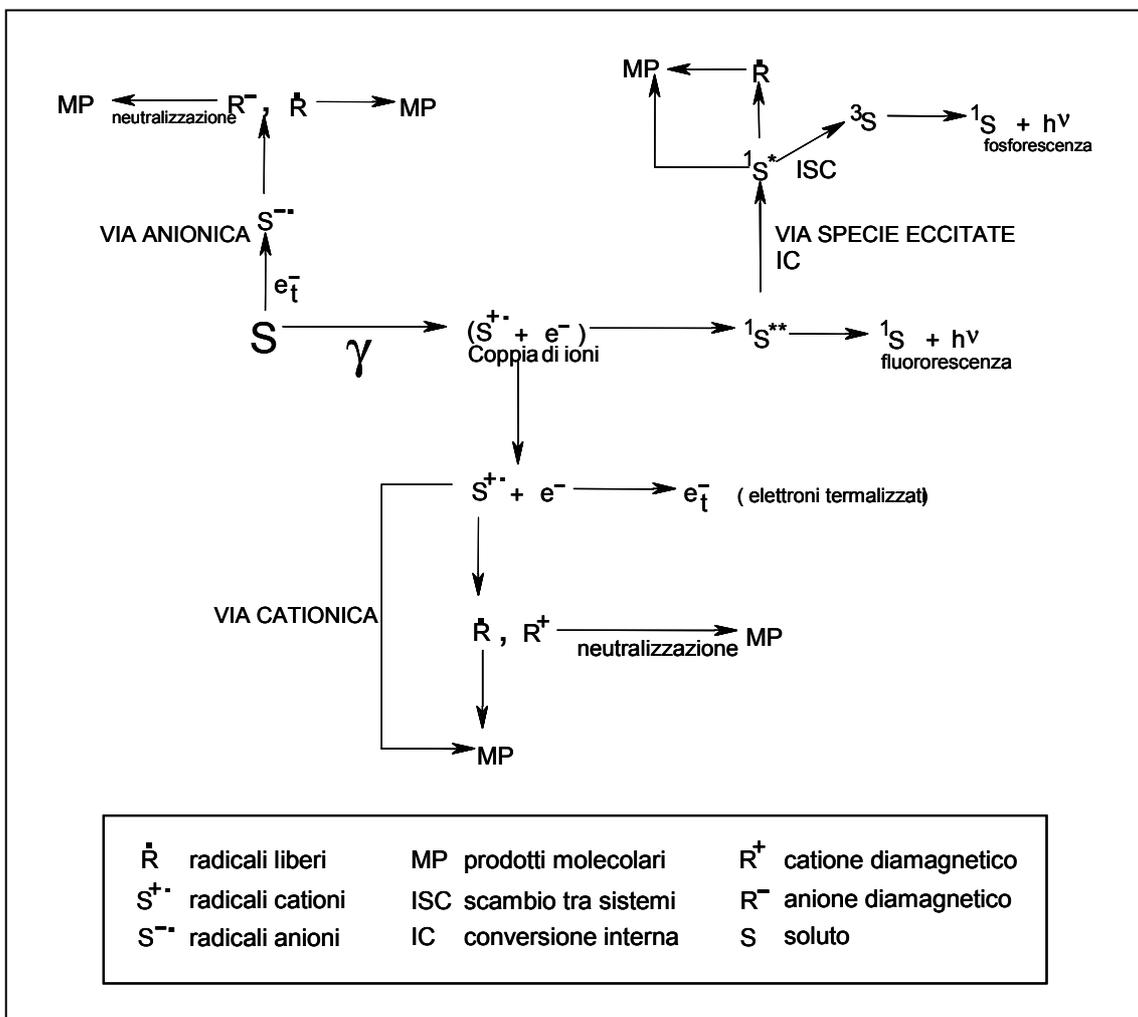
Tabella 4. Confronto tra le energie di ionizzazione e di legame con l'energia dei fotoni

$\lambda$ (nm)	Energia dei fotoni (eV)	Legami	Energia dei legami (eV)
290	4,34	C-H	3-9-4,3
300	4,12	C-C	3,5-3,6
320	3,88	C-O	3,3-3,9
350	3,51	C-Cl	3,1-3,5
400	3,08	C-N	3,3-3,4
0,1	12,320 kev		E di ionizzazione
0,01	1,23 Mev	Alcani	11-13
		Alcheni	9-11
		Idrocarburi aromatici	7-9

L'effetto primario indotto dalle radiazioni di alta energia è la ionizzazione e in minore misura l'eccitazione delle molecole e degli atomi del materiale irraggiato. La radiazione penetra nel mezzo cedendo gradualmente la propria energia creando una scia di specie reattive, tra le quali elettroni, ioni, radicali liberi e molecole eccitate, le cui reazioni sono alla base delle trasformazioni chimiche indotte dalle radiazioni (radiolisi, processo radiolitico). Nelle ionizzazioni indotte dalla radiazione primaria vengono emessi elettroni secondari la cui energia è sufficiente a produrre ulteriori ionizzazioni ed eccitazioni. Gli elettroni secondari di fatto sono responsabili della maggior parte delle trasformazioni radiolitiche indotte.

Lo schema di seguito riportato (Figura 3) rappresenta un meccanismo generale di radiolisi in un sistema organico o inorganico condensato (stato liquido o solido). L'interazione primaria produce ionizzazione e, in misura inferiore, eccitazione. Le coppie ione-elettrone possono ricombinarsi (*geminate recombination*) generando specie eccitate in stato singoletto e tripletto oppure separarsi permettendo ai radicali-cationi liberi (*free ions*) di iniziare reazioni di addizione, estrazione di idrogeno, frammentazione e isomerizzazione (*via cationica del meccanismo di radiolisi*). Gli elettroni, se catturati dalle molecole originarie o dai prodotti di radiolisi generano radicali-anioni che danno inizio ad altre sequenze di reazioni (*via anionica*

del meccanismo di radiolisi). Le specie in stati elettronici eccitati possono perdere rapidamente energia (in ca  $10^{-13}$  s) decadendo per Conversione Interna (*Internal Conversion*, IC) ai più bassi livelli di stato tripletto e singoletto. In questa fase l'eccesso di energia viene ceduto per collisione con altre molecole attraverso gli accoppiamenti con i livelli roto-vibrazionali e degradato ad energia termica. Se l'energia degli stati tripletto e singoletto è abbastanza elevata si possono avere reazioni con rotture di legami e formazioni di radicali liberi. Pertanto è possibile la presenza nella radiolisi di un terzo tipo di meccanismo in competizione con quelli ionici, il meccanismo via specie eccitate.



**Figura 3. Schema generale di meccanismo di radiolisi in sistemi condensati.**  
 (le specie eccitate sono rappresentate con l'asterisco; i numeri riportati come apici in alto a sinistra rappresentano la molteplicità di spin)

Le specie eccitate possono decadere senza reazione emettendo fotoni secondo due meccanismi:

- a) ritorno allo stato fondamentale della stessa molteplicità: può avvenire con emissione di radiazioni di fluorescenza;

- b) ritorno allo stato fondamentale con emissione di radiazioni di fosforescenza. La fosforescenza comporta il ritorno ad uno stato fondamentale con diversa molteplicità. Per esempio, passaggio da uno stato singoletto ad uno stato tripletto eccitati (*InterSystem Crossing*, ISC) e ritorno allo stato singoletto fondamentale.

In conclusione in un processo radiolitico coesistono meccanismi ionici e di eccitazione la cui importanza relativa può variare in un ampio ambito in funzione delle caratteristiche del sistema irraggiato, in particolare la polarità e la costante dielettrica.

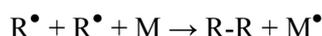
### Effetto della polarità del mezzo

Nei processi radiolitici si hanno in linea di principio sempre due componenti nel meccanismo di radiolisi, la via ionica e quella di eccitazione, la cui importanza relativa è determinata dalla polarità e quindi dalla costante dielettrica del mezzo che controlla la probabilità di separazione delle coppie ione-elettrone. Tanto più il mezzo è polare tanto maggiore è il contributo del meccanismo ionico

### Effetto dello stato fisico del mezzo sul meccanismo di radiolisi

#### *Fase gassosa*

- a) Gli intermedi radiolitici (ioni, molecole eccitate, radicali) diffondono rapidamente fuori dalla traccia e si distribuiscono omogeneamente nel mezzo. Sono meno importanti gli effetti sul meccanismo di radiolisi derivanti dalla costante dielettrica del mezzo e dalla mobilità degli elettroni. Sono trascurabili le reazioni entro traccia e gli effetti derivanti dalle differenze di LET con i diversi tipi di radiazioni.
- b) Il meccanismo di radiolisi è più complesso. In particolare acquistano rilievo le reazioni di frammentazione di ioni, specie eccitate e radicali a causa della ridotta efficienza del meccanismo di *quenching* energetico attraverso le collisioni molecolari. Aumenta la resa dei prodotti di basso peso molecolare.
- c) Le reazioni di *coupling* tra radicali (R<sup>•</sup>) richiedono spesso l'intervento di una terza molecola (M) per dissipare l'energia liberata nella reazione che porterebbe alla immediata dissociazione:



#### *Fase condensata (liquida e solida)*

- a) Il meccanismo di radiolisi dipende dalla costante dielettrica del mezzo e dalla mobilità elettronica mentre ha una relativa importanza la componente ionica e di eccitazione. Nelle sostanze apolari come gli idrocarburi solo una piccola frazione (5-20%) degli elettroni sfugge alle *geminate recombination* determinando una prevalenza della componente di eccitazione.
- b) L'efficienza del meccanismo di *quenching* energetico attraverso le collisioni molecolari riduce l'importanza delle reazioni di frammentazione degli intermedi radiolitici e di conseguenza diminuisce la resa relativa di prodotti di basso peso molecolare.
- c) Rispetto alla fase gassosa le reazioni entro traccia sono significative e acquistano importanza con l'aumentare del LET della radiazione e del rateo di dose.

### Effetto dell'ossigeno

L'ossigeno ha un effetto molto importante sul processo radiolitico la cui efficienza viene notevolmente esaltata sia in rapporto al danno chimico che al danno biologico. La causa di

questo effetto sta nella capacità dell'ossigeno di reagire con i radicali della radiolisi generando radicali perossilici che agiscono da iniziatori di processi ossidativi a catena producendo, con consumo di ossigeno, perossidi e composti carbonilici (acidi carbossilici, chetoni, aldeidi, esteri, ecc.). A titolo di esempio si riporta lo schema semplificato del processo ossidativo associato alla radiolisi di un idrocarburo (il propano) in presenza di aria (Figura 4). Lo schema mostra un ciclo di propagazione imperniato sui radicali perossilici  $RO_2\cdot$  che producono idroperossidi  $ROOH$  attraverso la reazione di estrazione di idrogeno da legami C-H nelle molecole di partenza (ciclo idroperossidativo) rigenerando i radicali al carbonio. Un secondo ciclo di propagazione è impostato sui radicali alcossilici  $RO\cdot$  prodotti dal coupling con disproporzionamento di radicali perossilici. I radicali alcossilici possono dare due tipi di reazione in competizione: l'estrazione di idrogeno con formazione di alcoli  $ROH$ ; la scissione in b con formazione di aldeidi  $RCHO$  o chetoni  $RC(=O)R'$  a seconda che il radicale alcossilico sia secondario (come nell'esempio dello schema) o terziario. L'accumulo dei prodotti di ossidazione aumenta la probabilità di reazioni secondarie e la complessità del quadro dei prodotti.

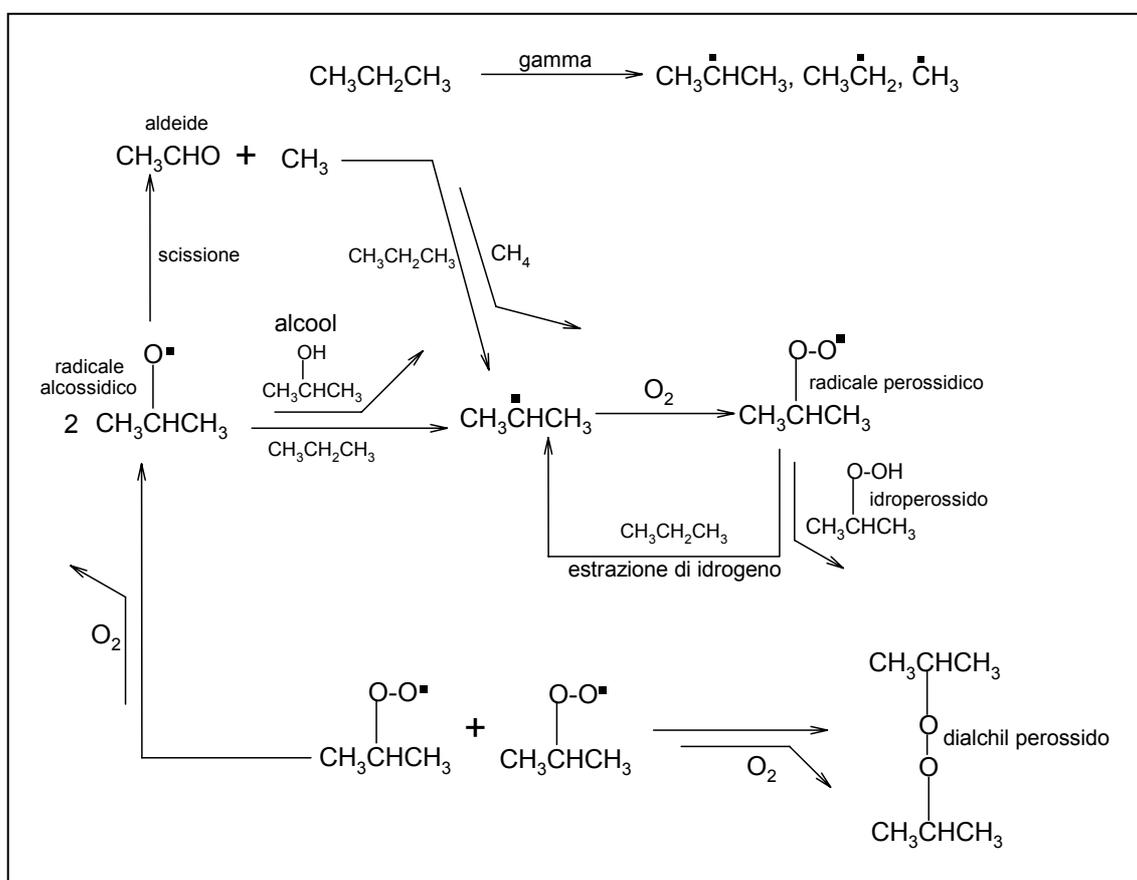


Figura 4. Schema di radiolisi di un idrocarburo in presenza di ossigeno

## Radiolisi dell'acqua e delle soluzioni acquose

L'acqua costituisce il 70% circa degli organismi e delle cellule per cui negli alimenti come carne, pesce, ecc. sottoposti all'azione delle radiazioni, la maggior parte dell'energia viene

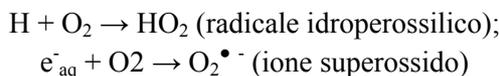
assorbita dall'acqua. Il meccanismo chimico alla base dell'azione battericida proviene perciò in gran parte dall'azione delle specie radiolitiche dell'acqua.

A causa della polarità della molecola, il meccanismo principale nella radiolisi dell'acqua è quello ionico e le specie primarie sono il radicale catione  $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$  e l'elettrone. Quest'ultimo perde progressivamente energia sino a raggiungere il livello dell'energia termica a temperatura ambiente (ca 0,025 eV) e viene quindi "catturato" da una gabbia di molecole di acqua che l'elettrone stesso orienta con il polo positivo verso di sé. Si forma così l'elettrone acquato  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  che è un vero e proprio intermedio di reazione. La specie  $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$  cede rapidamente un protone ad un'altra molecola d'acqua generando il radicale  $\text{OH}^\bullet$ . Nelle condizioni di elevata concentrazione della traccia gli elettroni acquati e i radicali  $\text{OH}^\bullet$  reagiscono parzialmente tra di loro, con molecole di acqua e con ioni  $\text{H}_3\text{O}^+$  (prodotti nell'autoprotolisi dell'acqua) generando specie molecolari come  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . In condizioni di pH vicine alla neutralità (bassa concentrazione di  $\text{H}_3\text{O}^+$ ), le specie radiolitiche primarie che emergono dalla traccia sono pertanto:  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ,  $\text{H}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A  $\text{pH} \ll 7$  (alta concentrazione di  $\text{H}_3\text{O}^+$ ) gli elettroni acquati vengono completamente trasformati in atomi di H nella reazione:  $\text{e}^-_{\text{aq}} + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow \text{H} + \text{H}_2\text{O}$ . La resa delle specie radiolitiche dell'acqua per radiazioni gamma ed elettroni nelle diverse condizioni di pH è riportata nella Tabella 5.

**Tabella 5. Resa delle specie radiolitiche dell'acqua per radiazioni gamma ed elettroni in diverse condizioni di pH**

G(-H <sub>2</sub> O) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	G(H <sub>2</sub> ) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	G(H) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	G(OH) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	G( $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	G(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ( $\mu\text{moli/J}^1$ )	pH
0,48	0,041	0,38	0,30	0	0,080	0,46
0,42	0,047	0,057	0,28	0,27	0,070	3-11

La presenza dell'ossigeno modifica significativamente il quadro delle specie radiolitiche attraverso le reazioni:



Per effetto di queste reazioni la radiolisi dell'acqua in presenza di ossigeno produce solo due specie,  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{HO}_2$ , con resa pressoché uguale (Figura 5).

### Soluzioni acquose: radiolisi indiretta di composti in soluzione

Nella radiolisi di soluzioni acquose le specie generate dall'acqua attaccano il soluto modificandone la struttura chimica. La specie principale in questo meccanismo di radiolisi indiretta è il radicale  $\text{OH}^\bullet$ . Meno reattivi risultano invece i radicali idroperossilici  $\text{HO}_2$

Le reazioni principali dei radicali  $\text{OH}^\bullet$  sono:

- attacco ossidativo con trasferimento di elettrone:  
 $\text{RH} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{RH}^+ + \text{OH}^-$
- estrazione di idrogeno  
 $\text{RH} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{R}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$
- addizione al doppio legame  
 $\text{RCH}=\text{CHR} + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{HO}-(\text{R})\text{CH}-\text{CH}^\bullet\text{R}$

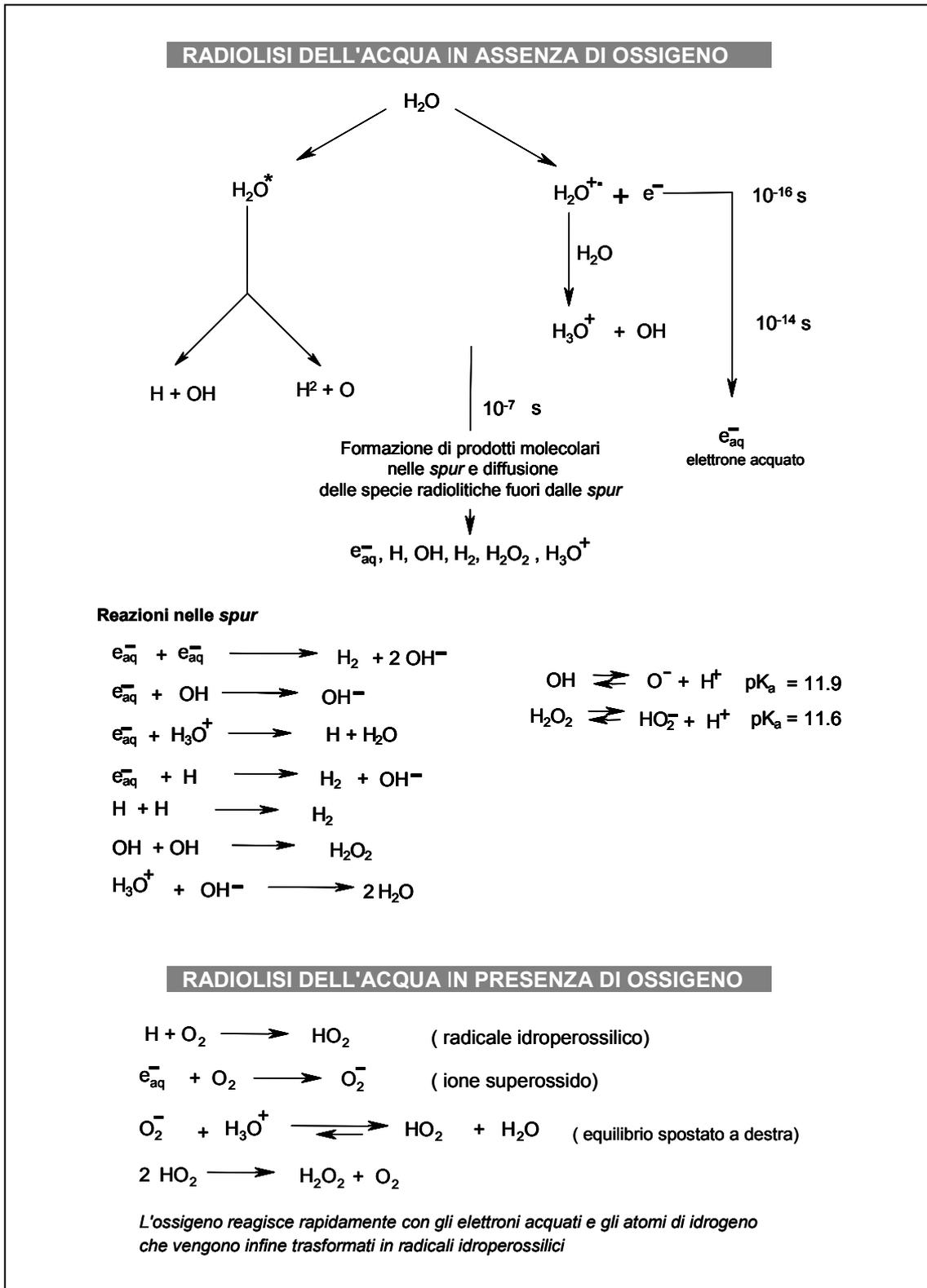


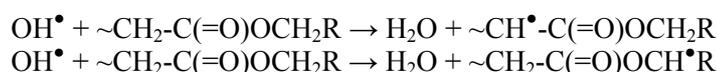
Figura 5. Radiolisi dell'acqua in presenza e in assenza di ossigeno

I radicali al carbonio che risultano da queste reazioni addizionano ossigeno dando inizio a catene idroperossidative con formazione finale di perossidi, chetoni, aldeidi, ecc.

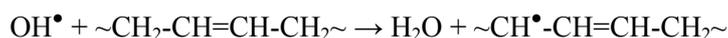
Le reazioni dei radicali OH• con il DNA formano un quadro molto complesso al quale qui si accenna soltanto. Sotto il profilo dell'efficacia del danno biologico una delle reazioni più importanti è l'addizione al doppio legame in C8 nelle basi puriniche, in particolare la guanina, con formazione finale del derivato 8-idrossiguanosinico usato come *marker* della degradazione ossidativa della cellula. Altra reazione importante è l'addizione in C6 al doppio legame della timidina e l'estrazione di idrogeno dai C-H delle unità di deossiribosio che può causare a seconda del sito di attacco il distacco della base o la rottura del filamento.

L'attacco più frequente nelle proteine può avvenire sulla catena, con formazione di radicali al carbonio, o sui sostituenti laterali più reattivi, come -SH (cisteina), -OH (tirosina), C-H benzilici (fenil alanina), C-H secondari e terziari. Importanti sono anche le reazioni di addizione agli anelli aromatici e al triptofano.

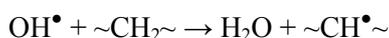
Nel caso di strutture esteree e idrocarburiche l'attacco avviene sui legami adiacenti al gruppo funzionale dove è presente il legame C-H più debole, così ad esempio nei gliceridi:



Se sono presenti strutture idrocarburiche insature (prostaglandine, grassi insaturi) siti preferiti di attacco sono i C-H allilici situati in posizioni adiacenti ai doppi legami:

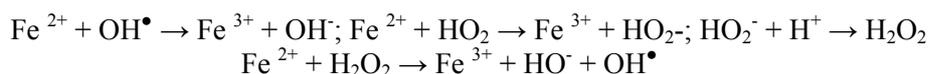


È bene sottolineare tuttavia che il radicale OH• non è molto selettivo a causa della sua elevata reattività (la selettività dell'attacco radicalico diminuisce con la reattività del radicale); pertanto nei grassi è significativo anche l'attacco ai C-H nelle catene idrocarburiche sature che è favorito dal fattore statistico (molti gruppi ~CH₂~ disponibili):



Il ruolo dei radicali HO₂ in queste reazioni è limitato a causa della loro bassa reattività. Il destino più probabile di queste specie è il *coupling* con disproporzionamento a H₂O₂ che può generare radicali OH reagendo con ioni di metalli di transizione.

Gli ioni dei metalli di transizione reagiscono con i radicali OH• e HO₂ in reazioni di ossidoriduzione; un esempio ben noto è quello dello ione ferroso le cui reazioni sono alla base del dosimetro di Fricke:



## Radiolisi di idrocarburi

La radiolisi diretta di idrocarburi saturi C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub> (metano etano, propano, ecc.) in condizioni anaerobiche porta a prodotti formalmente giustificabili sulla base di rotture di legami C-H, C-C e di reazioni di accoppiamento e disproporzionamento di radicali. Si formano idrocarburi saturi e insaturi con numero di atomi di carbonio inferiore e superiore a quello della molecola originaria, e si libera idrogeno.

La radiolisi degli alcheni C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub> (etilene, propene, butene, ecc.) è fortemente influenzata dalla presenza del (dei) doppio legame. In particolare si hanno reazioni di addizione di radicali H ai doppi legami con conseguente diminuzione della resa dell'idrogeno e aumento delle rese di idrocarburi di peso molecolare elevato; nel caso dell'etilene queste reazioni portano alla formazione di alti polimeri (polietilene).

Gli idrocarburi aromatici (benzene e suoi derivati) presentano una particolare radiostabilità con rese di decomposizione radiolitica da 10 a 100 volte inferiori rispetto a quelle degli alcani e degli alcheni. Ciò si deve all'efficienza dei meccanismi di conversione interna e di ISC che popolano i primi stati di singoletto e tripletto eccitati caratterizzati da un basso contenuto di energia spesso insufficiente a produrre ionizzazioni e rotture di legami. Il ritorno allo stato fondamentale avviene con emissione di radiazioni (fluorescenza, fosforescenza) o attraverso l'accoppiamento con gli stati vibrorotazionali. Quest'ultimo meccanismo è molto efficiente e porta sostanzialmente alla degradazione ad energia termica dell'energia radiante assorbita riducendo la probabilità di trasformazioni chimiche. Su questo meccanismo si basa l'uso di idrocarburi aromatici come radiostabilizzanti e la maggiore radiostabilità di polimeri contenenti strutture aromatiche (es. polistirene vs polipropilene)

Nella Tabella 6 sono riportate le rese radiolitiche di idrocarburi C<sub>6</sub> rappresentativi della classe degli alcani (esano), alcheni (esene) e aromatici (benzene) riferite alla formazione di H<sub>2</sub> e di idrocarburi di peso molecolare inferiore e superiore a quello della molecola originaria. Gli irraggiamenti sono stati effettuati con radiazioni gamma e elettroni accelerati. Le rese radiolitiche vengono rappresentate dal simbolo G(X), dove X è il prodotto di reazione e si esprimono in moli per joule di energia assorbita (moli/J).

**Tabella 6. Rese radiolitiche di idrocarburi C<sub>6</sub>**

Idrocarburo	Rese radiolitiche G(X) (μ moli/J)			
	H <sub>2</sub>	da C <sub>1</sub> a C <sub>n-1</sub>	da C <sub>n</sub> a C <sub>2n-1</sub>	> C <sub>2n</sub>
Esano C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	0,544	0,177	0,344	0,103
Esene C <sub>6</sub> H <sub>2n</sub>	0,083	0,012	0,011	0,7
Benzene C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,004	0,002	0,003	0,097

Anche in questo caso l'ossigeno modifica profondamente il quadro dei prodotti del processo radiolitico promuovendo la formazione di perossidi e composti carbonilici. A titolo di esempio si riporta, in Tabella 7, il confronto dei prodotti della radiolisi del cicloesano in condizioni anerobiche e in presenza di ossigeno (vengono riportate solo le rese > 0,01).

**Tabella 7. Confronto dei prodotti della radiolisi del cicloesano in condizioni anerobiche e in presenza di ossigeno**

Prodotti	Rese radiolitiche G(X) μmoli/J	
	senza ossigeno	con ossigeno
H <sub>2</sub>	0,58	-
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub>	0,01	-
1-esene	0,05	0,027
Esano	0,01	-
Metilciclopentano	0,03	-
Cicloesene	0,33	0,15
Bicicloesile	0,20	0,03
Idrocarb. > C <sub>12</sub>	0,02	-
Cicloesanolo	-	0,329
Cicloesanone	-	0,273
Perossidi	-	0,063

## Radiolisi di gruppi funzionali organici

Il meccanismo di radiolisi dei composti organici è determinato dalla natura dei gruppi funzionali presenti nella struttura della molecola. Ciascun gruppo funzionale ha un ben definito comportamento radiolitico per cui è possibile stimare l'effetto delle radiazioni su molecole complesse sommando gli effetti di ciascun gruppo. Si tratta evidentemente di una approssimazione grossolana ma utile specialmente quando la struttura è tale da rendere meno probabili le interferenze di meccanismo tra i vari gruppi. Di seguito sono riportate in modo schematico le principali reazioni della radiolisi diretta di alcuni tra i più importanti gruppi funzionali (Figure 6-9). I dati devono essere considerati come *building block* di processi radiolitici in sistemi complessi.

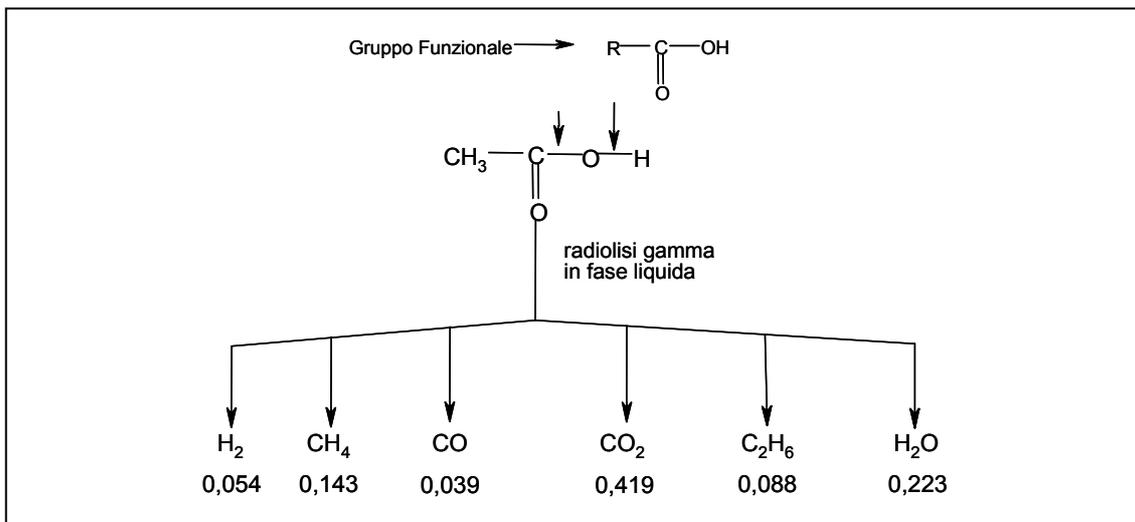


Figura 6. Radiolisi di acidi carbossilici (le frecce indicano i legami che hanno maggiore tendenza a rompersi nel processo radiolitico; le rese sono espresse in micromoli/J)

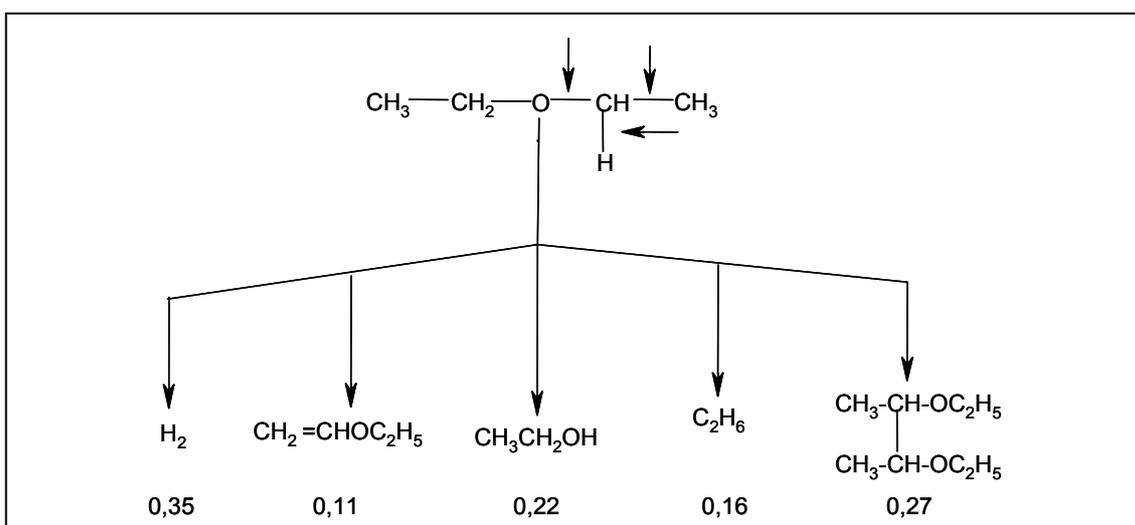


Figura 7. Radiolisi di eteri (le frecce indicano i legami che hanno maggiore tendenza a rompersi nel processo radiolitico. Le rese sono espresse in micromoli/J)

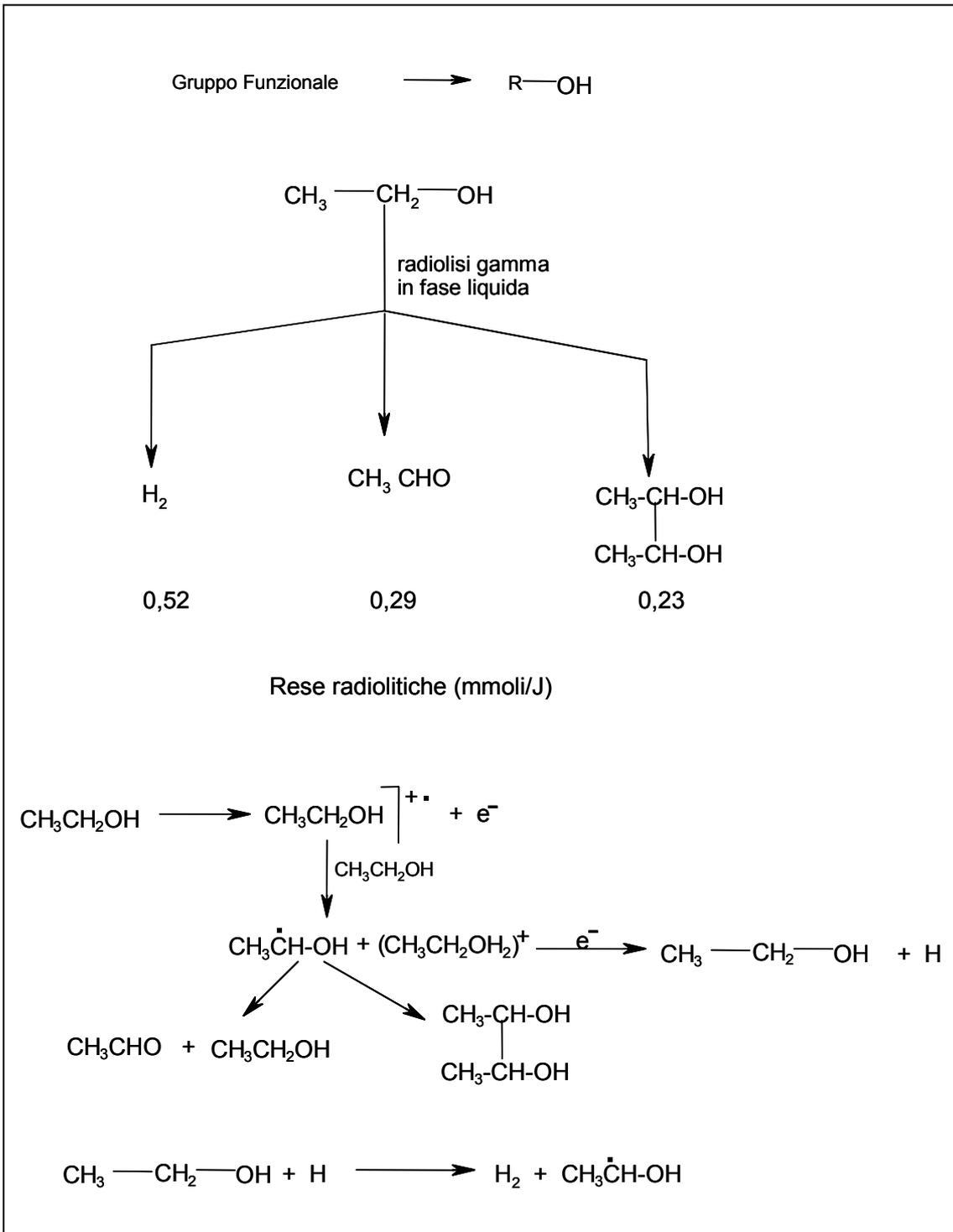
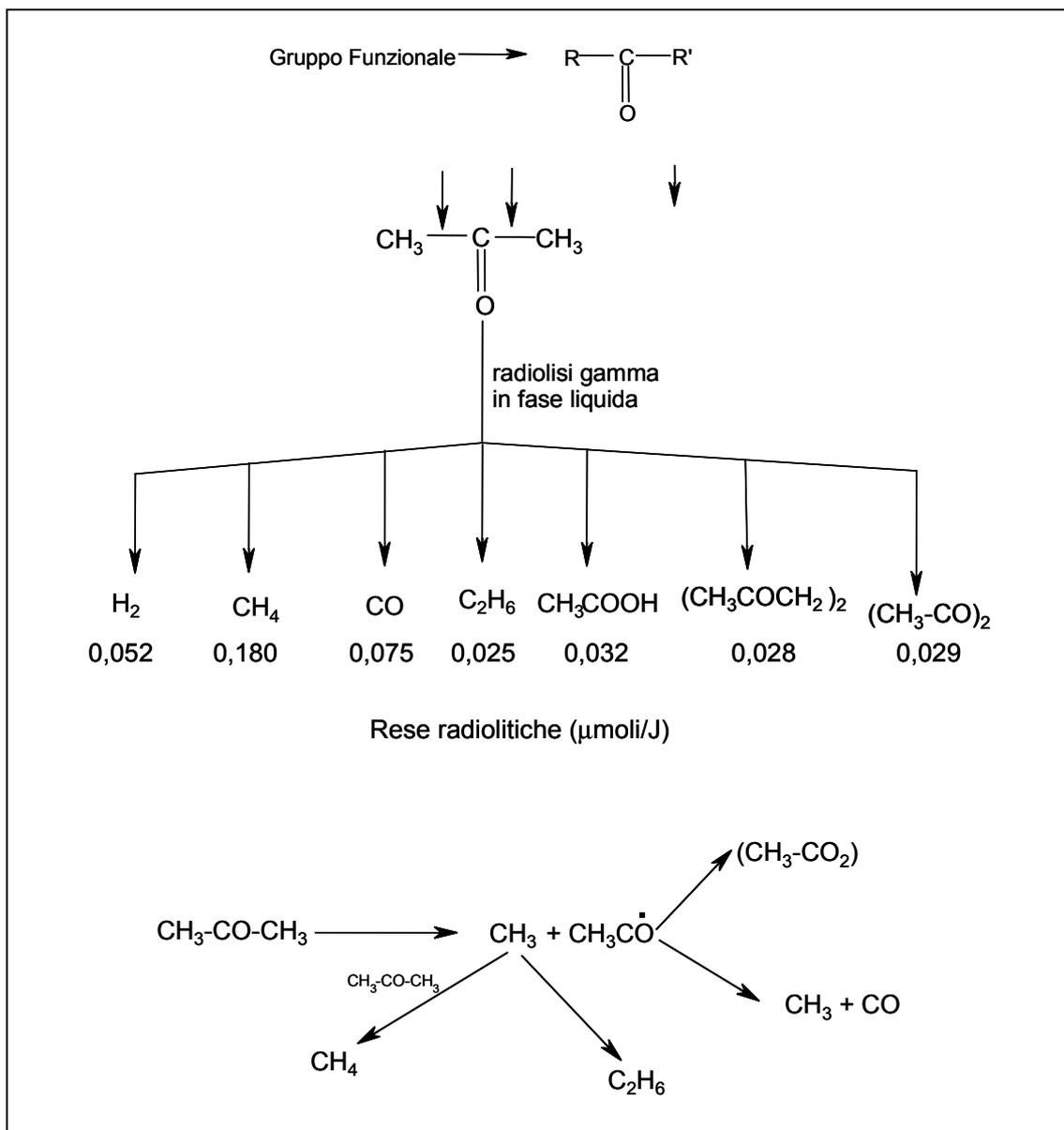


Figura 8. Radiolisi di alcoli  
(le rese sono espresse in micromoli/J)



**Figura 9. Radiolisi di chetoni**  
*(le frecce indicano i legami che hanno maggiore tendenza a rompersi nel processo radiolitico;  
 le rese sono espresse in micromoli/J)*

## Conclusioni

Le caratteristiche distintive delle radiazioni di alta energia rispetto ad altri tipi di radiazioni sono:

1. l'elevata energia che è  $> 1$  keV;
2. i meccanismi di interazione con la materia che sono imperniati sulla ionizzazione degli atomi e delle molecole del mezzo attraversato.

In base alla loro natura le radiazioni di alta energia si dividono in radiazioni di tipo elettromagnetico (raggi  $\gamma$ , raggi X) e radiazioni particellari costituite da fasci di particelle emesse nei decadimenti radioattivi o da acceleratori (e- accelerati, radiazioni  $b^+$ ,  $b^-$ ,  $\alpha$ ,  $H^+$ ,  $D^+$ , neutroni, ecc.).

Nei composti organici e inorganici le radiazioni causano profonde modificazioni chimiche e chimico-fisiche (processo radiolitico, radiolisi). Nei metalli l'energia radiante assorbita viene invece degradata ad energia termica.

Nonostante questi effetti chimici le radiazioni di alta energia possono essere vantaggiosamente impiegate nei trattamenti di sterilizzazione degli alimenti perché, alle dosi necessarie per ottenere i livelli di SAL richiesti, l'entità del danno chimico indotto è quasi sempre trascurabile ( $< 0,1\%$  di composto trasformato con dosi di circa 10 kGy). Questa apparente contraddizione (basso livello di trasformazione chimica vs alto livello di danno radiobiologico) si deve al fatto che il danno sul DNA nucleare, sufficiente a causare la morte della cellula, è reso altamente probabile dalla dimensione della macromolecola

La dose assorbita di radiazioni si esprime in Gray (Gy); 1Gy corrisponde all'assorbimento di 1 J di energia per kg di materiale. Il rateo di dose si esprime in Gy/t (t = tempo espresso in h, min, s).

Le rese dei prodotti di radiolisi vengono espresse dal simbolo G(X), tuttavia, la vecchia unità di misura è ancora in uso ed è espressa in molecole di prodotto per 100 eV di energia assorbita. Si può passare dalle vecchie unità alle nuove moltiplicando per il fattore 0,10364.

Le radiazioni di alta energia esercitano la loro azione su qualunque tipo di sostanza esposta. Non sono necessarie cioè condizioni di risonanza, come avviene per esempio nella fotochimica, perché si abbia assorbimento di energia. Per le radiazioni in uso nel trattamento degli alimenti (X e  $\gamma$  di ca 1 MeV, elettroni accelerati 5-9 MeV) la probabilità di assorbimento dell'energia è proporzionale alla densità elettronica del materiale esposto espressa in moli di elettroni/g. Nel caso delle sostanze alimentari, che hanno spesso una natura composita (es. carne, pesce frutta, ecc.), l'energia totale assorbita viene generalmente ripartita su ciascun componente in misura proporzionale alla rispettiva frazione.

I diversi tipi di radiazioni danno luogo ad effetti chimici e fisici del tutto simili. Ciò si deve al fatto che per tutti i tipi di radiazioni il processo radiolitico parte dalla ionizzazione degli atomi e delle molecole e si sviluppa attraverso l'azione degli elettroni secondari ai quali si deve gran parte degli effetti finali osservati.

Le radiazioni di interesse pratico nella tecnologia dell'irraggiamento degli alimenti sono: le radiazioni  $\gamma$  da  $^{60}\text{Co}$  (fotoni con energia media 1,25MeV); fasci di elettroni accelerati con energia 5-9 MeV; radiazioni X (tecnologia in via di sviluppo). Con questi tipi di radiazioni le differenze osservabili a parità di dose assorbita sono da attribuirsi a differenze nei ratei di dose che possono essere anche 103 superiore quando si impiegano acceleratori di elettroni.

## Bibliografia

1. Swallow AJ. *Radiation chemistry of organic compounds*. London: Pergamon Press; 1960.
2. Farahtaziz , Rodgers J. *Radiation chemistry*. New York: VCH Publishers; 1987.
3. Spinks JWT, Woods RJ. *Introduction to radiation chemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990.
4. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Tihany Symposium on Radiation Chemistry, 1 August 2002 Sopron (Hungary); *Radiat Phys Chem* 2003;67(3-4).
5. Molin RA. *Food irradiation: principles and applications*. New York: Wiley Interscience; 2001.
6. Breen AP, Murphy JA. Reactions of Oxy radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 1995;18(6):1033-77

## SICUREZZA D'USO: ASPETTI NUTRIZIONALI E ORGANOLETTICI

Elisabetta Sanzini

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Introduzione

Gli alimenti costituiscono per l'uomo una necessità vitale dal momento che apportano sia il carburante necessario alla produzione di energia sia i principi nutritivi indispensabili al mantenimento di un equilibrio biologico armonioso che si identifica con la buona salute. Ma gli alimenti freschi, lasciati a se stessi, vanno incontro più o meno rapidamente a una serie di trasformazioni fisiche e chimiche che li rendono non commestibili.

Il deterioramento dei cibi e delle derrate alimentari costituisce un problema che l'uomo, da tempi immemorabili, ha cercato di risolvere (Tabella 1).

**Tabella 1. Vita media in giorni di alcuni alimenti tenuti a 21°C**

Giorni			
1-2	1-7	1-20	> 360
Carne e pollame Pesce Ortaggi in foglia	Frutta Verdura	Patate Carote Tuberi in genere	Frutta secca Semi

La cottura, l'essiccamento, l'affumicamento, la salagione, la trasformazione di alimenti deperibili in altri più stabili e ulteriori mezzi, più o meno rudimentali, sono stati impiegati per millenni allo scopo di conservare il più a lungo possibile i raccolti stagionali, i prodotti dell'allevamento, i bottini di caccia. Trasferiti a livello industriale anche i metodi tradizionali, oltre a quelli innovativi, acquistarono fondamenti scientifici: occorre conoscere bene le cause delle alterazioni degli alimenti per poterle contrastare o eliminare danneggiando il meno possibile i prodotti.

I principi su cui sono basati i diversi metodi di conservazione dei cibi sono di natura fisica e/o di natura chimica e l'irradiazione con raggi gamma è una tecnologia di conservazione, adottata dalla metà del secolo scorso, che viene utilizzata per:

- ritardare la maturazione e inibire la produzione di germogli;
- controllare la moltiplicazione di insetti, parassiti, vermi, batteri, muffe e lieviti patogeni e saprofiti;
- sterilizzare derrate alimentari che possono essere immagazzinate per lunghi periodi senza essere refrigerati.

Come sopra esposto, le motivazioni per cui si ricorre all'irradiazione sono molteplici; nella Tabella 2 viene mostrato come si raggiungono tali finalità impiegando dosi differenti di radiazioni (1).

**Tabella 2. Finalità del trattamento con radiazioni ionizzanti e dosi impiegate**

Funzioni	Dosi (kGy)
Inibizione della germogliazione	0,05-0,15
Disinfestazione e disinfezione (eliminazione di insetti e parassiti)	0,15-0,5
Ritardo di processi fisiologici (ad esempio maturazione)	0,5-1,0
Prolungamento tempo conservazione	1,0-3,0
Eliminazione di batteri saprofiti e patogeni	1,0-7,0
Miglioramento delle proprietà tecnologiche *	2,0-7,0
Sterilizzazione industriale (in combinazione con leggero riscaldamento)	30-50
Decontaminazione di alcuni additivi e ingredienti alimentari	10-50

\* UVA per aumentare la resa di succo, ortaggi disidratati per ridurre i tempi di cottura

Molte delle applicazioni sopraelencate possono essere un'alternativa a metodi chimici di conservazione, quali ad esempio, quelli che utilizzano il dibromuro di etilene (EDB), il bromuro di metile, la fosfina, l'ossido di etilene e l'acido cianidrico utilizzati per la disinfestazione degli insetti nella frutta e negli ortaggi freschi. In molti Paesi attualmente l'uso dell'EDB e dell'ossido di etilene non è più consentito.

## Influenza dell'irraggiamento

Moltissime indagini sono stati condotte sia per studiare l'influenza dell'irraggiamento sulla qualità nutrizionale e sulle caratteristiche organolettiche degli alimenti sia per confrontare i dati ottenuti con quelli relativi ad altri trattamenti tecnologici. Studi sull'irradiazioni degli alimenti vengono condotti da più di quarant'anni e sono stati sottoposti a numerose analisi critiche a livello nazionale e internazionale. Queste ricerche sono state condotte su alimenti trattati a basse (fino a 1 kGy), medie (1-10 kGy) e alte (10-50 kGy) dosi (2, 3).

Nonostante questo notevole supporto scientifico, nell'Unione Europea solo alcuni Paesi (Belgio, Francia, Regno Unito, Italia e Paesi Bassi) consentono l'irradiazione di specifici alimenti, oltre alle erbe aromatiche essiccate, spezie e condimenti vegetali, che sono ora ammesse in tutti i Paesi comunitari. Gli alimenti per cui è ammesso l'irraggiamento sono:

- *origine animale*: pollame  
gamberi  
pesci e molluschi  
cosce di rana  
albume d'uovo  
caseina
- *origine vegetale*: patate  
aglio  
cipolle  
scalogno  
legumi  
cereali  
gomma arabica  
frutta e verdura fresca e secca.

Per quanto riguarda i caratteri organolettici, si manifestano variazioni di colore, odore, sapore e consistenza dovute essenzialmente alle trasformazioni indotte dalle radiazioni sui

costituenti dell'alimento. I raggi gamma provocano reazioni di ossidazione e riduzione, polimerizzazioni con liberazione acido solfidrico e formazione di vari solfuri organici, probabilmente derivati dal glutatione, responsabili di odori sgradevoli. Le variazioni di colore avvengono generalmente in seguito all'imbrunimento non enzimatico che si manifesta in modo più evidente rispetto al prodotto non trattato. Comunque l'entità delle variazioni è legata soprattutto all'applicazione corretta del processo di irradiazione.

Per quanto riguarda la qualità nutrizionale l'irraggiamento può influenzare sia i macronutrienti sia i micronutrienti (4).

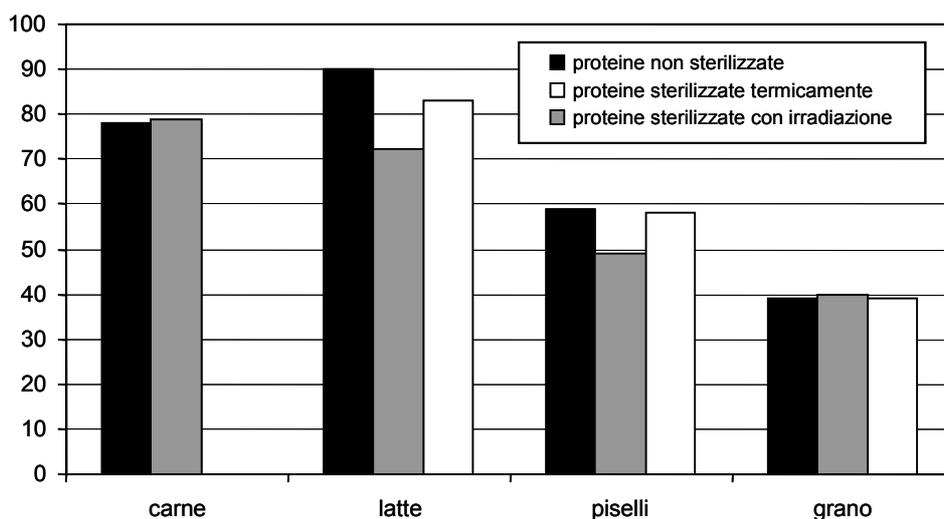
Le alterazioni delle *proteine* consistono soprattutto in ossidazioni dei gruppi aminici e sulfidrilici degli aminoacidi che le costituiscono e avvengono anche con basse dosi di trattamento, con quantità superiori si possono verificare rotture delle catene laterali, denaturazione e precipitazione

Numerosi studi condotti su animali con diete irradiate che fornivano quantità significative di proteine, anche a dosi sterilizzanti, hanno dimostrato che non ci sono effetti significativi sul valore nutrizionale; come si può vedere dalla Tabella 3 la digeribilità e il valore biologico non sono influenzati dal trattamento con dosi almeno fino a 70 kGy (5).

**Tabella 3. Effetto dell' irraggiamento sulla qualità proteica di una dieta per ratto**

Dose kGy	Digeribilità vera (%)	Valore biologico (%)	Utilizzazione proteica netta
0	85,6	80,5	68,9
5	83,6	75,8	63,5
10	86,5	81,7	70,6
25	87,0	78,1	68,0
30	84,8	77,3	65,4
70	85,3	76,4	65,2

Quindi, anche se si verificano alterazioni nella composizione chimica delle proteine, queste trasformazioni non alterano in modo rilevante il loro valore biologico come si può ricavare dal grafico, rappresentato nella Figura 1, che raffronta le variazioni del valore biologico delle proteine in alcuni alimenti sterilizzati con varie tecnologie.



**Figura 1. Variazioni del valore biologico delle proteine in alcuni alimenti sterilizzati con varie tecnologie**

In seguito all'irraggiamento anche gli *aminoacidi* liberi possono subire deaminazioni con liberazione di ammoniaca e decarbossilazioni con formazione di ammine, tutte queste reazioni sono caratterizzate da odori intensi e sgradevoli. È possibile anche che si formino D-aminoacidi che, come noto, non sono disponibili per l'organismo umano.

Anche i *glucidi* possono alterarsi in seguito a processi ossidativi e idrolitici attivati dalle radiazioni ionizzanti, i polisaccaridi si trasformano dapprima in monosi e successivamente in acidi aldonici e uronici. Le pectine invece vengono idrolizzate a prodotti solubili in acqua determinando il rammollimento del prodotto.

Le alterazioni causate dall'irraggiamento a carico dei *lipidi* consistono nella rottura della catena idrocarburica degli acidi grassi con formazione di catene più corte o, in seguito a ricombinazione dei frammenti, a catene più lunghe e ramificate.

Gli acidi grassi saturi vanno incontro alla decarbossilazione con formazione di idrocarburi. Per gli acidi grassi insaturi prevalgono le reazioni di polimerizzazione e di irrancidimento ossidativo, con formazione di aldeidi e chetoni, responsabili di odori e sapori sgradevoli.

Gli effetti a carico degli acidi grassi insaturi determinati dalle radiazioni sono senz'altro superiori a quelli che avvengono nei normali processi ossidativi. È abbastanza logico che le radiazioni ionizzanti favoriscano l'ossidazione degli acidi grassi, poiché questa reazione è avviata e portata avanti da radicali liberi, presenti in numero elevato nei prodotti irradiati. Danni ossidativi avvengono quindi anche a carico degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) che sono da considerarsi essenziali per l'organismo umano dato il loro ruolo nelle membrane cellulari e perché precursori delle prostaglandine e altri eicosanoidi.

Scorrendo la lista degli alimenti che possono essere irradiati a norma di legge, si può affermare che un danno nutrizionale può avvenire a carico di acidi grassi insaturi soprattutto per il pesce, dal momento che questa categoria di alimenti ne è particolarmente ricca.

Non esistono prove che l'irradiazione, indipendentemente dalla dose, abbia alcun effetto sugli *oligoelementi* essenziali sia in termini di quantità assoluta sia di biodisponibilità.

La sensibilità alle radiazioni delle *vitamine* varia grandemente a seconda dell'alimento, della dose di radiazione, delle condizioni ambientali presenti durante l'irradiazione e la conservazione. Di seguito viene riportata la differente sensibilità delle vitamine sottoposte al trattamento con raggi gamma:

- Idrosolubili: B<sub>1</sub> > C > B<sub>6</sub> > folati, B<sub>12</sub>, niacina
- Liposolubili: E > caroteni > A > D > K

Se l'alimento viene irradiato a bassa temperatura si riesce a preservare una percentuale maggiore del suo contenuto di vitamine. Lo stesso vale se l'irradiazione ha luogo in un ambiente privo di ossigeno, il che è applicabile alle vitamine sensibili alle radiazioni come la tiamina, l'acido ascorbico e l'alfa-tocoferolo (praticamente irradiazione e confezionamento sottovuoto). Se l'irradiazione e il confezionamento avvengono sotto flusso di azoto si raggiungono gli stessi risultati.

Il significato nutrizionale delle perdite vitaminiche indotte dall'irradiazione dipenderà moltissimo dall'entità della frazione della dieta costituita da alimenti irradiati. Fintanto che tali cibi costituiranno solo una piccola percentuale del consumo alimentare quotidiano, le preoccupazioni in tal senso non sono giustificate. Un'elevata presenza di alimenti irradiati presenti sul mercato dovrebbe sollevare preoccupazioni simili a quelle associate al consumo di elevate percentuali di alimenti sottoposti ad altri tipi di lavorazione.

## Conclusioni

In conclusione i possibili effetti negativi dell'irradiazione degli alimenti sul benessere nutrizionale dell'uomo sono dello stesso ordine di grandezza di quelli associati ad altre forme di conservazione degli alimenti nelle dosi attualmente consentite dalle norme, come si evince dal fatto che tutti gli organismi internazionali e il *Codex Alimentarius* limitano i dosaggi a 10 kGy per il consumo degli alimenti irradiati (6).

A tal proposito l'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1994 ha formulato un documento "Safety and nutritional adequacy of irradiated food" ritenuto esaustivo per la sicurezza d'uso di tali alimenti. Nel 2002 anche il Comitato Scientifico della Nutrizione Umana della Comunità Europea si è espressa favorevolmente all'uso dell'irraggiamento, in quanto ha verificato che si è raggiunto un buon livello di osservanza delle disposizioni della direttiva su tale tipo di trattamento tecnologico degli alimenti (7).

## Bibliografia

1. Diehl JF. Food irradiation: is it an alternative to chemical preservatives? *Food Add Contam* 1992;9:409-16.
2. Skala JH, McGown EL, Waring PP. Wholesomeness of irradiated food. *J Food Protec* 1987;50:150-60.
3. Thayer DW. Food irradiation: benefit and concerns. *J Food Qual* 1990;13:147-69.
4. Kraybill HF. Effect of processing on nutritive value of food: irradiation. In: Rechcigl J (Ed.). *CRC handbook of nutritional value of processed food*. Vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press; 1982. p.181-208.
5. World Health Organization. *High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with dose above 10 kGy*. Geneva: WHO; 1999. (WHO Technical Report Series N. 890).
6. World Health Organization. *Safety and nutritional adequacy of irradiated food*. Geneva: WHO; 1994.
7. European Commission. *Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food*. Bruxelles: European Commission; 2003. (SCF/CS/NF/IRR/24 Final 24 April 2003). Disponibile all'indirizzo: [http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out193\\_en.pdf](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out193_en.pdf); ultima consultazione 12/10/04.

## SICUREZZA D'USO: ASPETTI TOSSICOLOGICI

Orazio Sapora

*Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'avvento dell'ingegneria genetica e lo sviluppo di nuove tecnologie nella produzione alimentare hanno concentrato l'attenzione degli addetti ai lavori sulla necessità di sviluppare adeguati metodi per la determinazione della salubrità e appropriatezza di nuovi e più complessi alimenti. Ricerche microbiologiche, nutrizionali e tossicologiche continuano ad essere svolte per la valutazione del potenziale pericolo che può risultare dall'applicazione della biologia molecolare e della bio-tecnologia nello sviluppo di nuovi alimenti. In questo quadro si inserisce la tecnologia che fa uso delle radiazioni ionizzanti nel trattamento degli alimenti, che sebbene in uso da più di 50 anni, è ancora considerata come una nuova tecnologia di trattamento e i prodotti irradiati come nuovi alimenti (1).

Nei primi anni di sviluppo il processo fu considerato, dalle autorità competenti e dagli esperti, analogo ad un additivo, sulla base del concetto che le radiazioni aggiungevano nell'alimento qualcosa che prima non esisteva. La determinazione della sicurezza e della commestibilità di alimenti irradiati era quindi basata sullo stesso tipo di dati richiesti per la valutazione di un additivo chimico. Si è presto realizzato che, data la complessità e la variabilità delle matrici alimentari, tale approccio non era realizzabile, per cui l'esposizione di alimenti all'azione delle radiazioni ionizzanti fu considerato un trattamento, come la cottura e la pastorizzazione (2-4).

La valutazione della sicurezza di un alimento irradiato per il consumo umano coinvolge basicamente quattro aspetti: (i) sicurezza radiologica, (ii) sicurezza microbiologica, (iii) adeguatezza nutrizionale e (iv) sicurezza tossicologica (5). Solo quest'ultimo aspetto verrà trattato in questo capitolo.

### Problema della valutazione tossicologica

Quando un alimento è irradiato, l'energia propria delle radiazioni ionizzanti, sotto forma di fotoni o di elettroni, interagisce con i costituenti degli alimenti iniziando una complessa serie di eventi chimici. Il risultato è la formazione nell'alimento di nuove specie chimiche, dette prodotti radiolitici, che si presentano sotto forma di radicali a vita media più o meno breve o di prodotti finali stabili. La loro concentrazione finale sarà proporzionale alla dose di radiazioni a cui l'alimento è stato esposto e alla concentrazione dei composti precursori da cui derivano (6, 7).

L'approccio standard per valutare la tossicità di un prodotto è quello di addizionarlo, a differenti concentrazioni, alla dieta di animali e di misurare l'effetto desiderato. L'entità dell'effetto biologico considerato viene riportata in Figura 1 in funzione della concentrazione della sostanza in esame. È bene ricordare che nel caso di sostanze chimiche la dose è funzione della concentrazione e del tempo di esposizione. La curva rappresentata nella Figura 1 è ottenuta prendendo il tempo di esposizione come costante. La concentrazione, a seconda del sistema biologico impiegato, può essere espressa in differenti maniere, per esempio come g/kg di peso corporeo o g/kg di dieta, nel caso di impiego di animali, o concentrazione percentuale o molare, nel caso di sistemi *in vitro*.

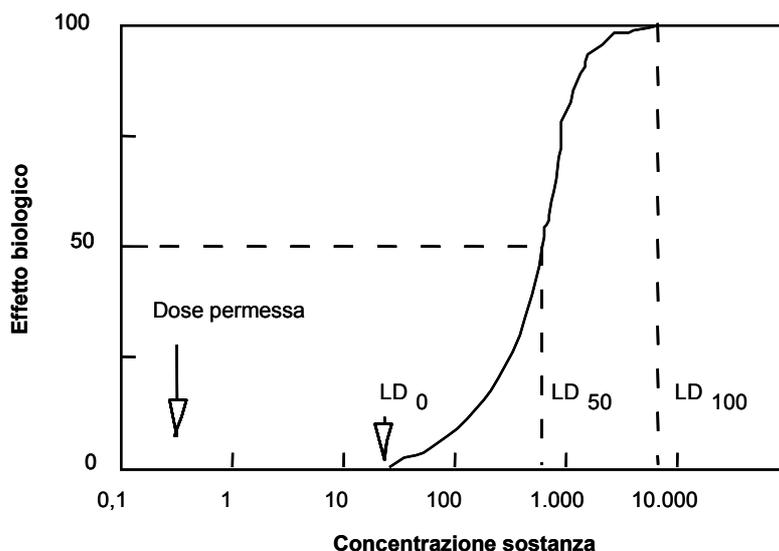


Figura 1. Curva dose effetto per una teorica sostanza

È così possibile, nel caso di un effetto tossico, costruire una curva che mette in relazione la quantità del prodotto con la severità dell'effetto, e valutare differenti parametri, come la *Lethal Dose* ( $LD_{50}$ ), utili per la determinazione della concentrazione massima impiegabile senza rischi per la salute umana. Per esempio per dose permessa si considera 1/100 della concentrazione massima impiegabile senza produrre alcun effetto. Inoltre questo tipo di esperimenti permette di determinare parametri utili all'identificazione dell'*hazard* e alla valutazione del rischio. Questo tipo di approccio non è applicabile alla valutazione della tossicità e alla determinazione del rischio di un alimento irradiato, dal momento che non è possibile tecnicamente costruire una curva dose effetto su cui basare la valutazione. Una dieta costituita totalmente da alimenti irradiati non è sufficiente per raggiungere quella concentrazione in eccesso necessaria per costruire una curva dose effetto o identificare il tipo di effetto prodotto. In teoria è possibile aumentare la dose e quindi la concentrazione dei prodotti radiolitici, tuttavia questo non è sufficiente per un completo test tossicologico: al crescere della dose oltre un certo limite le radiazioni producono alterazioni nel gusto e nella consistenza dell'alimento tali da renderlo inaccettabile nella dieta degli animali. Inoltre, non è possibile alimentare gli animali da esperimento con una dieta costituita da un solo alimento, come per esempio carne irradiata, senza produrre seri scompensi alimentari.

È necessario tenere presente che, data la complessità della matrice alimentare, nel caso si ottenga un effetto tossico, questo non è chiaramente attribuibile ad un'azione tossica diretta. La risposta che si ottiene è comprensiva di: (i) possibili effetti tossici risultanti dai prodotti di radiolisi delle sostanze presenti durante il trattamento, (ii) possibili effetti sul valore nutritivo dell'alimento dovuto alla distruzione di alcune delle sostanze presenti, (iii) possibili cambiamenti della digeribilità dell'alimento, e (iv) variazioni della popolazione microbica caratteristica dell'alimento. L'eventuale effetto avverso che si osserva è il bilancio di queste quattro componenti di cui spesso è difficile valutare il singolo contributo.

Un esempio può aiutare a chiarire il problema. Nel 1976 un gruppo di ricercatori indiani presentò dei lavori sugli effetti tossici di grano irradiato che costituiva la base della dieta di scimmie e bambini malnutriti (8). I risultati mostrarono che nelle cellule del sangue dei bambini così alimentati vi era un'alta incidenza di poliploidia. Tale risultato provocò una immediata reazione da parte delle organizzazioni internazionali e di altri ricercatori. Molte critiche furono

mosse agli esperimenti che furono successivamente ripetuti dagli stessi ricercatori e in altri laboratori. I dati stessi presentavano forti anomalie sia nella distribuzione che nei campioni di riferimento. Tuttavia la critica più importante derivò dal fatto che erano stati impiegati bambini in cui era già presente una forte avitaminosi (carenza di vitamina K) per di più nutriti con una dieta di per sé a basso contenuto della stessa vitamina. Infatti la vitamina K viene in parte distrutta dal trattamento radiante. La conclusione, sia degli stessi ricercatori che delle varie organizzazioni, fu che l'effetto riscontrato non era dovuto alla produzione di un elemento tossico presente nel grano, ma al sommarsi di carenze individuali e di dieta. Infatti, successivi esperimenti in cui alla dieta era stato aggiunto un appropriato ammontare di vitamina K, mostrarono l'assenza degli effetti riscontrati nei primi esperimenti (9).

## **Fattori che possono influenzare la risposta alle radiazioni ionizzanti**

Nel trattamento di alimenti con radiazioni ionizzanti occorre tenere presente due differenti aspetti. L'effetto della dose sull'alimento e l'effetto della dose sui microrganismi presenti. Le radiazioni ionizzanti essendo in grado di penetrare in profondità nell'alimento, producono danni su macromolecole biologiche, per esempio frammentazione del DNA, senza alterare la struttura di base dell'alimento. Questo tipo di degradazione non ha effetti negativi sull'alimento, poiché il processo di digestione produce effetti simili sulle macromolecole. Tuttavia le radiazioni ionizzanti con lo stesso meccanismo sono in grado di inattivare batteri presenti nell'alimento, infatti, una eccessiva frammentazione del DNA è letale per la vita e la riproduzione dei batteri. È necessario quindi, nello stabilire i limiti di dose da impiegare, prendere in considerazione la dose necessaria per massimizzare l'effetto letale sui batteri e per minimizzare gli effetti avversi sull'alimento. Inoltre, è necessario considerare tutti quei fattori che possono influenzare l'effetto della dose su ambedue le matrici.

Differenti fattori possono alterare gli effetti delle radiazioni ionizzanti. Alcuni sono generali e indipendenti dalla natura dell'organismo o della matrice alimentare, altri invece dipendono strettamente dalla natura di ciò che si irraggia.

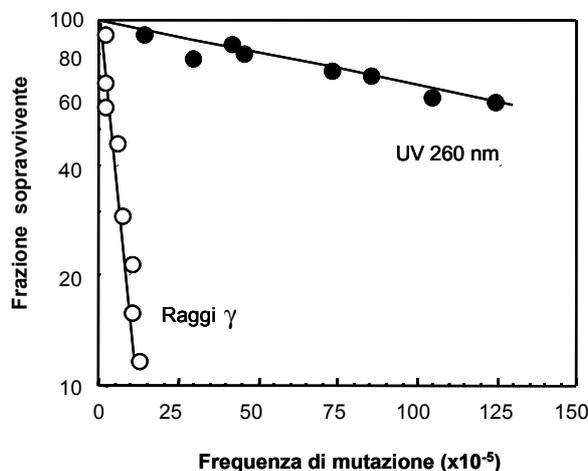
In questa trattazione si prenderanno in esame solo alcuni dei più importanti fattori come l'effetto diretto e indiretto, la presenza di acqua e di ossigeno, e la qualità delle radiazioni.

Raggi X,  $\gamma$ , onde radio, raggi UV e luce visibile sono forme di radiazioni elettromagnetiche, e quindi costituite da fotoni, e sono caratterizzate dal fatto di possedere la stessa velocità ma differenti lunghezze d'onda e diverse frequenze. Un fotone, emesso da una macchina a raggi X, con una lunghezza d'onda di 0,01 nm possiede un'energia pari a 124 keV, mentre un fotone, emesso da una lampada allo xenon, con lunghezza d'onda di 280 nm un'energia pari a 4,4 eV.

La differenza dal punto di vista biologico, tra radiazioni ionizzanti e non ionizzanti, risiede nel fatto che, mentre le prime sono altamente letali, le radiazioni ultraviolette sono fortemente mutagene. Se si correlano i due effetti, letalità e mutagenesi, a parità di dose si ottengono due curve che caratterizzano i due agenti (Figura 2). Le radiazioni ionizzanti per lo stesso livello di mortalità mostrano un basso indice di mutazione, mentre l'opposto accade per i raggi ultravioletti. Per esempio alla dose che produce il 50% di eventi letali l'indice di mutazione per i raggi  $\gamma$  non è statisticamente differente da quello di fondo, mentre quello degli UV è circa 200 volte più alto.

Quando una qualsiasi forma di radiazione attraversa un materiale biologico, vi è la possibilità che possa interagire direttamente con le macromolecole presenti. Gli atomi o le molecole possono essere eccitati o ionizzati iniziando così la catena degli eventi che porta alla molecole possono essere eccitati o ionizzati iniziando così la catena degli eventi che porta alla

formazione di un prodotto finale stabile. Questo è il cosiddetto effetto diretto ed è caratteristico delle radiazioni ultraviolette e delle radiazioni ionizzanti con alto LET (il termine *Linear Energy Transfer* rappresenta l'energia trasferita per unità di traccia e si esprime come keV/mm), e solo parzialmente presente in radiazioni a basso LET, come raggi X e  $\gamma$ .

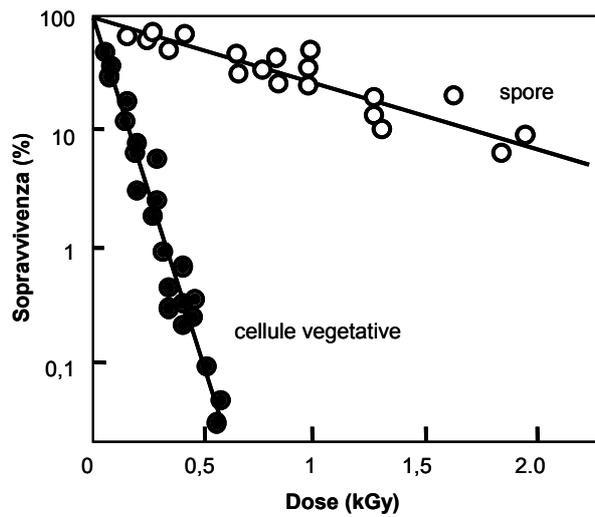


**Figura 2. Relazione tra effetto letale ed effetto mutageno per due agenti fisici, raggi  $\gamma$  e luce UV**

Le radiazioni possono interagire anche con altri atomi e molecole presenti in prossimità delle macromolecole critiche producendo radicali liberi che diffondono e reagiscono a loro volta con le macromolecole. Questo tipo di azione è detto effetto indiretto. Radiazioni ionizzanti a basso LET agiscono soprattutto attraverso questo tipo di meccanismo. L'effetto indiretto più importante è quello causato dalla radiolisi dell'acqua. Questa molecola, sebbene molto piccola, è presente in gran quantità all'interno delle cellule, circa l'80% con una concentrazione maggiore di 50 M. Una delle forme più reattive che si forma dalla radiolisi dell'acqua è il radicale ossidrilico ( $\text{OH}^\bullet$ ) che diffondendo può raggiungere un target critico nella cellula. Per esempio può diffondere fino al DNA avendo un diametro di diffusione circa il doppio della larghezza della doppia elica del DNA. Si è calcolato che circa i 2/3 dei danni introdotti sul DNA cellulare da esposizione a raggi X o  $\gamma$  siano dovuti all'azione tossica di questo radicale.

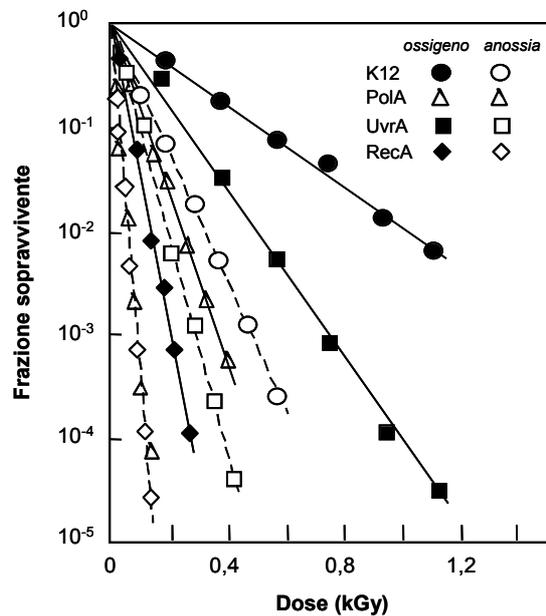
Tuttavia non tutti i substrati biologici contengono lo stesso quantitativo di acqua. Batteri come *B. subtilis* e *B. megaterium* si presentano sotto due forme, la forma vegetativa e quella di spora. Quest'ultima è caratterizzata dalla presenza di una bassa concentrazione di acqua. Questo fatto rende tale forma più resistente alle radiazioni ionizzanti a causa del minore numero di radicali che si formano a parità di dose (Figura 3). Questo fenomeno è caratteristico non solo di matrici biologiche complesse come i batteri e le cellule superiori, ma anche di macromolecole isolate, per esempio la tripsina irradiata allo stato secco è circa 100 volte più resistente dello stesso enzima irradiato in soluzione.

Numerosi composti chimici, detti radio-sensibilizzanti o radio-protettori, possono modificare, interagendo o a livello di danno o di riparazione del danno, l'effetto delle radiazioni ionizzanti. Sono stati scoperte, isolate o selezionate molte sostanze radio-sensibilizzanti tuttavia nessuna è più semplice e più efficace della molecola dell'ossigeno (10). Nel secondo gruppo di sostanze sono particolarmente attive tutte quelle che contengono gruppi SH liberi e in generale tutte quelle molecole in grado di restituire un elettrone o un atomo di idrogeno (11).



**Figura 3. Sopravvivenza del batterio *B. Subtilis* irradiato allo stato vegetativo o di spora (la diminuzione dell'acqua presente all'interno della spora è la causa della maggiore radioresistenza)**

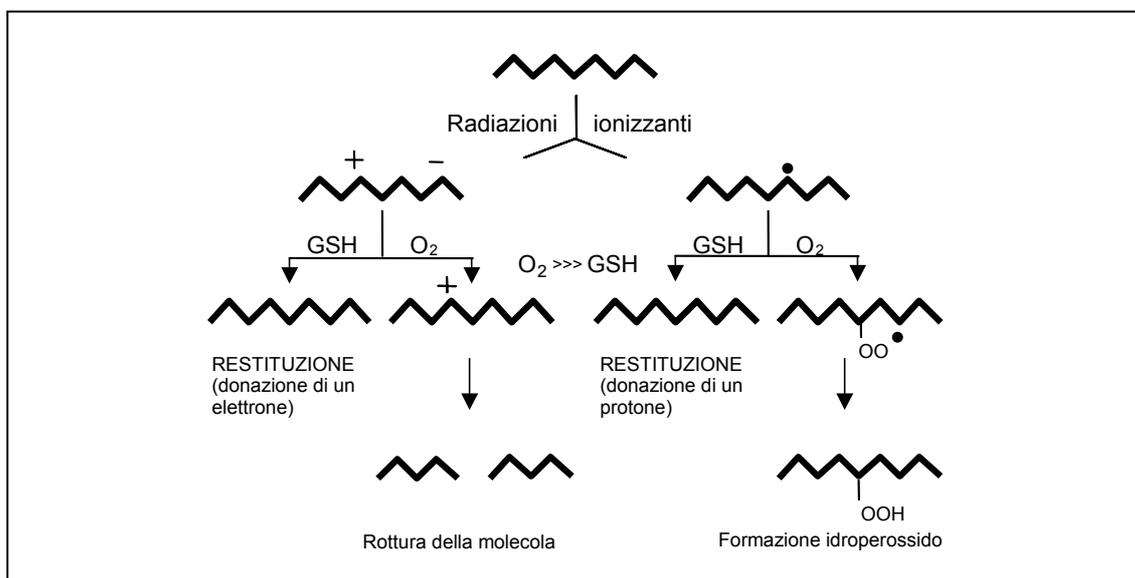
L'effetto radio-sensibilizzante dell'ossigeno fu notato la prima volta nel 1912, ma la sua vera natura fu scoperta negli anni trenta prima da Mottram e poi da Gray e Read. Può essere osservato esponendo cellule di mammifero o batteriche a dosi scalari di radiazioni ionizzanti, in presenza o in assenza di ossigeno (Figura 4).



**Figura 4. Sopravvivenza di differenti mutanti di *E. coli* irradiati in presenza o in assenza di ossigeno (i risultati mettono in evidenza l'effetto di due differenti fattori: la capacità radiosensibilizzante dell'ossigeno e la capacità dei differenti mutanti di riparare o non riparare il danno subito; es. nel *E. coli* RecA manca il sistema di riparazione ricombinativo, mentre nel poliA manca la polimerasi A coinvolta nella sintesi della catena del DNA danneggiata)**

Il rapporto tra le dosi impiegate per ottenere lo stesso effetto è il valore e la misura dell'effetto ossigeno ed è identificato con le iniziali OER (*Oxygen Enhancement Ratio*). Per radiazioni sparsamente ionizzanti tale valore varia tra 2,5 e 3,2. Il valore può inoltre variare durante il ciclo cellulare. Per produrre il suo effetto, l'ossigeno deve essere presente durante l'irraggiamento o almeno raggiungere i radicali formatisi sul target biologico in un tempo equivalente a quello della vita media dei radicali che si formano ( $10^{-5}$  s). In sua assenza parte dei danni prodotti possono essere riparati. La concentrazione di ossigeno, necessaria per un effetto completo, è particolarmente bassa infatti per ottenere il 50% dell'effetto è sufficiente una concentrazione dello 0,1-0,2%.

La chimica dell'ossigeno è stata ampiamente studiata e su di essa sono state pubblicate eccellenti rassegne (12). La struttura della molecola di ossigeno è unica, sebbene contenga un numero dispari di elettroni, vi sono due elettroni spaiati negli orbitali molecolari, con lo stesso numero quantico di spin. Se l'ossigeno ossida un altro atomo o molecola accettando da essa due elettroni, questi devono avere ambedue uno spin parallelo per poter riempire gli orbitali vuoti. Normalmente due elettroni in una orbita atomica o molecolare hanno invece spin spin antiparallelo. Questo impone una restrizione nei processi ossidativi in cui l'ossigeno è coinvolto. Esso può infatti partecipare alla reazione di trasferimento di un solo elettrone per volta rendendo possibili solo tre reazioni, di cui solo le prime due importanti per gli effetti biologici delle radiazioni ionizzanti: la formazione di un radicale superossido, la formazione di radicali perossidi e la formazione di ossigeno singoletto. Di queste reazioni la prima si ha quando  $O_2$ , a causa della sua alta elettroaffinità, reagisce con un elettrone prodotto dalla ionizzazione di una macromolecola (sensibilizzazione di tipo elettroaffine). La seconda reazione invece è legata alla forte affinità dell' $O_2$  per i radicali liberi che si formano su una macromolecola biologica (sensibilizzazione da radicali liberi). Queste due reazioni sono in competizione con altre reazioni dovute all'esistenza all'interno delle cellule di sostanze radio-protettrici e in particolare di sostanze contenenti gruppi sulfidrilici (-SH) che possono, tramite donazione di un elettrone o di un idrogeno, portare alla restituzione delle lesioni (Figura 5).



**Figura 5. Schema generale della competizione per i siti danneggiati tra ossigeno e sostanze radioprotettive come il glutatone. Sono rappresentate le due principali reazioni che coinvolgono la catena del DNA: la ionizzazione della molecola e la formazione di un radicale**

È necessario notare che i valori delle relative costanti di reazione verso l'elettrone e verso i radicali che si formano sono differenti di alcuni ordini di grandezza, essendo l'ossigeno molto più reattivo. Tuttavia la concentrazione intracellulare e intratissutale relativamente alta di queste sostanze in tessuti muscolari, come quelli delle carni, può modificare la risposta al trattamento del tessuto stesso (11).

Un altro fattore che può influenzare l'effetto biologico finale è la qualità della radiazione impiegata nel trattamento, poiché dosi uguali di radiazioni di differente qualità possono non produrre un uguale effetto biologico. Per esempio 1 Gy di neutroni produce un effetto biologico maggiore di quello prodotto da un 1 Gy di raggi X. La spiegazione di tali differenze risiede nella struttura della traccia e nel modo in cui l'energia viene depositata lungo la traccia stessa. Eventi di deposizione di energia localizzati possono portare alla formazione di danni multipli sulla molecola molto vicini e quindi più difficilmente riparabili. Il termine *Locally Multiply Damaged Site* (LMDS) è stato coniato per descrivere questo fenomeno. Radiazioni ionizzanti a basso LET (*Low Energy Transfer*), come raggi X e gamma, producono soprattutto eventi isolati mentre radiazioni ad alto LET, come protoni e alfa, producono eventi di tipo LMDS.

Nel confrontare differenti tipi di radiazioni è tradizione l'impiego dei raggi X o gamma come standard di riferimento. Il confronto tra vari tipi di radiazioni ha portato alla definizione di un parametro detto RBE dall'inglese *Relative Biological Effectiveness*. L'RBE è definito come il rapporto tra la dose di raggi X e la dose della radiazione in esame necessarie per ottenere lo stesso effetto biologico.

L'RBE aumenta all'aumentare del LET della radiazione impiegata. Altra caratteristica importante delle radiazioni con alto LET è che l'effetto ossigeno tende a diminuire drasticamente all'aumentare del LET. Per radiazioni densamente ionizzanti, come per esempio particelle alfa di bassa energia l'OER è uguale ad 1 cioè le due curve di sopravvivenza, in presenza e in assenza di ossigeno, si sovrappongono.

Da quanto detto sulle caratteristiche delle radiazioni e sui radicali reattivi che si formano, appare chiaro che qualsiasi molecola biologica deve essere considerata come possibile bersaglio. Tuttavia non tutte le molecole sono ugualmente importanti. Per esempio una proteina di cui la cellula possiede un certo numero di copie funzionanti, se inattivata dalle radiazioni, può essere facilmente sostituita. È universalmente accettato che il DNA sia, per la sua importanza e per la sua dimensione come molecola, il bersaglio più importante delle radiazioni ionizzanti. La dimostrazione sperimentale di tale assunto è stata ottenuta studiando la risposta al trattamento radiante di differenti ceppi di *E. coli* mancanti di differenti enzimi della riparazione (13) (vedi Figura 4).

Per esempio il mutante mancante di polimerasi, necessaria per la sintesi di parte della molecola dopo la rimozione del danno, mostra una maggiore sensibilità al trattamento radiante del ceppo selvaggio di *E. coli*. Si può definire come danno qualsiasi alterazione delle molecole, costituenti la macromolecola del DNA, che ne alteri la sequenza, la struttura e le funzioni. Tutte le molecole che compongono il DNA possono essere danneggiate e l'ammontare relativo dei differenti tipi di danno dipende dalla qualità della radiazione impiegata.

L'effetto letale delle radiazioni ionizzanti è dovuto soprattutto alla capacità di questo agente di produrre doppie rotture sulla catena del DNA (14). Mentre danni come le singole rotture sono facilmente ed efficacemente riparate, le doppie rotture, producendo una perdita di continuità della doppia catena del DNA, sono difficilmente riparabili senza introdurre errori. Rispetto a quanto accade con le radiazioni UV, che producono essenzialmente mutazioni puntiformi, le radiazioni ionizzanti producono larghe delezioni. Per questo motivo le RI sono agenti a marcato effetto letale, largamente impiegati nella radioterapia dei tumori.

Come si può notare nella Figura 4, i batteri, bersaglio principale del trattamento radiante degli alimenti, possiedono differenti radio-sensibilità. Tale differenza è estremamente ampia

andando da decine a migliaia di Gy. Il batterio in forma vegetativa più resistente è il *Micrococcus Radiodurans* che mostra una LD<sub>50</sub> di circa 800 Gy. Tale variazione di sensibilità può essere in parte attribuita alle dimensioni del target principale ma soprattutto alle caratteristiche genetiche del batterio più o meno in grado di riparare efficacemente i danni prodotti.

## Differenti opinioni sul trattamento radiante

Questa tecnica, sebbene sia stata applicata industrialmente fin dagli inizi degli anni 50, ha provocato e continua a provocare controversie sulla sua applicabilità (15, 16). Tale disparità di opinione è evidenziata anche nelle differenti valutazioni che danno su questa tecnica l'Unione Internazionale delle Organizzazioni dei Consumatori (UICO) (17, 18) e le maggiori organizzazioni internazionali – *World Health Organization* (WHO), *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e *International Atomic Energy Agency* (IAEA) (19-22). La prima è contraria, mentre le seconde sono totalmente a favore della sua applicazione su scala industriale. Spesso tuttavia in queste polemiche è difficile per un non addetto ai lavori distinguere i reali confini tra argomenti scientifici e argomenti di tipo socioculturale tra cui l'avversione istintiva per tutto ciò che riguarda le radiazioni ionizzanti. Infatti, nel documento presentato dall'UICO nel 1989 almeno parte delle richieste tende ad uscire dal problema squisitamente tecnico della valutazione del processo e della sua applicazione investendo problemi più generali.

È quindi opportuno sottolineare due osservazioni:

- (i) nessuno dei metodi esistenti e comunemente impiegati per la conservazione degli alimenti è in grado di preservare l'alimento trattato totalmente integro se confrontato con quello non trattato. Persino la refrigerazione, uno dei metodi conservativi più diffusi, può provocare la perdita selettiva di alimenti nutritivi specialmente quelli a basso peso molecolare come sali e vitamine;
- (ii) come altri metodi di conservazione il trattamento con radiazioni ionizzanti non può migliorare la qualità intrinseca di un alimento ma migliorarne solo l'igiene e la conservazione.

Come qualsiasi altro metodo, il trattamento radiante presenta vantaggi e svantaggi che ne devono governare l'impiego. Tra i vantaggi, oltre alla riduzione del deterioramento e della conseguente perdita di cibo e alla maggiore sicurezza sanitaria degli alimenti vi è il fatto che questa tecnologia richiede un basso consumo di energia. Tra gli svantaggi vi sono invece la perdita selettiva di vitamine e altri principi nutritivi e il fatto che gli enzimi degradativi cellulari, i virus e le tossine presenti nel cibo al momento del trattamento non sono inattivati dalle dosi somministrate. Da questo ne consegue che questo tipo di trattamento non potrà rendere un alimento già contaminato da tali agenti adatto e disponibile per il consumo e che il trattamento con radiazioni ionizzanti più che un trattamento per la conservazione dell'alimento deve essere considerato un trattamento per l'abbattimento di possibili contaminazioni microbiche.

Tenendo a mente quanto detto, è possibile concludere che il trattamento di conservazione con radiazioni ionizzanti non deve essere applicato in maniera indiscriminata ma solo quando è necessario prevenire concreti rischi di contaminazioni. Nella eventualità di un suo uso indiscriminato la preoccupazione maggiore può risiedere nel fatto che l'applicazione di questa tecnica può portare i produttori a sottovalutare il problema igienico sanitario della contaminazione microbica.

## Studi tossicologici

La sicurezza degli alimenti irradiati è stata valutata in numerosi studi condotti nell'arco di circa cinque decenni (4, 23, 24). Sono stati programmati e sviluppati impiegando un'ampia varietà di diete e di componenti alimentari sia su esseri umani che su una larga selezione di specie animali inclusi ratti, topi, cani, quaglie, hamster, polli, maiali, e scimmie. Questi studi, condotti con un'ampia varietà di protocolli sperimentali e un ampio campo di dosi, hanno fornito dati di tossicità acuta, subacuta, cronica, riproduttiva, multigenerazionale, di mutagenesi e di carcinogenesi. Per l'applicazione all'uso umano di questa tecnologia, gli studi condotti su animali rivestono una particolare importanza, ciò è dovuto alla complessità delle matrici alimentari impiegate e ai protocolli con cui tali alimenti sono stati somministrati e inclusi nella dieta.

Per una completa trattazione degli esperimenti condotti in tutti questi anni si consiglia di consultare i rapporti WHO, FDA (*Food and Drug Administration*), IAEA e FAO (19, 21, 22, 25).

### Studi di tossicità su animali

Questi studi, estremamente numerosi, sono stati condotti allo scopo di valutare possibili effetti teratogeni, mutageni e cancerogeni. L'approccio generale è stato l'impiego di diete con alta percentuale di alimenti irradiati con dosi nettamente superiori a quelle attualmente consentite. L'impiego di alte dosi ha lo scopo di massimizzare possibili effetti tossici. Per esempio in uno studio condotto dalla *Raltech Scientific Service* è stata impiegata carne di pollo irradiata con 54 kGy mentre le dosi comunemente impiegate sono dell'ordine dei 3 kGy (26-31). Nel 1994 un gruppo di studio del WHO ha condotto una nuova valutazione dei dati contenuti nel database della *Food and Drug Administration* (4) sulla sicurezza e gli aspetti nutrizionali di alimenti irradiati. Di circa 400 studi oltre 250 sono risultati scientificamente accettabili, 150 circa non accettabili e 20 non classificabili. Sulla base di questa nuova valutazione che ha seguito quella effettuata dal *Bureau of Foods Irradiated Food Committee* del 1981 (19), è stato confermato il giudizio che questa tecnologia di conservazione è sicura e che esiste un adeguato margine di sicurezza per alimenti irradiati al di sotto di 10 kGy e per spezie secche e deidratate sterilizzate (22).

### Studi di tossicità subcronica

Sono stati condotti su ratti, topi, cani, maiali e polli. La maggioranza di tali studi non mostra la presenza di un effetto tossico dopo il consumo di alimenti irradiati, anche in questi casi con dosi maggiori di quelle permesse. I pochi casi positivi sono da attribuirsi alla degradazione dei nutrienti contenuti nella dieta, piuttosto che ad un effetto tossico di sostanze prodotte dall'irraggiamento. Anche in questo caso la somministrazione del o dei componenti nutrizionali che risultavano carenti, hanno annullato l'effetto osservato (32).

### Studi di cancerogenesi e tossicità cronica

Questo tipo di studi sono stati condotti su roditori con protocolli di cancerogenesi della durata di due anni che prevedevano anche la valutazione della tossicità riproduttiva su più generazioni. Di questi studi combinati 17 sono stati condotti su ratti, 3 su topi e uno su maiali. Alcuni di questi studi sono stati effettuati impiegando diete sterilizzate mediante l'impiego di alte dosi. Altri studi sono stati effettuati prendendo in considerazione solo il potenziale cancerogeno. In tutti questi

studi non è stato rilevato alcun aumento nell'incidenza di tumori né alcun cambiamento rispetto ai gruppi di controllo per quanto riguarda le funzioni riproduttive (31).

Studi separati di tossicità cronica sono stati condotti su topi, cani e scimmie. In uno di questi è stata riportata la presenza di una particolare lesione al cuore come la dilatazione auricolare (33). Tali studi sono stati ripetuti da altri gruppi senza ottenere gli stessi risultati. Lo stesso gruppo in un secondo studio ha dimostrato che tali lesioni erano attribuibili ad una mancanza nella dieta di ferro e rame (34). Gli studi su cani condotti per la durata di 2 e 4 anni non mostrano alcun effetto sia sull'accrescimento che nelle varie patologie prese in esame rispetto al gruppo di controllo. La durata di questi studi sui cani tuttavia non è stata sufficientemente lunga per determinare adeguatamente un possibile effetto cancerogeno, tuttavia nei 4 anni, in cui gli animali sono stati tenuti sotto osservazione, non sono state riscontrate anomalie patologiche (30, 35).

Nel 1976 The *United States Office of the Surgeon* iniziò una serie di studi nutrizionali e tossicologici che sono durati fino al 1984 (26). La maggioranza di tali studi sono stati condotti dalla *Raltech Scientific Services* di St. Luis e comprendevano alimentazione di topi e cani con carne di pollo disossata, impacchettata sotto vuoto, trattata termicamente per inattivare gli enzimi, raffreddata a -40 °C e irradiata allo stato congelato in assenza di aria con una dose media di 59 kGy. Anche in questo caso i dati ottenuti hanno mostrato che non vi è alcun aumento, rispetto ai gruppi di controllo, di tumori al testicolo indotto dalla dieta (31).

## Studi di riproduzione e teratogenesi

Alla fine degli anni '70 il *Netherlands National Institute of Public Health and Environmental Hygiene* programmò un complesso studio, durato per oltre cinque anni, sulla formazione di potenziali composti tossici in alimenti irradiati (37). Un primo studio multigenerazionale, i cui risultati furono negativi, fu condotto su ratti. Il secondo più complesso fu condotto su maiali per tre generazioni (38). Gli animali furono nutriti con una dieta standard, una dieta irradiata e una autoclavata. Al termine dell'esperimento non sono stati riscontrate nei tre gruppi alterazioni o cambiamenti dei parametri osservati. Inoltre gli animali di terza generazione furono macellati e processati per produrre insaccati. Sei gruppi di 50 ratti maschi e 50 ratti femmine furono successivamente nutriti con le seguenti diete: (i) dieta standard, e diete con il (ii) 35% di insaccati trattati con nitriti, (iii) 35% di insaccati da maiali nutriti con la dieta autoclavata trattati con nitriti, (iv) 35% di insaccati da maiali di controllo trattati con nitriti e irradiati con 37 kGy, (v) 35% insaccati da maiali alimentati con la dieta irradiata con 50 kGy, trattati con nitriti e irraggiati con 37 kGy, e infine (vi) 35% di insaccati da maiali alimentati con dieta irraggiata con 50 kGy, trattati con nitriti e successivamente irradiati con 70 kGy. Tutti gli insaccati derivavano dai gruppi di animali allevati per tre generazioni con i tre differenti regimi alimentari. Gli autori di questo studio conclusero, dal confronto tra i sei gruppi di animali, che non vi è alcun effetto sul consumo di cibo, accrescimento, mortalità, quadro ematologico, biochimica del sangue e delle urine, peso degli organi, esami istopatologici e incidenza di tumori.

## Studi di mutagenesi

Sono stati condotti molti studi di mutagenesi sia *in vitro* che *in vivo*. Sebbene anche in questo caso siano state impiegate dosi al di sopra di quelle permesse, gli esperimenti *in vivo*, condotti su drosofile, topi e hamster cinese, non mostrano alcun effetto mutageno (28). Differente il discorso per gli esperimenti *in vitro*. Un esempio su tutti: soluzioni di saccarosio irradiate mostrano la presenza di un effetto mutageno su linfociti umani in coltura, Vicia Faba e su alcuni

ceppi di Salmonella (39). Questo effetto è attribuibile alla differente radiochimica degli zuccheri in soluzione pura rispetto agli stessi zuccheri in matrici più complesse come i frutti. Come riportato precedentemente differenti fattori possono influenzare la risposta alle radiazioni. Matrici complesse come gli alimenti possono favorire reazioni di restituzioni altrimenti non possibili in soluzioni pure. La complessità della matrice inoltre può influenzare *in vivo* l'assorbimento delle singole sostanze determinando tra l'interno e l'esterno di un organismo un gradiente di concentrazione. Per esempio alcuni prodotti di ossidazione degli zuccheri non vengono assorbiti dall'intestino.

## Studi clinici sull'uomo

Questi studi sono stati disegnati più per provare la palatabilità degli alimenti irradiati che la loro tossicità sia a breve che a lungo termine (40-42). Sono stati condotti su piccoli gruppi di volontari nutriti con diete a percentuali di alimenti irradiati variabili tra il 30 e il 100%. Alimenti come le patate e le cipolle sono stati irradiati con dosi al di sotto di 1 kGy, mentre le carni sono state irradiate con alte dosi, al di sopra dei 10 kGy, allo scopo di sterilizzarle. In ogni caso non è stato riscontrato, nei brevi periodi presi in considerazione, alcun effetto sia immediatamente dopo la fine dell'esperimento che dopo un anno. Alimenti sterilizzati vengono di routine serviti a malati di sindromi immunitarie e a soldati dell'esercito del Sud Africa durante le esercitazioni. Fino ad ora non è stato riportato alcun caso di effetto avverso.

In conclusione è possibile affermare che la tecnica di irraggiamento degli alimenti è una delle più studiate dal punto di vista tossicologico, i dati sono stati ottenuti con un elevato numero di specie animali e modelli sperimentali e con un'ampia varietà di alimenti. La sensibilità e le tecnologie impiegate sono adeguate e in generale sono state impiegate dosi di radiazioni ben al di sopra di quelle attualmente permesse e impiegate per i singoli alimenti. I risultati ottenuti non mostrano alcun effetto sia in relazione a test a breve che a lungo termine. Inoltre non vi è alcuna evidenza di un effetto mutageno e/o cancerogeno. Le radiazioni ionizzanti producono come altri trattamenti perdite di fattori nutritivi, in special modo vitamine, e i pochi casi avversi osservati sono chiaramente attribuibili a questo fenomeno.

È necessario ribadire con forza che il trattamento radiante deve essere considerato come trattamento di sanitizzazione di un alimento e che non è in grado di rendere sano un alimento di per se non idoneo al consumo umano.

## Tossicità dei prodotti radiolitici

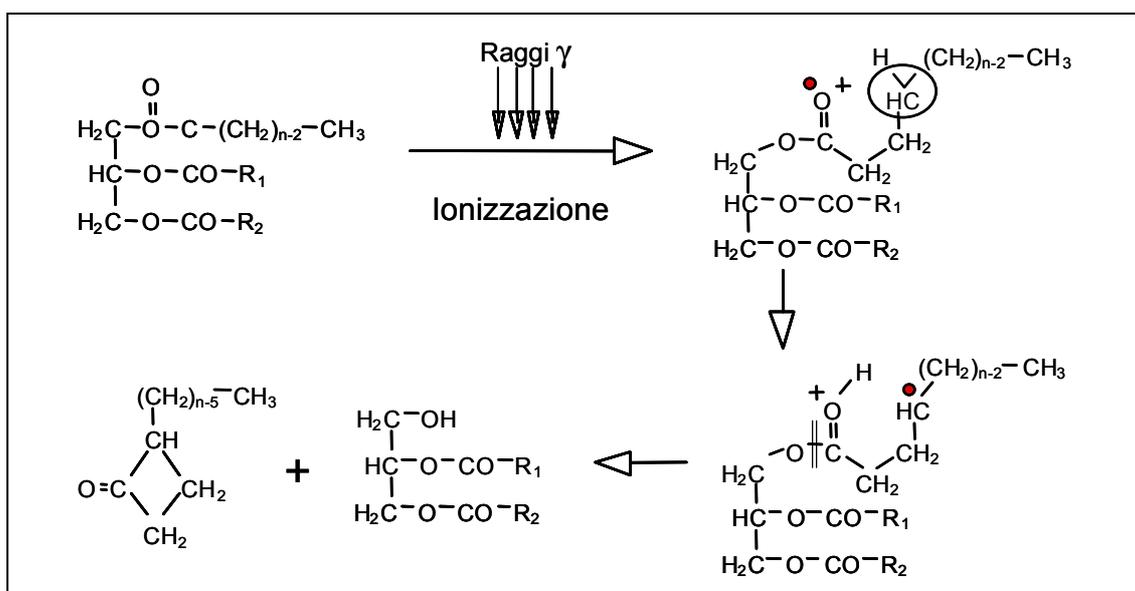
A seguito delle raccomandazioni, formulate dalle organizzazioni internazionali, in vari Paesi è stato concesso un numero sempre maggiore di permessi per trattamento radiante di alimenti a scopo di conservazione e sterilizzazione (3, 4). In molte nazioni, tuttavia, l'impiego di questa tecnologia è severamente ristretto ad alcune classi di alimenti; in Italia, ad esempio, l'uso del trattamento radiante è limitato ai soli agli, cipolle e patate.

Questo dato di fatto ha portato ad un sempre maggiore interessamento per tutte quelle metodologie atte al rilevamento di particolari "marcatori", come ad esempio radicali a lunga vita e composti cellulari stabilmente modificati dalle radiazioni ionizzanti, per la identificazione di alimenti irraggiati. Tali metodologie sono molto importanti e necessarie sia per controllare la qualità degli alimenti che per determinare se il trattamento corrisponda alle legislazioni vigenti e per l'informazione dovuta ai consumatori.

Due delle maggiori difficoltà nell'identificazione di prodotti specifici del trattamento radiante risiedono nel fatto che: (i) molte delle alterazioni prodotte sono simili a quelle prodotte da altri trattamenti e (ii) le concentrazioni dei prodotti radiolitici presenti in alimenti trattati con le dosi attualmente permesse sono estremamente basse e quindi di difficile identificazione e isolamento. Per esempio: sia le radiazioni ionizzanti che i processi di congelamento e scongelamento producono rotture nell'elica del DNA; la perossidazione lipidica viene prodotta sia per esposizione alle radiazioni ionizzanti che, a temperatura ambiente, per esposizione alla luce; i prodotti di degradazione e ossidazione lipidica sono simili a quelli che si formano durante la cottura dell'alimento.

Fino ad ora un'unica classe di prodotti caratteristici del trattamento è stata identificata. Nella seconda metà degli anni '70, da una soluzione pura di trigliceridi irradiati con radiazioni ionizzanti, fu isolato e identificato un composto ciclico, un 2-alcil-ciclo-butanone (2-ACB), con lo stesso numero di atomi di carbonio del corrispondente acido grasso esterificato. Successivamente Stevenson ha isolato da alimenti contenenti grassi irradiati il 2-ACB derivante dall'acido palmitico e ha dimostrato che questo composto si forma in funzione della dose ed è specifico del trattamento non essendo presente nello stesso alimento trattato con altre tecniche (43, 44).

Questa classe di composti si forma secondo lo schema riportato in Figura 6, essi differiscono per la catena acilica che è caratteristica dell'acido grasso da cui derivano.



**Figura 6. Schema di formazione di 2-alcil-ciclobutanoni da un trigliceride ad opera delle radiazioni ionizzanti (il trigliceride dà origine ad una molecola di alchil-ciclo-butanone, con catena acilica differente a seconda dell'acido grasso posto in posizione 1 nella molecola del trigliceride, e ad una molecola di diacilglicerolo, DAG)**

Alla fine degli anni '90 uno studio è stato condotto, da un gruppo di ricercatori del *Federal Research Centre for Nutrition* tedesco allo scopo di valutare il rischio connesso al consumo di alimenti irradiati impiegando 2-ACB puri e studiando differenti *end-point* in colture cellulari e in topi (45). Successivamente nell'ambito di INTERREG II, un programma europeo interregionale, è stato costituito un gruppo di ricerca franco-tedesco che ha cercato di

approfondire questi studi (46). Per prima cosa sono stati sintetizzati e quantizzati i 2-ACB presenti nei più comuni alimenti. Un risultato generale molto chiaro è che esiste una relazione lineare tra la concentrazione di queste sostanze e il valore della dose assorbita dall'alimento anche per alimenti irradiati con dosi molto alte, con un tasso di produzione pari a  $1,6 \text{ nmol} \times \text{mmol di grasso} \times \text{kGy}$ .

Gli esperimenti sono stati condotti con differenti sistemi biologici studiando differenti *end-point*:

a) *Cellule di mammifero in vitro*

Sono stati impiegati due cloni di HT29, cellule tumorali umane, e cellule HeLa. Nel primo caso differenti 2-ACB hanno mostrato di non essere in grado di produrre alcun effetto sia citotossico che genotossico al contrario di quanto già pubblicato impiegando però cellule di hamster cinese V79. Un effetto citotossico è presente solo dopo esposizione prolungata, due giorni, e ad alta concentrazione, 0,05 mM. Su cellule HeLa invece sono stati studiati sia la citotossicità che il danno alle basi del DNA. Questo tipo di danno è un indicatore molto sensibile di possibili eventi di tipo ossidativo. Su questo sistema biologico è stata dimostrata sia la presenza di un effetto citotossico che la formazione di danni di tipo ossidativo a concentrazioni superiori a 0,1 mM. Tuttavia i 2-ACB testati mostrano un differente andamento degli effetti rilevati. I 2-ACB derivati dall'acido stearico e dall'acido oleico producono danni al DNA solo alle più alte concentrazioni impiegate, in cui l'effetto citotossico è predominante, al contrario i 2-ACB derivanti dall'acido palmitico e miristico producono danni in un range di concentrazioni in cui l'effetto citotossico è minimo.

b) *Test di mutagenesi con Salmonella typhimurium*

I 2-DCB mostrano effetto citotossico fortemente legato alla lunghezza della catena, più la catena è corta e più l'effetto citotossico è pronunciato. Tuttavia non è stato possibile rilevare alcun effetto mutageno impiegando il test di Ames.

c) *Test su animali di laboratorio*

È stato mostrato che i 2-ACB possono avere effetto promotore se impiegati in combinazione con azossimetano (AOM) nello sviluppo di tumori del colon in ratti. Animali esposti all'azione combinata 2-DCB/AOM mostrano un aumento di lesioni pre-neoplastiche e lo sviluppo di un maggior numero di tumori del colon nei confronti di animali trattati con solo AOM. L'esposizione a solo 2-ACB di per se non ha alcun effetto cancerogeno. Sono stati condotti anche alcuni esperimenti per studiare il destino metabolico di queste sostanze. Gli autori hanno trovato che solo una piccola parte degli 2-ACB è accumulata nel tessuto adiposo (meno di 105 volte la quantità totale somministrata, 1 µg al giorno per 40 giorni) mentre il 5% è escreto nelle feci. I risultati mostrano che la maggior parte dei 2-ACB o è trasformata metabolicamente o accumulata in altri tessuti e che il metabolismo di 2-ACB contenenti acidi grassi insaturi è più rapido di quelli contenenti acidi grassi saturi. È stato proposto, sulla base di studio *in vitro*, uno schema di degradazione ossidativa di questi composti con la formazione di un  $\gamma$ -palmitico lattone come prodotto finale.

Questi in sintesi sono i risultati riportati dal gruppo di studio, che indubbiamente più che chiarire i possibili rischi connessi all'impiego di questa tecnologia, pongono più di una domanda. Per esempio quale è il destino metabolico di queste sostanze, dove si accumulano, quale è la loro velocità di eliminazione, e se sono promotori quale è il loro meccanismo di azione.

Gli autori nell'introduzione del rapporto finale puntualizzano "We warn against misuse of the data presented here, aiming at disqualifying food irradiation". Infatti, gli esperimenti sono stati condotti su un numero molto limitato di animali e con la sostanza pura somministrata ogni 24 ore in sospensione acquosa e da sola. Molte evidenze sperimentali mostrano che sostanze irradiate come tali e somministrate hanno effetti differenti di quando sono parte di una matrice più complessa. Tale complessità influenza fortemente anche i processi di assorbimento.

Sulla base di questi risultati è stata fatta una rivalutazione degli esperimenti condotti dalla Railtech (27-31). È stata misurata la quantità di 2-ACB presente nelle carni impiegate negli esperimenti a lungo termine. Questo è stato possibile poiché la carne irradiata somministrata durante gli esperimenti era ancora conservata congelata. Per gli esperimenti erano state irradiate 135 tonnellate di carne di pollo con una dose di 58 kGy e subito dopo liofilizzate e congelate. Il 35% della dieta degli animali era costituito da carne irradiata. Dopo dodici anni sono stati misurati 10 µg di 2-ACB per grammo di grasso. Questa quantità è circa la metà di quella attesa, questo fatto può essere attribuito sia alla lunga conservazione (12 anni) che, più probabilmente al fatto che la carne era stata liofilizzata prima dell'impiego nella dieta. È stato così possibile calcolare che per tutta la durata dell'esperimento ai topi sono stati somministrati circa 250 mg di 2-ACB per kg di peso corporeo e ai ratti 60 mg/kg. Le dosi complessive sono molto più alte di quelle impiegate negli esperimenti condotti dal gruppo di studio interregionale tuttavia sia a breve che a lungo termine non sono stati riscontrati effetti avversi.

È necessario anche fare una considerazione pratica: in carne di pollo irradiata vengono prodotti circa 0,3 µg di 2-ACB per kGy per grammi di grasso. Il contenuto medio di grasso in questo tipo di carne è di circa il 10% per cui dopo una dose di 3 kGy si avranno circa 0,09 µg di 2-ACB per grammo di carne. Durante la cottura si ha la perdita di circa il 20% di grasso con il risultato di avere 0,07 µg per grammo di carne. Considerando 200 grammi di carne per pasto e un peso corporeo medio di 70 kg si avrà l'assunzione di circa 0,2 µg di 2-ACB per kg di peso corporeo. Queste dosi sono ben distanti da quelle impiegate per gli esperimenti e sono somministrate come parte di una matrice complessa.

Sebbene questi calcoli siano rassicuranti, al momento non è possibile dare la valutazione del potenziale rischio connesso al consumo di alimenti irradiati. È auspicabile che ulteriori e approfondite ricerche siano condotte sia per verificare i risultati ottenuti dal gruppo franco-tedesco sia per una precisa identificazione e valutazione dell'*hazard*. Infatti per caratterizzare il potenziale di rischio è necessario identificare con precisione sia l'*hazard*, che i limiti di esposizione, l'esatta curva dose-effetto e in maniera particolare la cinetica e il metabolismo dei 2-ACB nell'organismo. Come appare chiaro molti punti interrogativi sono senza risposta e molta ricerca è necessaria per una corretta stima.

## Bibliografia

1. Ludwig L, Hopf H. Experimental study on the effect of roentgen irradiation on the food. *Strahlentherapie* 1925;20:342-55.
2. *Food Irradiation. A technique for preserving and improving the safety of food*. Geneva: World Health Organization; 1988.
3. CAC (Codex Alimentarius Commission). *Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of food*. Vol. 15. 1<sup>a</sup> ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 1984.
4. Irradiation in the production, processing and handling of food: final rule. 1990. FDA Federal Register 21, CFR, part 179, part III, 1986 and part VI.

5. Belli M, Onori S, Saporà O. *XI corso di fisica delle radiazioni: radiazioni ed alimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1993. (Rapporti ISTISAN 93/11).
6. Farhataziz M, Rogers MAJ (Ed.). *Radiation chemistry: principles and applications*. New York: VCH Publishers; 1987.
7. Elias PS, Cohen AJ (Ed.). *Radiation chemistry of major food components*. Elsevier Biochemical Press; 1977.
8. Bhaskaran C, Sadasivan G. Effects of feeding irradiated wheat to malnourished children. *International Journal of Radiation Biology*. 1975;27:93-104.
9. Kavesan PC, Sukhatame PV. *Summary of the technical report on the data of NIN, Hyderabad and BARC, Bombay on the biological effects of freshly irradiated wheat. Report of the Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee on the Wholesomeness of Irradiated Food*. 1976.
10. Saporà O. Effetto ossigeno. In: Mauro F, Benassi F, Marino C (Ed.). *Effetti biologici in radioterapia*. ENEA Serie Congressi. 1992. p. 77-88.
11. Saporà O, Serpietri LA, Pagani E, Maggi A, Quintiliani M. The role of thiols in lethal and mutational radiation damage. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 1989;25:115-22.
12. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 1989;58:79-110.
13. Saporà O, Fielden EM, Loverock PS. A comparative study of the effect of two classes of radiosensitizer on the survival of several E. coli B and K12 mutants. *Radiation Research* 1977;69:293-304.
14. Saporà O. X-rays induced double strand breaks: damage distribution and measurement. In: Castellani A (Ed.). *DNA damage and repair*. New York: Plenum Publishing Co.; 1988. p. 359-72.
15. Pszczola DE. Food irradiation: Countering the tactics and claims the opponents. *Food Technology* 1990;92.
16. Thayer DW. Food irradiation: benefits and concerns. *Journal of Food Quality*. 1990;13:147-173.
17. *Consumer concerns about the safety of irradiated food*. Geneva: World Health Organization; 1989. (WHO/EHE/FOS 89.1).
18. Food irradiation. Consumers International. Disponibile all'indirizzo: <http://www.consumersinternational.org>
19. *Wholesomeness of irradiated food. Report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee*. Geneva: WHO; 1981. (WHO Technical Report n. 659).
20. *Ionizing energy in food processing and pest control: I wholesomeness of food treated with ionizing energy*. Council for Agricultural Science and Technology. 1986. report n. 109.
21. *Report on the safety and wholesomeness of irradiated foods*. Commission of European Communities. 1990. SC/IRR/7. Information Report EUR 13331 EN.
22. Safety and Nutritional Adequacy of Irradiated Food. World Health Organization, Edizione Italiana a cura dell'Istituto Scotti Bassani per la Ricerca Scientifica e Nutrizionale, Milano. 1994. Schede Informative n.1-2/95.
23. Hawthorne J. The safety and wholesomeness of irradiated foods. *BNF Nutrition Bulletin* 1989;14:150-78.
24. Elias PS. New concepts for assessing the wholesomeness of irradiated foods. *Food Technology* 1989;81.
25. High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO study Group. WHO Technical Report .1999. Series 890.
26. Thayer DW, et al. Toxicological studies of irradiation-sterilized chicken. *Journal of food protection* 1987;50:278-88.

27. Raltech Scientific Services. Hamster teratology study on irradiated chicken. Final report. 1978. Washington, DC, National Technical Information Service (United States Army Contract n. DAMD 17-76-C-6047.; order number PB84-187048).
28. Raltech Scientific Services. Dominant lethal study. Final report. 1978. Washington, DC, National Technical Information Service (United States Army Contract n. DAMD 17-76-C-6047.; order number PB84-187053).
29. Raltech Scientific Services. Mouse teratology study. Final report. 1977. Washington, DC, National Technical Information Service (United States Army Contract n. DAMD 17-76-C-6047.; order number PB84-187-048).
30. Raltech Scientific Services. Irradiated sterilized chicken meat: a chronic toxicity and reproductive performance study in beagle dogs. Final report. 1982. Washington, DC, National Technical Information Service (United States Army Contract n. DAMD 17-76-C-6047.; order number PB84-187020).
31. Raltech Scientific Services. *A chronic toxicity, oncogenicity and multigeneration reproductive study using CD-1 mice to evaluate frozen, thermally sterilized, cobalt-60 irradiated and 10 MeV electron irradiated chicken meat. Final report.* 1984. Washington, DC, National Technical Information Service (United States Army Contract n. DAMD 17-76-C-6047.; order number PB84-187012).
32. Malhotra OP, Reber EF, Norton HW. Effect of methionine and vitamin K3 on hemorrhages induced by feeding a ration containing irradiated beef. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1965;7:402-8.
33. Monsen H. *Heart lesions in mice. Final report.* 1963. United States Army Contract n. DA-49-007-MD-794.
34. Monsen H. *Heart lesions in mice. Addendum.* 1965. United States Army Contract n. DA-49-007-MD-794.
35. Blood FR. Feeding of irradiated chicken, beef, and pineapple jam to dogs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1966;8:241-6.
36. van Logten MJ, Berkvens JM, Kroes R. *Investigation of the wholesomeness of autoclaved or irradiated feed in rats.* Bilthoven: Netherlands National Institute of Public Health; 1978. (Report 33/78 Alg. Tox).
37. van Logten MJ, Berkvens JM, Kroes R. *Long-term wholesomeness study of autoclaved or irradiated pork in rats.* Bilthoven: Netherlands National Institute of Public Health; 1983. (Report 617401 001).
38. Strik JJTWA. Toxicological investigations on irradiated feed in pigs. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1986;111:240-3.
39. Aiyar AS, Rao R. Studies on mutagenicity of irradiated sugar solutions in salmonella typhimurium. *Mutation Research* 1977;48:17-24.
40. Plough IC. *An evaluation in human beings of the acceptability, digestibility and toxicity of pork sterilized by gamma radiation and stored at room temperature.* Denver, Co: United States Army Medical Nutrition Laboratory; 1957. (Report n. 204).
41. Bierman EL. Short term human feeding studies of food sterilized by gamma radiation and stored at room temperature. Denver, Co: United States Army Medical Nutrition Laboratory; 1958. (Report n. 224).
42. McGary VE. *Acceptability of irradiated food consumed by human subjects.* Denver, Co: United States Army Medical Nutrition Laboratory; 1957. (Report n. 200).
43. Boyd RD, Crone AVJ, Hamilton JTG, Hand MV, Stevenson MH, Stevenson PJ. Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *Journal of Agr Food Chem* 1991;39:789-92.
44. Stevenson MH. Identification of irradiated foods. *Food Technologies* 1994;48:141-4.

45. Delincée H, Pool-Zobel BL. Genotoxic properties of 2-dodecylcyclobutanone, a compound formed on irradiation of food containing fat. *Radiation Physics and Chemistry* 1998;52:39-42.
46. Marchioni E, Delincée H (Ed.). *Etude toxicologique transfrontalière destinée à évaluer le risque encouru lors de la consommation d'aliments gras ionisés*. Final INTERREG II project report n. 3.171, BFE-R-02-02.

## IMPIANTI DI IRRAGGIAMENTO E DOSIMETRIA

Piergiorgio Fuochi, Marco Lavalle

*Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna*

### Introduzione

Il termine “irraggiamento di prodotti alimentari” o *food irradiation* sta ad indicare il trattamento di alimenti e dei loro ingredienti, come ad esempio le spezie, solo con quelle radiazioni ionizzanti<sup>1</sup> ammesse dal *Codex Alimentarius* (1). Il processo consiste nell' esporre i prodotti alimentari confezionati o alla rinfusa a quantità accuratamente controllate (dosi) di radiazioni ionizzanti (raggi  $\gamma$  da  $^{60}\text{Co}$  e da  $^{137}\text{Cs}$ , fasci di elettroni con energia  $\leq 10$  MeV, raggi X con energia  $\leq 5$  MeV) per un tempo ben determinato per raggiungere i seguenti obiettivi:

- a) decontaminazione o risanamento biologico da microrganismi patogeni presenti nei prodotti alimentari;
- b) disinfestazione da parassiti;
- c) prolungamento della conservazione;
- d) inibizione della germogliazione e ritardo nella senescenza dei vegetali.

I benefici economici che si possono conseguire consistono in minori perdite di derrate alimentari e nel contenimento o eliminazione di infezioni o intossicazioni alimentari. Ciò è dovuto alla capacità delle radiazioni di sopprimere cellule e alterare l'attività enzimatica negli alimenti. Il primo effetto, inibendo la suddivisione della cellula previene la germogliazione, riduce il numero di microrganismi vitali, previene il dischiudersi delle uova di insetti e lo sviluppo delle larve, sopprime o sterilizza gli insetti presenti nel prodotto. L'alterazione dell'attività enzimatica porta invece ad un ritardo nella maturazione di frutta e ortaggi. È da sottolineare che il trattamento con radiazioni ionizzanti degli alimenti non aumenta in modo significativo il loro naturale livello di radioattività, perché l'energia delle radiazioni ammesse per questo trattamento è sufficientemente bassa, tale da indurre un livello di radioattività nei prodotti alimentari che è ordini di grandezza inferiore a quello naturalmente presente negli alimenti.

### Applicazioni

Come mostrato in Tabella 1, le dosi di radiazioni utilizzate nel trattamento dei prodotti alimentari variano da qualche decina di gray a poche decine di kilogray. Gli effetti delle radiazioni ionizzanti sugli alimenti e le relative applicazioni del trattamento sono determinate dalla dose assorbita.

---

<sup>1</sup> Il termine radiazione ionizzante sta ad indicare tutte quelle forme di radiazione di natura elettromagnetica, come i raggi x o i raggi  $\gamma$ , o corpuscolare, come i fasci di elettroni, aventi energia superiore a qualche decina di keV, che trasferendo tutta o parte della loro energia alla materia con cui interagiscono producono ionizzazione, cioè attraverso la rimozione di elettroni, trasformano in ioni atomi e molecole del mezzo attraversato. L'energia delle radiazioni ionizzanti viene espressa in elettronvolt (eV). Questa grandezza è così definita: 1 eV è l'energia cinetica acquisita da un elettrone quando viene accelerato da una differenza di potenziale di 1 V nel vuoto. L'eV rappresenta una quantità molto piccola di energia, pertanto sono usati, più comunemente, multipli di questa grandezza come il keV (=103 eV) oppure il MeV (=106 eV). Il rapporto tra eV e J (joule), unità dell'energia nel Sistema Internazionale (SI), è dato da:  $1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19} \text{ J}$ .

Tabella 1. Effetti e scopi del trattamento con radiazioni ionizzanti di derrate alimentari e relative dosi

Effetti del trattamento	Dose (kGy)*
<b>Basse dosi (<math>\leq 1</math> kGy)</b>	
a) Inibisce la germogliazione di patate, cipolle e aglio.	0,05 – 0,15
b) Sterilizza o distrugge insetti infestanti, larve e uova incluse, presenti in cereali, farine, frutta fresca e secca, leguminose ecc. impedendone la proliferazione ciò a scopo di quarantena e per prevenire perdite di prodotti.	0,15 – 0,7
c) Distrugge parassiti (elminti, nematodi inclusa la <i>Trichinella spiralis</i> e la <i>Taenia saginata</i> ) in carni fresche di maiale prevenendo così malattie da parassiti.	0,3 – 0,5
d) Ritarda la maturazione di certe frutta e ortaggi.	0,25 – 1,0
e) Riduce i livelli di batteri innocui causa del deterioramento di carni fresche, pollame e prodotti ittici.	0,5 – 1,0
<b>Dosi intermedie (circa 1-10 kGy)</b>	
a) Riduce il numero di batteri e funghi che causano il deterioramento di carni fresche, pollame, prodotti ittici e agricoli (es. fragole).	1,0 – 3,0
b) Elimina la muffa dai prodotti da forno (es. pane in cassetta).	2,0 – 4,0
c) Ritarda l'apertura del cappello e il deterioramento dei funghi.	2,0 – 4,0
d) Distrugge batteri patogeni (es. Salmonella, Listeria, ecc.) in prodotti di origine animale (es. latte e uova in polvere), in cibi congelati (es. cosce di rana, gamberetti, pesci), eliminando il rischio di tossinfezioni.	3,0 – 10,0
e) Sterilizza spezie, vegetali e frutta disidratata, ecc. e il materiale per il confezionamento.	3,0 – 10,0
<b>Alte dosi (circa 10-50 kGy)</b>	
a) Migliora la reidratazione di ortaggi disidratati, ecc.	10 – 50
b) Sterilizza carni a bassa acidità, pollame e prodotti ittici precotti e conservati in confezioni sigillate, eliminando così anche microrganismi sporigeni.	10 – 50
c) Sterilizza diete complete o componenti di tali diete per pazienti immunodepressi.	10 – 50

\* Quando la radiazione ionizzante penetra in un materiale, tutta o parte della sua energia viene assorbita dal materiale. L'energia assorbita è chiamata dose assorbita e la sua unità di misura è il gray (Gy) definito come la quantità di energia di 1 J assorbito da una massa di 1 kg: 1 Gy = 1 J/kg.

In seguito alla proposta fatta nel 1981 dal Comitato Congiunto di Esperti della FAO/IAEA/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Atomic Energy Agency/World Health Organization*) (2) i possibili usi pratici del trattamento con radiazioni ionizzanti dei prodotti alimentari sono stati raggruppati in applicazioni a basse dosi, a dosi intermedie e ad alte dosi (Tabella 1).

Questa suddivisione è in qualche modo arbitraria in quanto non esiste alcuna linea di divisione netta tra questi trattamenti, tuttavia essa serve da linea guida, ancorché approssimata, poiché non è possibile l'irraggiamento uniforme, cioè con la stessa dose, di ogni infinitesimo strato di prodotto confezionato in quanto il rapporto  $D_{max}/D_{min}$  (dove  $D_{max}$  è la dose massima assorbita e  $D_{min}$  è la dose minima assorbita) che determina l'uniformità di distribuzione di dose in un prodotto è condizionato dalla densità del prodotto, dalla natura della radiazione ionizzante e dal tipo di impianto di irraggiamento. Ad esempio se in un prodotto è richiesta una dose minima di 8 kGy per raggiungere un certo scopo, con un irradiatore da laboratorio avente un rapporto di uniformità di 1,8 si otterrà una dose massima di 14,4 kGy e una dose media di circa 11 kGy. Nel caso di un irradiatore industriale, avente un rapporto di uniformità di 3 si otterrà, in quel prodotto, una dose massima di 24 kGy e una dose media di circa 16 kGy.

Nella situazione pratica, inoltre, gli scopi ottenibili con l'irraggiamento non sono così distinti. Ad esempio il trattamento delle carni per prevenire tossinfezioni alimentari da salmonella e altri microrganismi patogeni, può portare automaticamente ad un prolungamento,

nel tempo, della conservazione della carne refrigerata, così come il trattamento di frutta per eliminare muffe e lieviti può, allo stesso tempo, portare ad un ritardo nella maturazione.

Le dosi di cui si è fatto cenno sono il frutto di un bilanciato compromesso tra quanto è necessario per ottenere l'effetto o gli effetti desiderati dal trattamento e quanto può essere tollerato dal prodotto senza che si verifichino indesiderati cambiamenti sensoriali e nutrizionali nel prodotto trattato. Infatti dosi troppo alte possono alterare le proprietà organolettiche (sviluppo di odori sgradevoli e/o perdite di colore e compattezza) negli alimenti ad alto contenuto di umidità e pertanto questi effetti indesiderati sono fattori limitanti. Inoltre nel caso di alimenti proteici di origine animale, la dose massima somministrabile è determinata dallo sviluppo di un " tipico odore da irraggiamento". Infine nella frutta fresca e nei vegetali, l'intenerimento e l'accresciuta permeabilità dei loro tessuti in seguito a trattamento con radiazioni possono essere fattori limitanti in quanto l'eventuale ridotta immunità naturale dei tessuti irraggiati può portare ad un'accelerazione del deterioramento del prodotto se i microrganismi hanno la possibilità di infestarlo nuovamente dopo l'irraggiamento.

Il trattamento può essere fatto unitamente ad altre procedure come l'irraggiamento a bassa temperatura, sotto vuoto o in atmosfera inerte o in combinazione con il trattamento termico. In ogni caso, poiché le radiazioni ionizzanti possono penetrare qualsiasi tipo di involucro, l'irraggiamento è applicabile a prodotti ermeticamente sigillati e ciò serve a prevenire la reinfestazione da insetti o muffe oppure la ricontaminazione da microrganismi.

## **Impianti e sorgenti di radiazioni per l'irraggiamento dei prodotti alimentari**

Il trattamento a livello commerciale di prodotti alimentari con i tipi di radiazioni ionizzanti ammessi dal *Codex Alimentarius* è attualmente effettuato in una sessantina di impianti pilota e commerciali distribuiti in poco più di 30 Paesi. In pratica si tratta principalmente di impianti con sorgenti di  $^{60}\text{Co}$  e alcuni con acceleratori di elettroni da 4,5 a 10 MeV. Altri impianti sono in costruzione o sono programmati per un prossimo futuro.

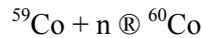
La progettazione degli impianti è tale da renderli il più possibile versatili in modo da poter trattare prodotti diversi, ma compatibili tra loro, riducendo così i costi del processo. La maggior parte di questi impianti quindi sono plurivalenti e vengono utilizzati anche per la sterilizzazione di prodotti medicali dato che, nella maggior parte dei casi, la quantità di alimenti da trattare non è sufficiente per un utilizzo a tempo pieno dell'impianto. In tutti gli impianti, inoltre, si cerca di irradiare i prodotti il più uniformemente possibile. Come già si è visto, è tuttavia praticamente impossibile ottenere una distribuzione uniforme della dose di radiazioni in tutto il prodotto, specialmente quando grandi quantità di prodotti voluminosi devono essere trattati tenendo presente l'aspetto economico del processo.

Norme pratiche riguardanti il trattamento degli alimenti e loro ingredienti con le radiazioni ionizzanti sono riportate negli Standard ISO/ASTM 51204 (3) e ISO/ASTM 51431 (4). Questi standard forniscono una serie di informazioni per il corretto funzionamento degli impianti di irraggiamento e per una corretta dosimetria.

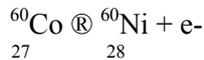
### **Impianti a raggi $\gamma$**

Dei due radionuclidi, sorgenti di raggi  $\gamma$ , ammessi nel trattamento degli alimenti, il  $^{137}\text{Cs}$  pur avendo un tempo di dimezzamento assai più lungo di quello del  $^{60}\text{Co}$ , è oramai poco usato a causa della bassa energia della radiazione  $\gamma$  emessa (0,662 MeV) e degli alti costi per la sua

separazione dagli altri prodotti di fissione del combustibile nucleare. Per questo motivo viene preferito il  $^{60}\text{Co}$  e oggi gli impianti di irraggiamento sono quasi esclusivamente impianti a  $^{60}\text{Co}$ . Questo radioisotopo è prodotto intenzionalmente nei reattori nucleari per irraggiamento dell'isotopo stabile  $^{59}\text{Co}$  con un flusso ad alta densità di neutroni:



Il  $^{60}\text{Co}$  decade poi con un tempo di dimezzamento di 5,27 anni a  $^{60}\text{Ni}$  stabile:



Questo processo è accompagnato dall'emissione di due fotoni aventi energia 1,17 e 1,33 MeV con una efficienza del 100% per entrambi i fotoni (Figura 1).

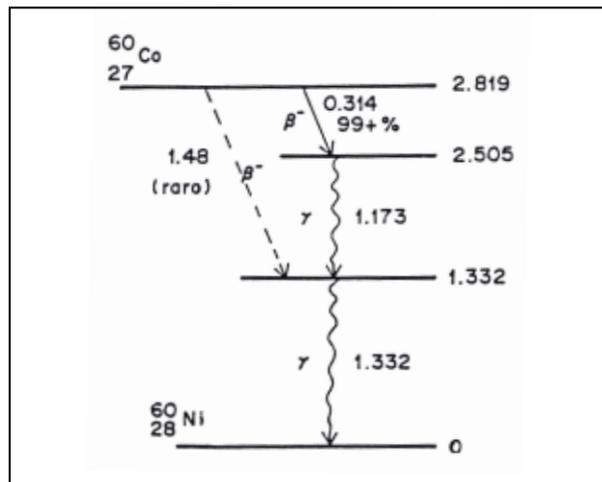


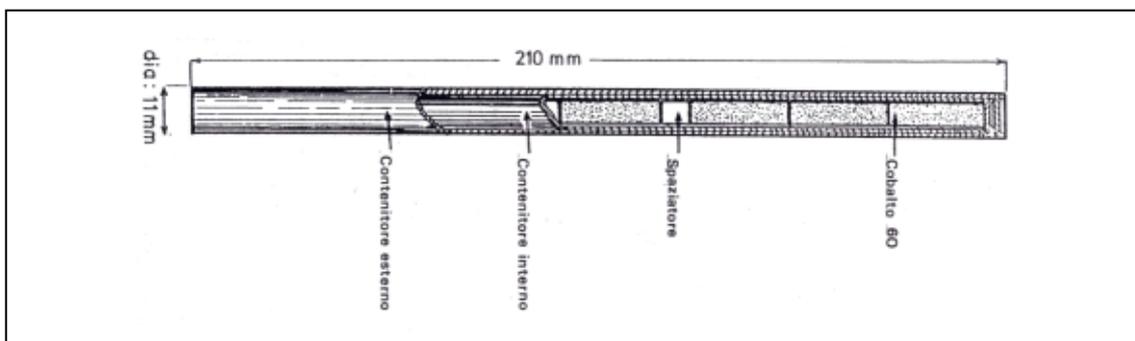
Figura 1. Schema di decadimento del  $^{60}\text{Co}$

Sia che utilizzino  $^{60}\text{Co}$  oppure  $^{137}\text{Cs}$  gli impianti di irraggiamento  $\gamma$ , il cui aspetto esteriore non differisce di molto da un qualsiasi altro impianto industriale di dimensioni medio-piccole, sono sostanzialmente simili come costruzione. L'unica differenza sta nello spessore della schermatura di protezione per la sicurezza del personale addetto che, nel caso di sorgenti di  $^{137}\text{Cs}$ , può essere inferiore a quella prevista per gli impianti a  $^{60}\text{Co}$ , in quanto le radiazioni  $\gamma$  emesse dal  $^{137}\text{Cs}$ , avendo minor energia, hanno minor penetrazione.

Il materiale radioattivo ( $^{60}\text{Co}$  o  $^{137}\text{Cs}$ ) è, in generale, preparato sotto forma di piccole pastiglie cilindriche inserite entro un doppio tubicino di acciaio inox o di una lega a base di zirconio (Figura 2); il tutto è ermeticamente saldato. Le dimensioni sia delle pastiglie sia dei contenitori, chiamati matite o capsule, sono tali da minimizzare e l'assorbimento della radiazione  $\gamma$  da parte della pasticca e dell'involucro, e l'aumento di temperatura che ne consegue. Il doppio contenitore assicura la massima sicurezza affinché il materiale radioattivo non venga in contatto diretto con il prodotto da trattare. Le matite, aventi ciascuna un'attività dell'ordine di circa  $10^{15}$  Bq,<sup>2</sup> sono assemblate in rastrelliere aventi dimensioni  $1 \times 1$  m<sup>2</sup> circa. Ogni rastrelliera può contenere matite aventi attività diversa o anche spazi vuoti per un

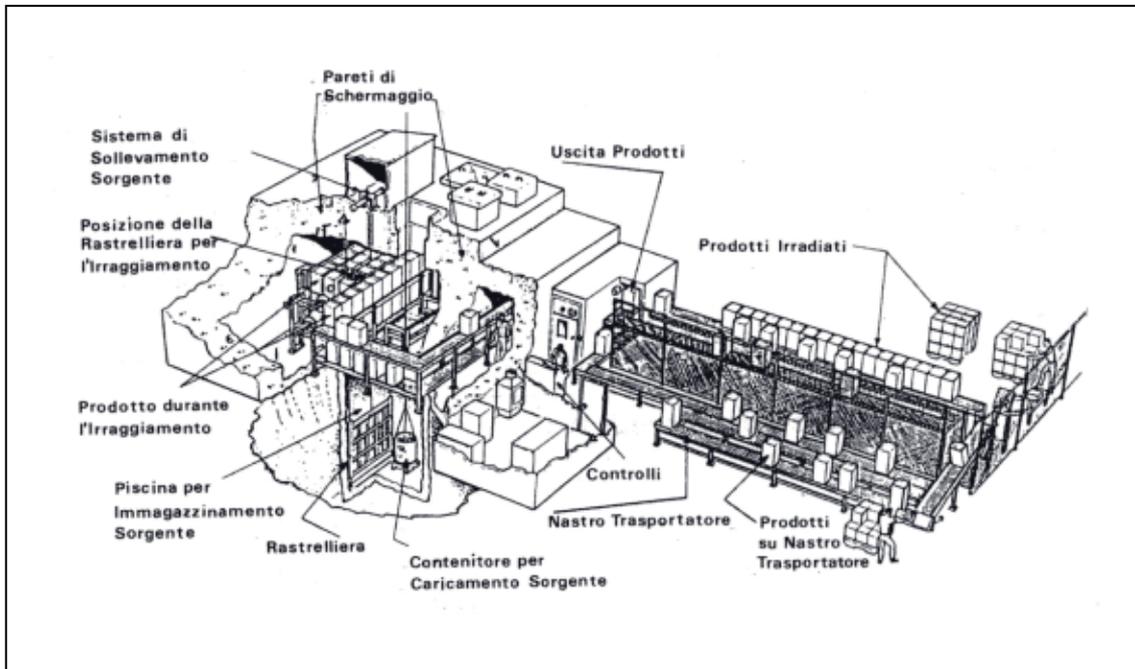
<sup>2</sup> Il becquerel (Bq) è l'unità di misura nel Sistema Internazionale (SI) dell'attività di un radionuclide e corrisponde ad una disintegrazione al secondo. La vecchia unità di misura, tuttora utilizzata, è il curie (Ci) equivalente a  $3,7 \times 10^{10}$  Bq.

successivo caricamento di nuove capsule per cui è possibile, disponendo in modo opportuno le matite, ottenere all'interno della cella di irraggiamento un campo di radiazioni relativamente uniforme. L'insieme di una o più rastrelliere costituisce la sorgente propriamente detta. In un anno l'attività della sorgente di  $^{60}\text{Co}$  decade del 12,4% e pertanto occorre tener conto di questo decadimento nel computo del tempo di irraggiamento che occorre per dare la dose richiesta al prodotto.



**Figura 2. Matita di  $^{60}\text{Co}$  utilizzata negli impianti industriali (il cobalto radioattivo è incapsulato in un doppio contenitore di acciaio inox a tenuta stagna; l'inserimento di spaziatori di materiale inerte tra le pasticche di cobalto permette una maggior uniformità del campo di radiazioni)**

Nella Figura 3 è rappresentato un tipico impianto commerciale a  $^{60}\text{Co}$  per l'irraggiamento continuo di prodotti imballati. Un impianto di irraggiamento consiste essenzialmente di un vasto ambiente chiamato "camera calda" con muri in calcestruzzo di spessore sufficiente a impedire la fuga di radiazioni verso l'esterno.



**Figura 3. Impianto commerciale a stoccaggio della sorgente in piscina per il trattamento gamma di prodotti vari**

Pareti di 1,5-2 m di spessore sono sufficienti a schermare adeguatamente la sorgente di cobalto (1 m per le sorgenti di cesio) localizzata nel centro della camera calda, mantenendo il livello di radiazioni all'esterno conforme ai requisiti di sicurezza operativa. I prodotti da irraggiare entrano nella stanza di irraggiamento (camera calda) attraverso un percorso a labirinto che, unitamente allo spessore delle pareti, impedisce alle radiazioni di raggiungere la zona di lavoro, dove i prodotti sono caricati o scaricati dal sistema di trasporto. La sorgente può essere spostata mediante un sistema di sollevamento comandato a distanza, in due posizioni: una in superficie per l'irraggiamento dei materiali, l'altra di sicurezza e riposo quando si trova abbassata ad una profondità di circa 6 m in una piscina colma d'acqua che, oltre a fornire la necessaria schermatura, serve a raffreddare la sorgente. Installazioni di questo tipo sono dette "impianti a stoccaggio della sorgente in piscina". Casi meno frequenti contemplano una posizione di riposo con scomparsa della sorgente in un bunker nel sottosuolo su cui viene richiuso un portellone di piombo e acciaio. Questi sono i cosiddetti "impianti a stoccaggio a secco della sorgente".

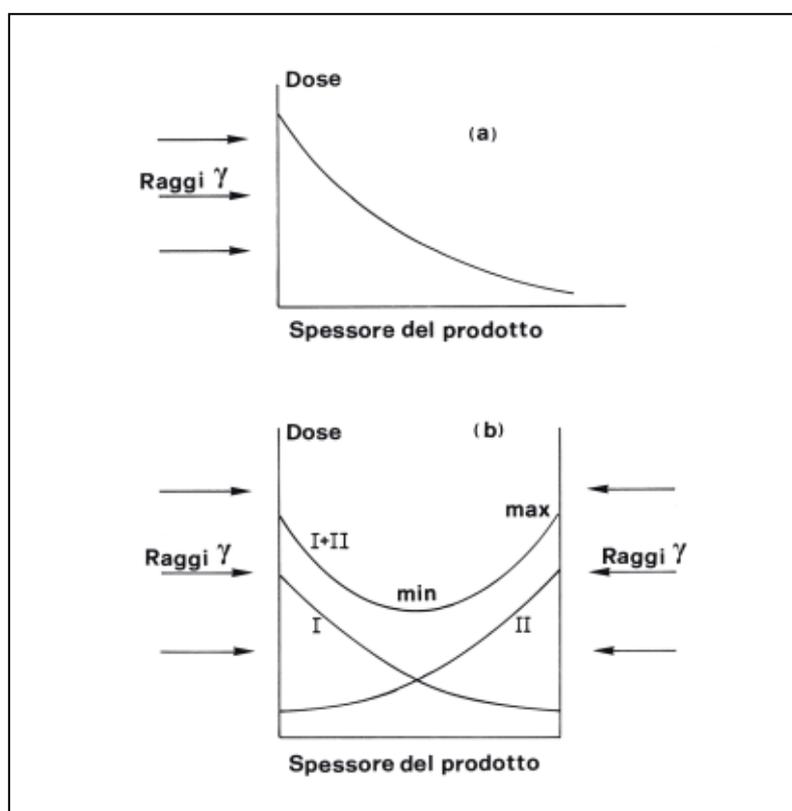
Quando la sorgente è in posizione di riposo il personale addetto può entrare senza pericolo nella stanza di irraggiamento per effettuare eventuali riparazioni ad esempio al sistema di trasporto. Solo quando tutto il personale ha lasciato la stanza e tutti i dispositivi di sicurezza sono stati attivati la rastrelliera con le matite di  $^{60}\text{Co}$  può essere portata in superficie e il processo di irraggiamento può avere inizio. Un dispositivo di blocco controlla l'accesso alla camera calda per cui l'ingresso non è possibile quando la sorgente è in posizione, pronta per l'irraggiamento. I prodotti da trattare, generalmente confezionati in contenitori di cartone, vengono caricati, in due o più livelli, su una serie continua di contenitori in alluminio (*carrier*) appesi ad una monorotaia oppure su un nastro trasportatore in movimento ininterrotto lungo un determinato tracciato. Questo si snoda attraverso la parete di calcestruzzo della camera calda, attorno alla sorgente in modo da consentire un irraggiamento dei prodotti da due lati opposti assicurando così una certa omogeneità di distribuzione della dose. Ciascuno di questi contenitori metallici, caricato di cartoni impilati, compie l'intero percorso all'interno della camera calda in un tempo che generalmente va da 4 a 24 ore a seconda della dose richiesta, della geometria del percorso attorno alla sorgente e dell'attività della sorgente. Naturalmente una parte del circuito corre esternamente alla camera calda, dove avviene in continuo, in due zone ben separate tra di loro, il carico dei prodotti da irraggiare e lo scarico di quelli già irraggiati. Il tempo che ciascun contenitore deve rimanere nella posizione di irraggiamento è predeterminato alla console di controllo e registrato da un sistema automatico di stampa. Sullo stampato appare anche la descrizione e il numero di lotto a cui appartiene il materiale nel contenitore. È così possibile, in ogni momento, verificare quale prodotto è stato irraggiato, quando e per quanto tempo. Tutto questo unitamente alla conoscenza dell'attività della sorgente ci permette di stimare la dose assorbita. Ciò però non esime dall'attuare misure di dose utilizzando dosimetri messi in opportune posizioni sui contenitori o sulle confezioni dei prodotti, come vedremo in seguito.

L'efficienza di un impianto a  $^{60}\text{Co}$  è tra il 20-40%, cioè solo 20-40% della radiazione emessa viene utilizzato, il resto è assorbito all'interno della sorgente stessa (circa un 10% nel caso del  $^{60}\text{Co}$  e un 30-40% per sorgenti di  $^{137}\text{Cs}$ ), dal sistema di trasporto e dalle pareti di schermatura (5).

L'impianto di irraggiamento deve essere dotato inoltre di un sistema di ventilazione o di condizionamento per mantenere la temperatura all'interno della camera calda a valori ragionevoli (circa 30-35 °C oppure a temperature molto più basse allorché si devono irraggiare prodotti surgelati). Infatti a causa dell'assorbimento interno di energia da parte della sorgente stessa, la sua superficie può raggiungere temperature fino a 100 °C e oltre mentre l'energia assorbita dal prodotto durante l'irraggiamento causa solo un modesto innalzamento di

temperatura del prodotto stesso.<sup>3</sup> Inoltre per ridurre al minimo il pericolo di corrosione delle matite, l'acqua della piscina di stoccaggio della sorgente è continuamente fatta circolare attraverso un deionizzatore. Un rivelatore di radiazioni posto vicino al deionizzatore permette di rilevare qualsiasi radioattività nell'acqua della piscina causata da una eventuale perdita di materiale radioattivo da parte della sorgente.

Negli impianti commerciali di irraggiamento gamma, per rendere più uniforme possibile la distribuzione della dose nel prodotto, cioè per rendere ottimale il rapporto dose massima/dose minima ( $D_{max}/D_{min}$ ), si usa disporre le matite a schiera su una o più rastrelliere. Il prodotto viene fatto passare davanti alla sorgente e irradiato da due o più lati contrapposti. Irraggiando un prodotto omogeneo da un solo lato si ha una distribuzione di dose ad andamento esponenziale, decrescente con lo spessore del materiale trattato (Figura 4a), mentre l'irraggiamento da due lati opposti dà una distribuzione che presenta un minimo nel mezzo e un massimo alla superficie della confezione (Figura 4b). Il rapporto  $D_{max}/D_{min}$  dipende anche dallo spessore e dalla densità volumetrica del prodotto. Pertanto attraverso un opportuno dimensionamento delle confezioni da trattare e un'accurata progettazione dell'impianto si cerca di ottenere un rapporto  $D_{max}/D_{min}$  il più vicino possibile all'unità.



**Figura 4. (a) Distribuzione della dose in funzione della profondità in un prodotto voluminoso omogeneo irraggiato da un solo lato (I) usando una sorgente a rastrelliera. (b) Distribuzione della dose nello stesso prodotto come risultato di un irraggiamento bilaterale (I+II). Sono indicati i punti di minimo e di massimo di dose**

<sup>3</sup> L'assorbimento di una dose di 10 kGy da parte di una massa d'acqua ne innalza la temperatura di 2,4 °C.

## Impianti con acceleratori di elettroni

Gli acceleratori di elettroni sono essenzialmente dei convertitori di energia elettrica in corrente elettronica rappresentata dal fascio di elettroni. Sono intrinsecamente sicuri, precisi, controllabili e coprono un ampio intervallo di energie e di potenze erogate. Contrariamente alle sorgenti  $\gamma$ , gli acceleratori possono essere accesi o spenti a piacere, in quest'ultimo caso non si ha alcuna emissione di radiazioni. Attualmente il numero di impianti commerciali dotati di acceleratori che trattano anche prodotti alimentari è ancora relativamente piccolo (circa una decina in tutto il mondo). L'energia utilizzabile allo scopo va dai 1,5 MeV, sufficiente per trattare prodotti sfusi come ad esempio cereali, fino a 10 MeV. La potenza erogata dai più potenti acceleratori industriali può superare i 100 kW. Voltaggio e corrente del fascio sono i due parametri che caratterizzano un acceleratore. Il primo determina l'energia e quindi il potere di penetrazione degli elettroni nel prodotto da trattare, mentre a parità di voltaggio, la corrente del fascio determina la quantità di prodotto che può essere irraggiato in proporzionalità diretta.

Gli acceleratori si distinguono in acceleratori elettrostatici, cioè operanti in corrente continua (DC) e in acceleratori a radiofrequenza (RF).

### Acceleratori in corrente continua

Semplificando possiamo dire che negli acceleratori in corrente continua una tensione, o differenza di potenziale, viene usata per accelerare gli elettroni all'interno di un cilindro cavo sotto vuoto spinto. Gli elettroni emessi in seguito a riscaldamento da un filamento di tungsteno (il così detto catodo caldo) sono attirati dal potenziale positivo all'estremità opposta del cilindro cavo. L'energia finale degli elettroni è così direttamente proporzionale alla differenza di potenziale che esiste tra le due estremità del tubo acceleratore.

Questa macchina utilizza un oscillatore per convertire la tensione alternata della rete di alimentazione in radiofrequenza. Un trasformatore risonante collegato con una serie di rettificatori trasforma la radiofrequenza in tensione continua dell'ordine di alcuni milioni di volt che viene applicata al tubo acceleratore. Gli elettroni emessi dal catodo sono iniettati all'interno del tubo acceleratore. Qui, sottoposti al campo elettrostatico applicato lungo il tubo, vengono accelerati fino a raggiungere energie di 2,5-5 MeV creando così un fascio continuo di elettroni d'alta energia del diametro di 2,5 cm circa. Il fascio di elettroni passa quindi nella camera di scansione, anch'essa sottovuoto spinto, attraverso un campo magnetico oscillante alla frequenza di 100-200 Hz che lo fa muovere avanti e indietro, come un pendolo, creando una cortina di elettroni la quale forma una linea di irraggiamento larga da 90 cm a 2,5 m. Gli elettroni uscendo dalla camera di scansione attraverso una sottile finestra di titanio andranno a colpire il materiale da trattare.

L'utilizzo di campi elettrostatici per accelerare elettroni porta ad una limitazione delle energie raggiungibili ( $\leq 5$  MeV) a causa di problemi di isolamento che insorgono nelle strutture isolanti allorché queste sono sottoposte a tensioni statiche superiori al milione di volt per metro. Questi limiti vengono agevolmente superati usando tensioni alternate, che permettono sia l'accelerazione ciclica, sia campi elettrici molto più elevati ( $>10$  MeV) senza perforazione degli isolanti. Questo principio viene utilizzato negli acceleratori lineari (*LINear ACcelerator*, LINAC) e a cavità risonante.

### Acceleratori lineari

Dallo schema a blocchi riportato nella Figura 5 si può vedere quali sono i principali elementi costitutivi di un LINAC.

I LINAC, in generale, utilizzano l'onda viaggiante di una radiazione elettromagnetica, compresa nell'intervallo delle radiofrequenze o delle microonde, per accelerare gli elettroni

emessi da un catodo caldo o cannone elettronico (E). Poiché il campo elettrico della radiofrequenza (RF) oscilla (è alternato), gli elettroni sono accelerati soltanto in una regione limitata del ciclo  $2\pi$  della RF. Pertanto gli elettroni che entrano nella guida d'onda (D) non in fase con il campo elettrico della RF o vengono sparpagliati o respinti indietro. Affinché gli elettroni possano essere accelerati dalla RF devono quindi essere iniettati nella sezione acceleratrice in fase con il campo elettrico. Ora poiché gli elettroni vengono emessi in modo continuo dal catodo, mentre la RF è oscillante, per poter entrare in fase con il campo elettrico della RF essi passano attraverso una serie di cavità RF di frequenza progressivamente sempre più alta (il *prebuncher* e il *buncher* che formano il sistema di impacchettamento) che dividono e comprimono il fascio continuo di elettroni in pacchetti, detti anche impulsi, li accelerano e sincronizzano la loro iniezione nella guida d'onda (D) che si trova sotto vuoto spinto. In essa scorre il campo elettromagnetico, generato da una sorgente di radiofrequenza (A), che attraverso la sua componente elettrica fornisce la tensione acceleratrice. I pacchetti di elettroni viaggiano nella guida d'onda, sulla cresta dell'onda elettromagnetica in modo da usufruire della massima intensità del campo acceleratore. In questo modo gli elettroni vengono continuamente accelerati acquistando energia. Il modulatore del cannone elettronico (F) permette di variare l'intensità, cioè la corrente e la durata dell'impulso di elettroni. Un sistema di innesco parzialmente programmabile (G), chiamato "master trigger generator" controlla tutta la sequenza degli impulsi di pilotaggio delle sezioni B, C e F perché operino nella giusta fase tra di loro. Come nel caso degli acceleratori elettrostatici anche qui il fascio di elettroni, che con buona approssimazione si può considerare monoenergetico, lascia la camera di accelerazione passando, attraverso un campo magnetico oscillante, al braccio di scansione, quindi esce attraverso una finestra molto sottile (alcune decine di mm di spessore) di titanio. Ora però il fascio è impulsato anziché continuo e la durata dell'impulso in genere è di qualche decina di ms con una frequenza di ripetizione da 100 a 500 Hz. Con gli acceleratori lineari si possono raggiungere potenze fino a 50 kW.

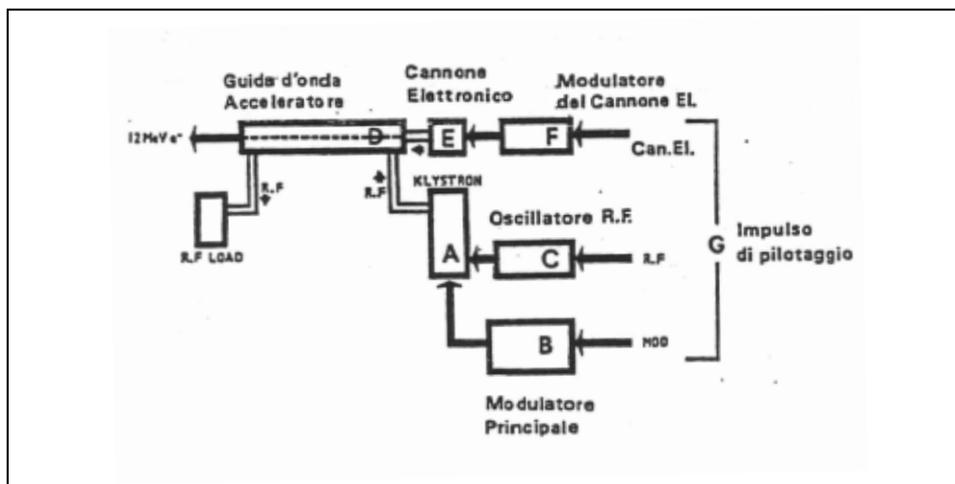


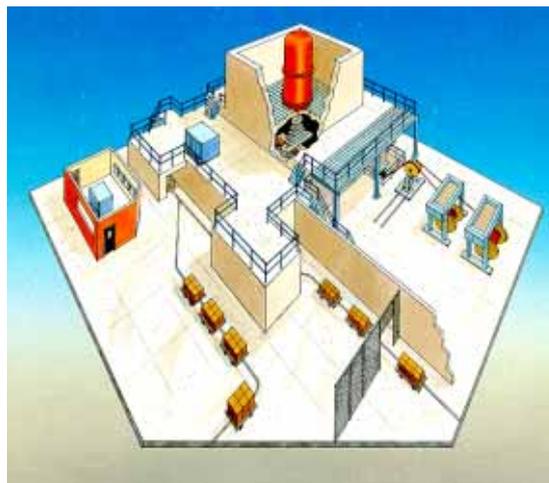
Figura 5. Schema a blocchi di un acceleratore lineare

### Acceleratori a cavità risonante

Nel corso degli anni sono stati progettati e costruiti vari tipi di acceleratori a cavità risonante dove la RF è confinata in queste cavità anziché viaggiare lungo una guida d'onda. Il più recente

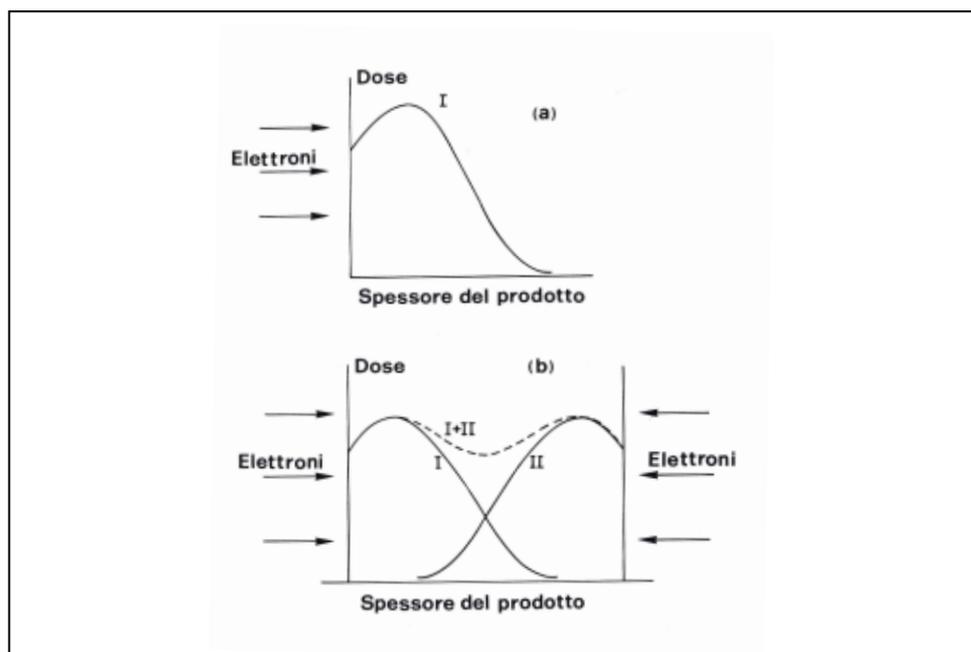
e anche il più potente di questi acceleratori è prodotto in Belgio dalla IBA ed è stato immesso sul mercato con il nome commerciale di “Rhodotron”. Lo schema generale di funzionamento è il seguente: gli elettroni generati da un cannone elettronico sotto vuoto, situato esternamente alla cavità, sono iniettati nella cavità stessa, nel cui interno vengono accelerati una prima volta dal campo elettrico radiale della RF verso l’interno della cavità. Passano quindi attraverso le aperture situate nel conduttore centrale e allorché riemergono dall’altra parte trovano il campo elettrico nuovamente in fase e così subiscono una seconda accelerazione completando una prima volta l’attraversamento della cavità. Il fascio accelerato viene quindi deflesso passando attraverso un magnete esterno e rinviato dentro la cavità per un secondo ciclo di accelerazione; i cicli vengono ripetuti fino a raggiungere l’energia e la potenza richiesta. Considerando che ad ogni attraversamento della cavità gli elettroni acquisiscono 1 MeV di energia, sono necessari 10 passaggi e nove magneti flettenti per ottenere un fascio da 10 MeV. Poiché il fascio di elettroni viaggia lungo un tracciato a forma di rosa stilizzata a questo tipo di acceleratore è stato dato il nome di Rhodotron, dal greco Rhodos che significa appunto rosa. Completati i cicli di accelerazione il fascio di elettroni viene portato fuori dalla cavità acceleratrice per mezzo di una guida e arriva nella zona di irraggiamento dove passando attraverso un braccio di scansione lascia il vuoto e con un movimento di avanti e indietro viene fatto scorrere sui prodotti da irraggiare. Il Rhodotron è disponibile in tre modelli base e il più potente di questi modelli raggiunge i 200 kW a 10 MeV.

Nella Figura 6 è illustrato un impianto commerciale di irraggiamento con acceleratore di elettroni. Non appena le operazioni di controllo per un corretto funzionamento della macchina sono state effettuate e definiti i parametri caratteristici come l’energia e l’ampiezza di scansione del fascio di elettroni, la dose, la velocità del sistema di trasporto del prodotto ecc., il sistema di controllo attiva la procedura di inizio. I prodotti da irraggiare, confezionati secondo le modalità richieste, vengono trasportati, mediante un opportuno sistema di movimentazione, dalla zona di carico nella stanza di irraggiamento e fatti passare attraverso la cortina di elettroni prodotta dalla scansione del fascio, così l’intera superficie del prodotto viene irraggiata. La scansione è resa necessaria dal fatto che il fascio di elettroni ha un diametro da pochi millimetri fino a circa 2 cm e pertanto senza scansione tutta la potenza del fascio sarebbe concentrata soltanto su un’area molto ridotta del prodotto, causando un sovradosaggio. Quindi facendo oscillare il fascio avanti e indietro e muovendo contemporaneamente il materiale da irraggiare perpendicolarmente alla linea di scansione, si ottiene una regolare distribuzione della dose in tutto il volume del prodotto.



**Figura 6. Schema di impianto commerciale di irraggiamento con acceleratore di elettroni**

Anche se un trattamento efficace e sufficientemente uniforme, in particolari condizioni, può essere ottenuto mediante irraggiamento su un lato solo del prodotto, molto spesso è più vantaggioso, o anche necessario, irraggiare il prodotto su due lati contrapposti, o per migliorare l'uniformità della distribuzione di dose o per poter irraggiare prodotti di maggior spessore. Questo fatto è legato alla limitata capacità di penetrazione degli elettroni. Infatti, come regola pratica, si considera che la profondità di penetrazione di un fascio di elettroni, nella maggior parte dei prodotti alimentari, sia 5 mm/MeV. Pertanto con elettroni da 10 MeV è possibile penetrare spessori di 5 cm irraggiando da un solo lato, mentre si possono penetrare spessori di 10 cm con l'irraggiamento su due lati contrapposti. In Figura 7 è riportata la distribuzione della dose in un prodotto omogeneo irraggiato da un solo lato (Figura 7a) e da due lati (Figura 7b) in un prodotto di maggior spessore, utilizzando elettroni monoenergetici.



**Figura 7. Distribuzione della dose in un prodotto omogeneo irraggiato da un solo lato (I) con elettroni monoenergetici (a). Effetto dell'irraggiamento da due lati opposti (I+II) in un prodotto di maggior spessore (b)**

Come nel caso degli impianti a raggi  $\gamma$  anche per gli impianti con acceleratore la zona di stoccaggio e carico dei prodotti da trattare è rigorosamente separata dalla zona di scarico e stoccaggio dei prodotti già irraggiati. Inoltre, prima del trattamento con radiazioni, per maggior sicurezza viene apposta, esternamente e ben visibile, su ogni confezione di prodotti, in genere scatoloni di ben fissate dimensioni, una etichetta adesiva la quale cambia di colore in seguito ad irraggiamento (da giallo prima dell'irraggiamento a rosso acceso dopo, oppure da viola chiaro a viola-blu scuro) e questo per evitare che un prodotto subisca un doppio irraggiamento. La stanza di irraggiamento è un bunker in cemento armato con pareti di 2-4 m di spessore atte ad impedire che raggi X, generati dal fascio di elettroni nell'interazione con il prodotto da trattare, escano all'esterno causando pericolo per gli operatori. È dotata di un sistema di aspirazione forzata per rimuovere l'ozono che si forma durante l'irraggiamento. Apposite aperture nelle pareti laterali

del bunker permettono il passaggio del nastro convogliatore che, seguendo un tracciato a labirinto, trasporta i prodotti da irraggiare di fronte al fascio di elettroni.

Durante il trattamento tutti i vari parametri dell'acceleratore e del nastro convogliatore sono controllati e registrati da un sistema di controllo computerizzato unitamente alla descrizione e alla partita a cui appartiene il materiale trattato. Anche in questo caso sono necessarie misure di dose utilizzando dosimetri messi in opportune posizioni sui contenitori o sulle confezioni dei prodotti come vedremo in seguito.

Così come nel caso delle sorgenti  $\gamma$  da  $^{60}\text{Co}$ , anche nel caso dei fasci di elettroni il completo utilizzo di 1 kW di radiazione (100% di efficienza) permetterebbe di processare 360 kg/h di prodotto ad una dose di 10 kGy. Tuttavia mentre l'efficienza reale del trattamento con elettroni è attorno al 50%, quella con raggi  $\gamma$  da  $^{60}\text{Co}$  è circa il 30%, per cui 1 kW di potenza da un acceleratore permette di processare 180 kg/h di prodotto e 1 kW da una sorgente di  $^{60}\text{Co}$  (pari ad una attività di ca. 67 kCi o  $2,5 \times 10^{15}$  Bq) permette di processare 108 kg/h di prodotto (5, 6).

A causa della limitata penetrazione degli elettroni nei materiali è abbastanza verosimile che in un prossimo futuro si possano utilizzare i raggi X per il trattamento di prodotti alimentari e loro ingredienti. Come i raggi  $\gamma$  anche i raggi X sono di natura elettromagnetica e pur avendo le stesse proprietà fisiche e gli stessi effetti sulla materia, hanno però origine diversa. I raggi  $\gamma$  sono emessi con energie ben definite da isotopi radioattivi durante il loro decadimento spontaneo, i raggi X invece, sono prodotti ogni qualvolta elettroni accelerati (aventi energia  $\geq 100$  keV) interagendo con un bersaglio di metallo ad alto numero atomico subiscono un rallentamento passando nelle vicinanze dei nuclei degli atomi del metallo. L'energia persa dagli elettroni a causa di questo rallentamento viene emessa sotto forma di radiazione elettromagnetica avente uno spettro energetico continuo. Questa radiazione è chiamata anche radiazione di *bremsstrahlung* (frenamento) o raggi X.

## Dosimetria

In tutti i processi di irraggiamento un'accurata dosimetria, cioè la misura della dose, assicura che il trattamento sia stato correttamente applicato e che tutti i punti di ogni collo di prodotto abbiano ricevuto almeno la dose minima richiesta per l'efficacia del trattamento. Essa inoltre fornisce un riferimento quantitativo al quale rapportare le variazioni chimiche, fisiche e biologiche prodotte dalle radiazioni nei materiali trattati. Per misurare la dose si fa uso di dosimetri. Per dosimetro si intende un qualsiasi dispositivo che, in seguito ad irraggiamento, mostra un cambiamento quantificabile con precisione in alcune sue caratteristiche, parametri fisici o chimici, che possono essere messe in relazione con la dose assorbita in un dato materiale usando una appropriata strumentazione analitica e tecniche opportune. Per la dosimetria occorre un sistema dosimetrico, esso è definito come il sistema usato per la determinazione della dose assorbita e comprende i dosimetri, gli strumenti di misura, i loro standard di riferimento e le procedure per l'utilizzo del sistema stesso.

Si usa distinguere i vari metodi di misura in "metodi assoluti" e "metodi relativi". I metodi assoluti permettono di risalire direttamente al valore della dose assorbita dalla misura di uno dei suddetti parametri. Sono detti invece metodi relativi quelli che richiedono l'intercalibrazione con uno strumento assoluto.

I metodi assoluti sono il metodo calorimetrico, il metodo ionometrico e quello chimico. Il *metodo calorimetrico* è quello che consente la misura più diretta della dose assorbita, in quanto sfrutta

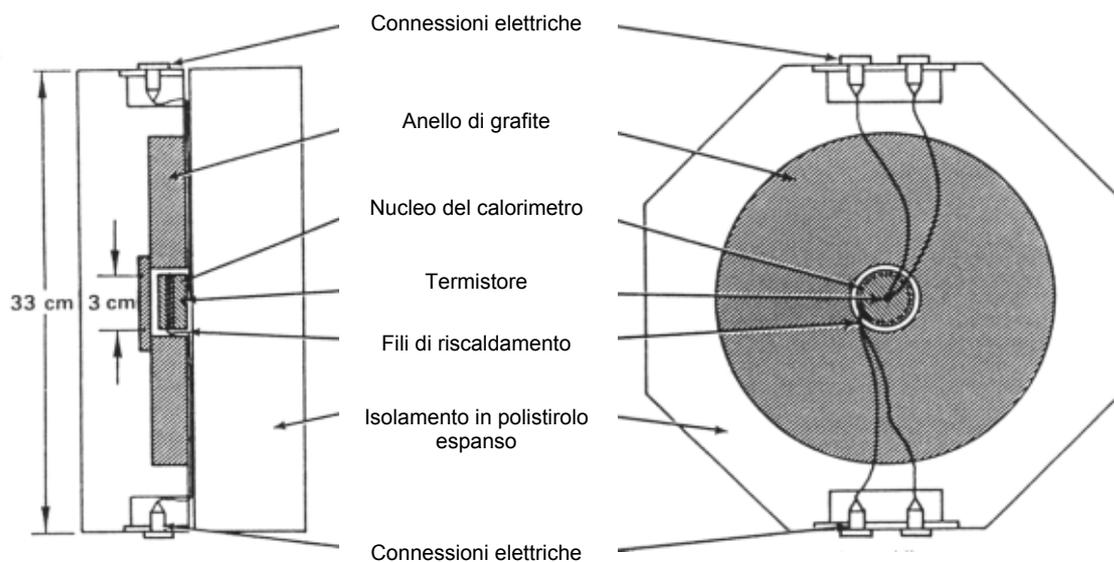
l'innalzamento di temperatura indotto nel mezzo irradiato. È noto infatti che gran parte dell'energia trasferita dalle particelle ionizzanti al mezzo con cui interagiscono viene trasformata in calore.<sup>4</sup>

Si tratta quindi di un metodo assoluto che non richiede la conoscenza preventiva di alcuna quantità. Il metodo *ionometrico* e quello *chimico* richiedono invece la conoscenza preventiva del valore di un parametro caratteristico:

- l'energia media necessaria per creare una coppia di ioni nel gas che si trova nelle camere a ionizzazione,
- il numero di molecole o radicali prodotti per unità di energia assorbita nel caso dei dosimetri chimici.

Tutti gli altri sistemi, i più importanti dei quali rientrano nella categoria dei cosiddetti dosimetri a stato solido, consentono soltanto una misura relativa della dose assorbita e richiedono quindi l'intercalibrazione con uno dei sistemi sopra menzionati.

I dosimetri sono classificati a seconda della posizione che occupano nella scala dei modelli campione o standard. Al primo posto di questa scala di valori troviamo i *dosimetri campione primari* o *standard primari*. Essi sono della più alta qualità metrologica, definiti e conservati come campioni di misura di dose assorbita da uffici nazionali e internazionali di normazione metrologica. Questi standard sono rappresentati dalle camere a ionizzazione e dai calorimetri (Figura 8) che si trovano presso gli istituti nazionali e internazionali di metrologia e danno misure con una incertezza  $\leq \pm 1\%$ .<sup>5</sup>



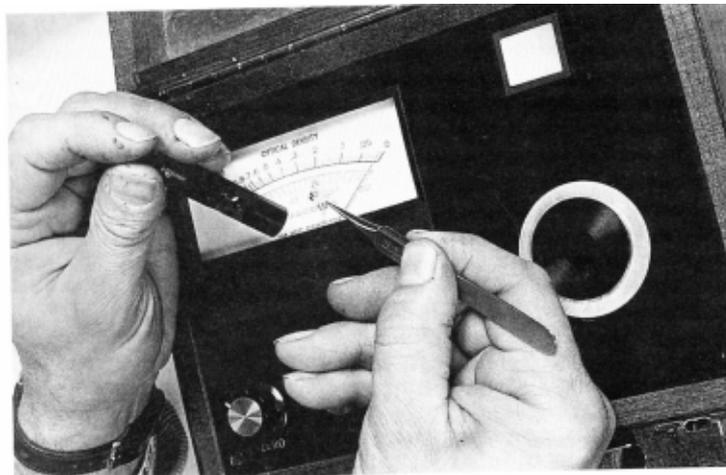
**Figura 8. Calorimetro a grafite del tipo in uso presso il NIST (Washington, USA) per misure di alte dosi con fasci di elettroni da 10 MeV (a sinistra veduta laterale, a destra sezione frontale). Il nucleo del calorimetro, che ne caso di fasci di elettroni di energia minore avrà minor spessore, contiene un termistore e un filo riscaldante per taratura**

<sup>4</sup> Una dose di 10 kGy causa, come abbiamo già detto, un incremento di temperatura di 2,4 °C in acqua, di 6,2 °C in sostanza proteica secca, 7,1 °C in carboidrati alla stato secco e 12,5 °C nel vetro.

<sup>5</sup> L'incertezza dei vari sistemi dosimetrici è espressa a 2 deviazioni standard.

Un gradino più sotto si trovano i cosiddetti *dosimetri di riferimento campione*, di alta qualità metrologica, usati come campione per avere misure di dose assorbita consistenti e rintracciabili con le misure eseguite con dosimetri campione primari. Tra questi dosimetri troviamo i calorimetri, le camere a ionizzazione, l'alanina, il dosimetro chimico di Fricke (una soluzione acquosa di solfato di ferro) e quello a base di bicromato di potassio. L'incertezza associata alla misura con questi dosimetri è inferiore a  $\pm 3\%$ . I dosimetri di riferimento campione sono spesso gestiti da laboratori metrologici riconosciuti nel settore della metrologia delle radiazioni ionizzanti e, in tal caso, vengono detti campioni o standard secondari. Un gradino ancora più sotto abbiamo i *dosimetri di trasferimento campione*, che spesso sono dosimetri di riferimento campione e quindi sufficientemente precisi e stabili, adatti ad essere inviati, spesso per posta, in luoghi diversi per essere irraggiati, unitamente ai dosimetri di routine, per controllare la risposta di questi ultimi e, ritornati al laboratorio di taratura, per la determinazione della dose. L'alanina, alcuni film radiocromici e i dosimetri chimici etanolo-clorobenzene e bicromato di potassio sono esempi di dosimetri di trasferimento. L'incertezza associata alle misure con questi dosimetri è tra  $\pm 3\%$  e  $5\%$ . Un esempio significativo di utilizzo dei dosimetri di trasferimento, sia per la caratterizzazione dell'impianto che per la taratura del sistema dosimetrico di routine, è costituito dalla rete di calibrazione che il *National Institute for Standards and Technology* (NIST, USA) ha organizzato su scala mondiale via internet utilizzando l'alanina come dosimetro di trasferimento.<sup>6</sup>

Ultimi nella scala dei valori sono i *dosimetri di routine*, usati per le verifiche dosimetriche effettuate periodicamente presso l'impianto. Questo tipo di dosimetro deve essere frequentemente tarato rispetto ad uno dei dosimetri di classe superiore sopra menzionati, ma, per la facilità d'uso e per il basso costo, i dosimetri di routine sono ideali per il controllo giornaliero del processo di irraggiamento. In genere sono in materiale plastico (Figura 9 e 10) contenente un colorante che cambia colore in seguito all'assorbimento della radiazione. La variazione di colore è proporzionale alla dose e si misura generalmente con uno spettrofotometro o un densitometro. L'incertezza associata ai dosimetri di routine è  $\leq \pm 10\%$ .



**Figura 9. Film radiocromico sottile in nylon mentre viene inserito nel portacampioni per la lettura della variazione di assorbanza mediante densitometro**

<sup>6</sup> Per maggiori informazioni il lettore è rimandato al sito del NIST <http://www.nist.gov/>



**Figura 10. Dosimetri in polimetilmetacrilato “Red Perspex 4034” e “Gammacrome YR” con le loro bustine di poliaccoppiato in cui sono conservati. Sullo sfondo un portacampioni a quattro scomparti per la lettura allo spettrofotometro dei dosimetri e un calibro per la misura del loro spessore**

## **Abilitazione o convalida dell’impianto di irraggiamento**

Un impianto di irraggiamento per poter operare deve ottenere le necessarie autorizzazioni dalle autorità preposte. Queste autorizzazioni sono concesse se “l’impianto soddisfa le norme internazionali di buona tecnica per l’impiego delle apparecchiature di irradiazione utilizzate nel trattamento degli alimenti raccomandate dal Comitato congiunto FAO/OMS del *Codex Alimentarius* (1) e a qualsiasi disposizione supplementare eventualmente adottata secondo la procedura di cui all’articolo 12 della presente direttiva” così recita la direttiva 199/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio recepita nella legislazione italiana con il Decreto Legislativo 30 gennaio 2001, n. 94.

Il primo atto per la validazione di un impianto di irraggiamento, sia esso a raggi  $\gamma$  oppure con acceleratore di elettroni, consiste in una serie di misure della distribuzione della dose in tutto il volume di un materiale di riferimento<sup>7</sup> nel passaggio completo, assieme ad altri prodotti sul sistema convogliatore, attraverso il fascio di radiazioni. Queste misure ci mostreranno la distribuzione della dose su tutto il volume di materiale trattato unitamente alla posizione e ai valori di minimo e massimo della dose e devono essere ripetute un sufficiente numero di volte (es. 3-5) per stabilire così il rapporto tra la dose nominale, quella assorbita dal prodotto e i parametri operativi dell’impianto stesso.

Sia la dose sia la sua distribuzione dipendono dalle caratteristiche del prodotto (dimensioni e densità) e dai parametri della sorgente che sono diversi a seconda del tipo di irradiatore.

Nel caso di sorgenti  $\gamma$  i parametri comprendono il tipo di radioisotopo ( $^{60}\text{Co}$  oppure  $^{137}\text{Cs}$ ), l’attività della sorgente radioattiva (quanti Ci), la sua geometria (come sono disposte le matite radioattive nella rastrelliera), il percorso attorno alla sorgente, la velocità del convogliatore e il tempo di stazionamento nella zona di irraggiamento. Negli impianti con acceleratore la dose dipende invece dal tipo di radiazione (se fasci di elettroni o raggi X) e dai parametri della macchina come l’energia, la corrente del fascio, la frequenza degli impulsi nel caso di fasci

<sup>7</sup> Per materiale di riferimento si intende un materiale omogeneo di cui sono note le proprietà di assorbimento e di diffusione della radiazione. Esso è utilizzato per determinare la distribuzione della dose in tutto il volume, la potenzialità del trattamento, la sua riproducibilità e, nel caso degli acceleratori, l’uniformità di scansione del fascio.

impulsati, l'ampiezza e la frequenza di scansione e la velocità del convogliatore. Se si mantiene costante l'energia degli elettroni, la corrente del fascio e l'ampiezza di scansione, la dose è inversamente proporzionale alla velocità del convogliatore, oppure se si tiene costante la velocità del convogliatore, la dose è direttamente proporzionale alla corrente del fascio. I parametri fisici attraverso i quali è controllato il processo di irraggiamento, cioè la velocità del nastro convogliatore, il tempo del ciclo, la corrente e la geometria del fascio, ecc. devono essere registrati continuamente e, unitamente alla dosimetria, usati per documentazione e controllo di routine del processo.

Le misure dosimetriche fatte per ottenere l'autorizzazione dell'impianto devono essere ripetute a intervalli regolari, per esempio una volta all'anno e ogni qualvolta vengono apportati all'impianto cambiamenti o modifiche che possano influire sulla dose o sulla sua distribuzione nel prodotto, come ad esempio l'installazione di un nuovo sistema convogliatore o una ricarica della sorgente  $\gamma$ .

La dispersione del fascio di elettroni, per coprire tutta la superficie da trattare, ottenuta o per scansione del fascio mediante un campo magnetico oscillante o per mezzo di un sistema di sfocamento può produrre una distribuzione non omogenea di dose su un piano di riferimento perpendicolare al fascio se non vi è la giusta sovrapposizione degli impulsi. Per evitare ciò occorre che durata dell'impulso di elettroni, frequenza di ripetizione degli impulsi, dimensione del fascio, velocità del convogliatore, ampiezza di scansione o dispersione del fascio e frequenza di scansione siano ben coordinati tra di loro.

## Convalida del processo

Per la convalida del processo di irraggiamento occorre dimostrare che ciascun prodotto irraggiato in condizioni ben definite riceva una dose dentro limiti ben precisi. In linea di principio ciascun collo di prodotto dovrebbe essere omologato, tuttavia nel caso di più colli simili, contenenti cioè stesso tipo e stessa quantità di prodotto, l'intero carico può essere omologato come un tutt'uno.

La prima parte del processo di convalida è la mappatura della dose, cioè la sua distribuzione in tutto il volume trattato, per determinare sia il valore sia la posizione dei massimi e minimi di dose per un set di parametri operativi dell'impianto scelti arbitrariamente. Ciò può essere fatto mettendo dosimetri in tutto il volume di interesse di diverse unità da irraggiare, scegliendo uno schema di posizionamento che si ritenga avere la maggiore probabilità di individuare i punti di dose estrema e concentrando i dosimetri in queste aree, limitando il loro numero nelle zone con probabilità di ricevere dosi intermedie. Per prodotti omogenei, queste posizioni sono generalmente note dalle misure preliminari di omologazione dell'impianto e pertanto per questi specifici prodotti è sufficiente un numero relativamente limitato di misure. È importante sottolineare che ogni serie di misure di dose è valida soltanto per quel determinato tipo di prodotto e confezionamento e per quella specifica procedura di carico. Pertanto bisogna sempre accertarsi che sia il confezionamento sia la procedura di carico siano mantenuti tali anche per i successivi irraggiamenti. Determinato il valore minimo di dose e la sua posizione nel volume di prodotto irraggiato per un insieme di parametri operativi scelti arbitrariamente, questi parametri possono poi essere aggiustati in modo da assicurare che la dose minima nel prodotto sia sempre superiore alla dose minima richiesta per il trattamento. Dopodiché occorre garantire che ciò avvenga anche in condizioni di routine e questo è il secondo passo da farsi. A questo scopo è opportuno ripetere le misure nella posizione di minimo per un certo numero di colli di prodotto, da 3 a 5, per avere una statistica attendibile e stabilire l'indeterminazione, espressa in %, associata al valor medio di quelle misure in quella posizione. Poiché spesso la posizione del minimo non è facilmente accessibile, se è possibile stabilire un rapporto quantitativo tra il minimo di dose e la dose in una

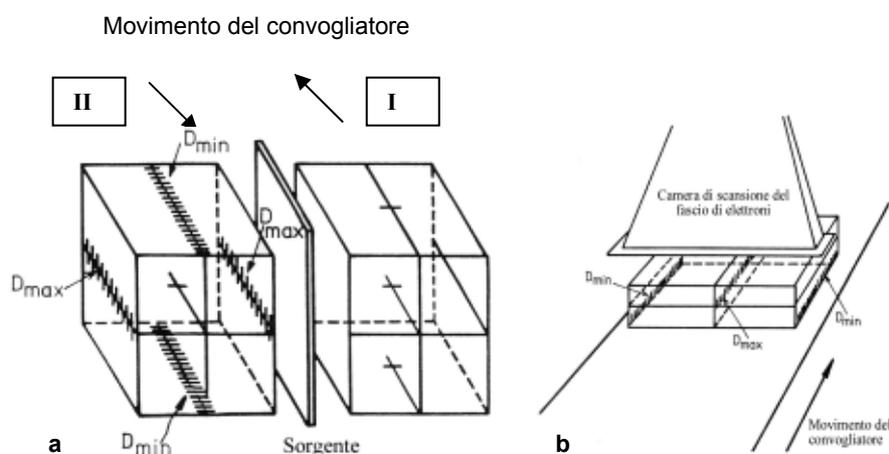
posizione di riferimento localizzata in un punto opportuno all'interno o sulla superficie del prodotto, è possibile utilizzare questo rapporto per misure di routine.

L'attività normale dell'impianto può aver inizio quando è stato dimostrato e verificato che tutto avviene nel rispetto dei limiti di dose prescritti dalla legge. La procedura di omologazione del processo deve essere ripetuta ogni volta che cambiano le caratteristiche dell'unità da trattare, quali il tipo di prodotto da irraggiare o l'assetto nel confezionamento oppure l'energia e/o l'ampiezza del fascio o la velocità del sistema convogliatore.

## Misure di distribuzione di dose

È già stato detto che è molto difficile, nella pratica, avere nei prodotti trattati la dose assorbita uniformemente distribuita per cui diventa accettabile una certa disomogeneità nella distribuzione di dose purché questa variazione sia contenuta entro i limiti posti dalle specifiche del processo che sono stabiliti per legge e che dipendono dalla dose minima necessaria a raggiungere l'effetto desiderato e dalla dose massima che il prodotto può sopportare mantenendo inalterata la sua funzionalità. Se la distribuzione teorica della dose nel prodotto può essere ottenuta con opportuni programmi di calcolo e può fornire una stima di questi estremi, sono però necessarie misure sperimentali per determinare e documentare i massimi e i minimi con adeguata precisione.

Le misure di distribuzione di dose in un qualsiasi prodotto, di riferimento o altro, sono fatte sistemando singoli dosimetri in vari punti all'interno del volume di prodotto in esame che viene irraggiato insieme ad altre confezioni di prodotti che possono essere anche prodotti fittizi.<sup>8</sup> La Figura 11 mostra le posizioni tipiche dei valori minimi e massimi di dose che si riscontrano in una confezione di prodotto omogeneo irraggiata con raggi  $\gamma$  (Figura 11a) e con elettroni (Figura 11b).



**Figura 11. Regioni di  $D_{max}$  e  $D_{min}$  indicate con tratteggio che si riscontrano in un contenitore rettangolare dopo due passaggi singoli attorno ad una sorgente  $\gamma$  a rastrelliera; dopo il primo passaggio il contenitore si sposta a sinistra senza ruotare e opera il secondo passaggio in modo che il lato del contenitore, che nel primo passaggio si trovava dalla parte opposta della sorgente, ora si trova vicino ad essa (a); posizione tipica dei minimi e massimi di dose (zone tratteggiate) che si riscontrano in una confezione rettangolare di prodotto omogeneo irraggiato con un fascio monodirezionale durante un passaggio singolo (b)**

<sup>8</sup> Per prodotto fittizio o fantoccio si intende una quantità di materiale avente proprietà di attenuazione e di diffusione della radiazione simili a quelle di un particolare prodotto o insieme di prodotti.

I dosimetri vanno sistemati su vari piani di una scatola riempita in modo omogeneo (Figura 12) e i valori di dose misurati possono essere riportati come curve di isodose (Figura 13), dove i punti di  $D_{\min}$  e  $D_{\max}$  possono essere individuati più accuratamente. I risultati di queste misure non possono però essere utilizzati per prodotti non omogenei o aventi forme irregolari. In questi casi è necessario eseguire specifiche e dettagliate mappature di dose su scatole campione di questi prodotti. Infine durante il regolare processo di irraggiamento le misurazioni dosimetriche di routine vanno effettuate in ciascuna partita e ad intervalli regolari durante l'operazione. La misurazione delle dosi va effettuata impiegando sistemi dosimetrici riconosciuti e deve essere riferita a standard primari.

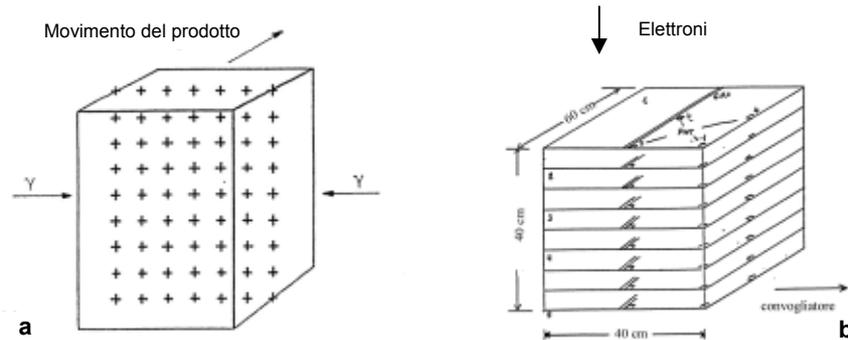


Figura 12. Schema per il posizionamento dei dosimetri per la misura della distribuzione di dose in un piano del prodotto nel caso di irraggiamento con raggi  $\gamma$  (a) e con elettroni (b)

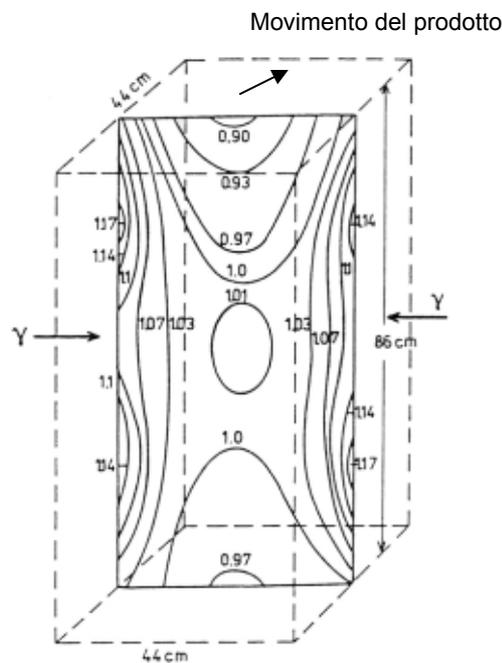


Figura 13. Curve di isodose in un piano orizzontale con i dosimetri sistemati secondo lo schema di Figura 11a. La leggera asimmetria delle curve può essere attribuita all'incertezza dei dosimetri, stimata  $\pm 10\%$  ( $1\sigma$ )

## Dose globale media assorbita

La dose globale media è espressa dal seguente integrale esteso al volume totale dei prodotti:

$$\bar{D} = \frac{1}{M} \int p(x, y, z) d(x, y, z) dV$$

dove: M = massa totale del campione trattato,  
 p = densità locale nel punto (x,y,z),  
 d = dose locale assorbita nel punto (x,y,z)  
 dV = dx dy dz elemento infinitesimo di volume che nei casi reali è costituito da frazioni di volume.

Per prodotti omogenei o per prodotti sfusi con densità globale omogenea, la dose globale media assorbita può essere determinata direttamente inserendo un numero adeguato di dosimetri in punti scelti a caso, ma oculatamente distribuiti in tutto il volume dei prodotti. Dalla distribuzione della dose così rilevata si può calcolare un valore medio che è la dose globale media assorbita. Se la forma della curva di distribuzione delle dosi all'interno del prodotto è ben costruita, si possono individuare i punti di dose massima e minima. Le misurazioni della distribuzione delle dosi in questi due punti, in una serie di campioni del prodotto, possono essere utilizzate per ottenere una stima della dose globale media. In alcuni casi la media dei valori della dose minima ( $\bar{D}_{\min}$ ) e massima ( $\bar{D}_{\max}$ ) rappresenta una buona stima della dose globale, cioè:

$$\text{dose globale media} \approx \frac{\bar{D}_{\max} + \bar{D}_{\min}}{2}$$

Il rapporto  $\bar{D}_{\max} / \bar{D}_{\min}$  non deve superare 3.

## Bibliografia

1. CAC (Codex Alimentarius Commission). *Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for the treatment of food*. Vol. 15. 1<sup>a</sup> ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization; 1984.
2. *Wholesomeness of irradiated food. Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee*. Geneva: World Health Organization; 1981. (WHO Technical Report Series, No. 659).
3. ISO/ASTM 51204. *Standard practice for dosimetry in gamma irradiation facilities for food processing*. Conshohocken, PA: ASTM International; 2002. (Annual Book of ASTM Standards 12.02).
4. ISO/ASTM 51431. *Standard practice for dosimetry in electron and bremsstrahlung irradiation facilities for food processing*. Conshohocken, PA: ASTM International; 2002. (Annual Book of ASTM Standards 12.02).
5. McLaughlin WL, et al. *Dosimetry for radiation processing*. London; New York: Taylor & Francis, 1989.
6. Diehl JF. *Safety of irradiated foods*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995.

# IDENTIFICAZIONE DEGLI ALIMENTI IRRADIATI

Concetta Boniglia

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Dall'inizio della sua applicazione ad oggi, in seguito alle formulazioni delle diverse organizzazioni internazionali, il trattamento degli alimenti con radiazioni ionizzanti ha coinvolto un numero sempre maggiore di Paesi e sempre più diverse tipologie alimentari.

Molte nazioni, oltre a richiedere le necessarie valutazioni sulla sicurezza d'uso degli alimenti irradiati, hanno posto come prerequisito per l'autorizzazione all'irraggiamento, la disponibilità di metodi atti a rilevare l'applicazione del trattamento stesso. Tali metodi devono offrire la possibilità di verificare inequivocabilmente se un alimento sia stato trattato o meno con radiazioni ionizzanti e devono poter essere applicati sull'alimento in fase di commercializzazione. L'identificazione degli alimenti irradiati deve permettere quindi una verifica *a posteriori* che si distingue nettamente dalle verifiche effettuate direttamente negli impianti di irraggiamento. In larga misura, infatti, la corretta applicazione delle dosi consentite si basa sull'ispezione dei registri dove vengono riportati i dati relativi alla dosimetria e sulla verifica dell'applicazione delle norme di buona tecnica per l'impiego delle apparecchiature di irradiazione.

I metodi di identificazione forniscono quindi l'unico mezzo per controllare la presenza sul mercato di alimenti trattati ma non opportunamente etichettati e di conseguenza per facilitare gli scambi internazionali e per favorire una maggiore accettazione da parte del consumatore. Il consumatore, oltre a dover essere informato sulle caratteristiche dell'alimento irradiato e delle differenze che intercorrono tra gli altri tipi di trattamento, deve poter avere la possibilità di scegliere un alimento in base alle informazioni riportate in etichetta. Le autorità governative devono per questo essere in grado di esercitare un effettivo controllo: chi sceglie un alimento irradiato deve essere sicuro che esso sia stato effettivamente disinfestato o decontaminato o al contrario che l'alimento, che non riporta in etichetta la dicitura "irradiato", non sia stato realmente trattato con radiazioni ionizzanti.

Tutto ciò ha portato ad un sempre maggiore interessamento per la ricerca di metodiche analitiche che rispondessero adeguatamente a tali richieste.

## Sviluppo dei metodi di identificazione

Il problema dell'identificazione dell'irraggiamento è stato per molti anni legato alla difficoltà di individuare composti che si producono nell'alimento esclusivamente a seguito dell'irraggiamento e che nello stesso tempo siano stabili nel tempo. Molte delle modificazioni e alterazioni prodotte dal trattamento radiante sono infatti simili a quelle prodotte da altri trattamenti: per esempio, sia le radiazioni ionizzanti che i processi di congelamento e scongelamento producono rotture nell'elica del DNA così come la perossidazione lipidica viene prodotta, anche se su scala diversa, sia per esposizione alle radiazioni che, a temperatura ambiente, per esposizione alla luce.

L'unico effetto specifico delle radiazioni sarebbe l'induzione di radioattività, ma fortunatamente i valori di specie isotopiche prodotte sono molto piccoli e comunque inferiori alla variabilità che si osserva nella radioattività naturale presente negli alimenti.

Solo in seguito ai notevoli sforzi di ricerca condotti a livello internazionale, che hanno portato al riconoscimento delle diverse modificazioni che vengono indotte nell'alimento irradiato, si è riusciti finalmente a sfatare il dogma che l'identificazione dell'irraggiamento fosse impossibile da attuare. Studi sono stati condotti su tutti i tipi di alterazioni, di natura sia chimica che fisica che biologica, indotte dalle radiazioni al fine di valutare le più idonee alla rilevazione del trattamento.

La ricerca sui metodi di identificazione degli alimenti irradiati è stata principalmente condotta da due programmi: l'ADMIT (*Analytical Detection Methods for the Irradiation Treatment of food*) a livello internazionale e il BCR (*Bureau Communautaire de Référence*) a livello comunitario (1, 2). Nell'ambito di tale attività sono stati organizzati meeting tra i diversi ricercatori coinvolti su singole tematiche, workshop per lo scambio di informazioni e la diffusione dei dati sperimentali. Sono stati inoltre finanziati *ring test* tra laboratori per quei metodi che per i quali era già disponibile un protocollo sperimentale e che si erano dimostrati più promettenti. Non è sorprendente che il maggior contributo sia stato apportato dai Paesi europei dove tra i consumatori, ancora oggi, il trattamento degli alimenti costituisce un motivo di preoccupazione e di vivace dibattito.

Nonostante i notevoli progressi raggiunti nello sviluppo dei metodi di identificazione i risultati hanno però mostrato che non esiste allo stato attuale un metodo generale applicabile a tutti i tipi di alimenti irradiati. Infatti, gli alimenti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti presentano uno spettro di caratteristiche chimico-fisiche estremamente ampio: da alimenti a basso contenuto di acqua, come le spezie e le erbe, ad alimenti ricchi di acqua come la frutta e la verdura ad altri ricchi di proteine e lipidi come le carni. Per questa ragione molti metodi sono stati studiati per singoli gruppi di alimenti sulla base del principio di "commonality and similarity" per il quale si presuppone che negli alimenti di simile costituzione le modificazioni indotte dalle radiazioni siano ugualmente simili.

## Metodi standardizzati

All'ulteriore sviluppo dell'applicazione delle metodologie atte a rilevare gli alimenti irradiati, ha contribuito l'attività dello *European Committee for Standardization* (Comitato Europeo di Normazione, CEN). Nel 1993, il CEN ha ricevuto il mandato di valutare i metodi che, in seguito a verifica mediante test interlaboratorio, avevano soddisfatto i necessari requisiti di validazione.

Il concetto della validazione viene ribadito anche nella Direttiva Comunitaria 1999/2/CE, recepita con il DL.vo 30 gennaio 2001 n. 94, dove nell'allegato VI (3) si fa riferimento a quei criteri generali di valutazione che devono essere soddisfatti da tutti i metodi, qualora essi debbano essere adottati nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti. Oltre ai ben noti criteri di ripetibilità, riproducibilità e accuratezza, i requisiti – per la corrispondenza dei quali si è trovata la maggiore difficoltà – sono (oltre alla già accennata specificità) la stabilità, la discriminazione, l'applicabilità, la robustezza e l'indipendenza.

Per quanto riguarda la *stabilità*, il metodo dovrebbe essere in grado di determinare parametri che rimangono stabili per tutto il periodo di conservazione dell'alimento.

Con il termine *discriminazione* si intende la capacità di un metodo di misurare quei parametri che sono presenti negli alimenti irradiati e assenti negli alimenti tal quali o alternativamente, se gli stessi parametri sono presenti in entrambi, essi dovrebbero essere ben

caratterizzati negli alimenti non irradiati e i cambiamenti indotti dalle radiazioni dovrebbero essere ben distinti e separati.

Il metodo inoltre dovrebbe essere *applicabile* nell'intero range di dosi con cui l'alimento testato è irradiato e le misure effettuate non dovrebbero essere influenzate da alcuni effetti quali la temperatura, l'O<sub>2</sub>, l'umidità, la miscelazione con altri ingredienti o in alternativa le risposte dovrebbero essere conosciute entro un certo grado di confidenza (*robustezza*).

Un altro requisito molto importante è rappresentato dall'*indipendenza*: il metodo non dovrebbe richiedere l'analisi contemporanea di campioni di alimenti non irradiati appartenenti allo stesso lotto esaminato. Oltre ai criteri tecnici sopra enunciati, che sono indispensabili per l'elaborazione di metodi affidabili, esistono tutta una serie di criteri cosiddetti pratici che invece non sono necessari ma desiderabili se un metodo deve essere applicato su larga scala per il controllo degli alimenti ed essere utilizzato per esempio come screening. Un metodo dovrebbe quindi essere semplice, cioè non richiedere una strumentazione sofisticata né alti livelli di abilità tecnica e di interpretazione dei risultati, rapido e dovrebbe avere bassi costi. Considerando inoltre la grande eterogeneità degli alimenti interessati, un metodo dovrebbe potersi applicare a qualsiasi alimento individuando una modifica specifica di un componente possibilmente ubiquitario in tutte le matrici considerate.

Nel corso degli ultimi dieci anni il CEN, in base ai dati sperimentali relativi ai metodi sottoposti a verifica dai diversi laboratori internazionali e alla valutazione della conformità ai diversi criteri di validazione, ha standardizzato un numero sufficiente di protocolli in grado di identificare un alimento irradiato. Un contributo alla ricerca in questo campo è stato fornito da ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità dei laboratori di Alimenti, Fisica e Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia attraverso la partecipazione ai progetti europei e internazionali del BCR e dell'ADMIT.

I metodi validati e standardizzati dal CEN possono essere suddivisi in base alle modificazioni radio-indotte sull'alimento in metodi chimici, fisici e biologici. I metodi standardizzati dal CEN possono essere consultati (o acquistati) presso l'Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

Con i metodi chimici sono stati inizialmente presi in considerazione tutti i principali costituenti degli alimenti quali le proteine, i lipidi e gli zuccheri. Lo studio delle modificazioni a carico dei grassi è quello che ha dato risultati più promettenti e ha portato all'emanazione di due protocolli EN 1784 e EN 1785 nei quali viene utilizzata la tecnica gas cromatografia (GC) nel primo, e la gas cromatografia associata alla massa (GC/MS) nel secondo. Entrambi i metodi sfruttano la rottura, provocata dalle radiazioni, degli acidi grassi legati ai trigliceridi in posizione  $\alpha$  e  $\beta$  con formazione di idrocarburi (EN 1784) e la rottura del legame dell'ossigeno acilico con formazione di 2-alcilciclobutanoni (EN 1785).

Dallo studio delle modificazioni di tipo fisico che si rilevano a carico di particolari alimenti – quali per esempio la viscosità, l'impedenza e le temperature di transizione – è possibile risalire all'eventuale irraggiamento ma necessitando di un confronto con l'alimento non irradiato tali metodiche sono risultate non sempre applicabili e soprattutto non facilmente standardizzabili. La ricerca di radicali liberi con metodiche fisiche come la risonanza di spin elettronico (*Electron Spin Resonance*, ESR), insieme alla termoluminescenza (*ThermoLuminescence*, TL) e la luminescenza fotostimolata (*Photo-Stimulated Luminescence*, PSL) si sono rivelate invece sin dall'inizio molto promettenti.

L'ESR, misurando il numero dei radicali liberi che si formano in seguito all'irraggiamento, può essere applicata solo a quegli alimenti con una matrice cristallina o ossea in cui i radicali liberi (specie molto reattive) hanno un tempo di vita superiore alla *shelf life* del prodotto irraggiato (EN 1786, EN 1787, EN 13708).

Gli alimenti che contengono minerali (silicati o carbonati) come costituenti o contaminanti possono essere testati con la termoluminescenza: i minerali esposti a radiazioni, infatti, immagazzinano energia che rilasciano sotto forma di luce di luminescenza quando sottoposti ad una opportuna stimolazione (EN 1788, EN 13751). Per la TL, comunque, è necessario ricorrere ad un secondo irraggiamento per la normalizzazione della risposta e ciò sicuramente rappresenta un fattore limitante.

Tra i metodi biologici la tecnica (EN 13783) di epifluorescenza su filtro accoppiata con la conta aerobica su piatto (*Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count, DEFT/APC*), attraverso il confronto dei risultati ottenuti con i due metodi, permette con un certo grado di confidenza di rilevare il trattamento radiante.

Il saggio della DNA Comet (DNA Comet Assay) sfrutta invece la frammentazione del DNA provocata dalle radiazioni che viene evidenziata mediante elettroforesi su gel: i frammenti del DNA migrano formando una striscia simile a quella di una cometa (EN 13784).

Nella Tabella 1 viene riportato l'elenco dei metodi standardizzati; alcuni di essi sono stati sottoposti al vaglio della *Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling (CCMAS)* e accettati come metodi Codex.

**Tabella1. Metodi per la rivelazione del trattamento con radiazioni ionizzanti standardizzati dal CEN**

Riferimenti	Tipologie alimentari	Metodi
EN 1784:1996 *	Pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaya e mango	Gasromatografia degli idrocarburi
EN 1785:1996 *	Pollo e maiale, uova	Gasromatografia/spettrometria di massa dei 2-alchilciclobutanoni
EN 1786:1996 *	Pollo, manzo, trote contenenti osso	Risonanza di spin elettronico dell'idrossiapatite
EN 1787:2000 *	Pistacchi, paprika, fragole	Risonanza di spin elettronico della cellulosa
EN 1788:2001 *	Erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali	Termoluminescenza
EN 13708:2001	Fichi, mango e papaya secchi, uvetta	Risonanza di spin elettronico degli zuccheri
EN 13783:2001	Erbe e spezie	Conta diretta su filtro in epifluorescenza/conta in piastra
EN 13784 :2001	Vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie	DNA Comet Assay
EN 13751:2002	Erbe, spezie, molluschi e crostacei	Luminescenza stimolata otticamente

\*Metodi accettati come metodi Codex

Allo stato attuale, come può essere evidenziato dalla Tabella 1, numerosi sono i metodi che possono essere applicati per il rilevamento del trattamento con radiazioni ionizzanti e numerose sono le matrici alimentari per le quali sono stati validati.

È comunque importante tenere presente che tra tutti questi metodi alcuni (il DNA Comet Assay, il DEFT/APC e la fotoluminescenza stimolata) possono essere utilizzati solo come *metodi di screening*. Per la conferma dell'avvenuto trattamento bisogna ricorrere alle tecniche di gas-cromatografia, alla termoluminescenza o alla risonanza di spin elettronico a seconda delle matrici che devono essere testate.

La maggior parte dei metodi di identificazione inoltre sono di tipo qualitativo. L'esigenza primaria di un metodo di identificazione infatti è quella di stabilire, in presenza di una norma

che autorizza il trattamento, se un alimento è stato sottoposto a radiazioni ionizzanti o no. Sarebbe naturalmente auspicabile disporre di metodi quantitativi per determinare anche la dose di radiazioni assorbite ma la possibilità di ottenere una curva dose-risposta affidabile attualmente è relegata solo ad alcune tecniche che prevedono comunque un secondo irraggiamento dell'alimento. Nel corso dello sviluppo dei metodi di identificazione, si è volutamente data più importanza alle metodiche qualitative per altri due ordini di motivi: l'irraggiamento è considerato un metodo che si auto-limita (alte dosi rendono inaccettabile dal punto di vista organolettico l'alimento mentre basse dosi non sono sufficienti ad ottenere l'effetto desiderato) e la corretta applicazione delle dosi consentite può essere demandata alla verifica delle buone pratiche di irraggiamento previste per gli impianti.

## Applicazioni e ulteriori sviluppi

La Direttiva 1999/2/CE, per una maggiore completezza della vigilanza in tale settore, stabilisce che ciascun stato membro debba effettuare controlli sia sugli impianti che sull'alimento in fase di commercializzazione e che la Commissione debba essere informata sui risultati ottenuti e sui metodi adottati nella fase di controllo. Negli ultimi anni la vigilanza condotta in Europa per il controllo degli alimenti irradiati ha mostrato una bassa incidenza (1,4%) di prodotti non correttamente etichettati: si tratta di campioni di erbe e di spezie o alimenti che li contengono e alcuni campioni di gamberi, cosce di rana e vegetali (4).

Nella Figura 1 vengono riportati i metodi maggiormente utilizzati nella Comunità Europea: la tipologia dei metodi applicati dipende naturalmente dalla tipologia di alimenti testati.

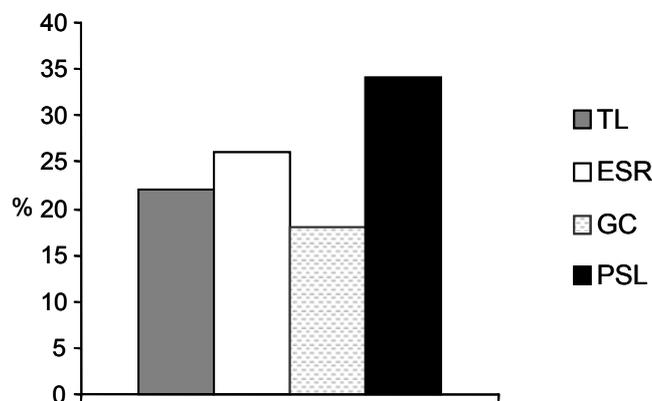


Figura 1. Metodi CEN utilizzati nella Comunità Europea per il controllo degli alimenti irradiati

Nella Figura 1 appare evidente che il metodo più utilizzato è rappresentato dalla fotoluminescenza stimolata: ciò dipende dal fatto che il metodo trova applicazione per l'analisi di erbe e spezie, nonché di molluschi e crostacei che rappresentano le categorie di alimenti maggiormente sottoposte al trattamento con radiazioni ionizzanti. Inoltre la PSL richiede una strumentazione non molto sofisticata, costi moderati e, nel caso delle erbe e delle spezie, la misura non richiede nessuna preparazione del campione cioè può essere effettuata sull'alimento

integro. Questi requisiti fanno sì che il metodo possa venire applicato con un certo grado di affidabilità come metodo di screening. Come *metodi di conferma* invece vengono utilizzati prevalentemente i metodi fisici quali l'ESR e la TL (che già da soli coprono una grande varietà di alimenti), seguiti dalla gas-cromatografia che viene invece utilizzata nel caso si debbano analizzare campioni di carne non contenenti ossa.

Nonostante i metodi attualmente disponibili siano in grado di rilevare il trattamento con radiazioni ionizzanti nella maggior parte degli alimenti, la Commissione continua ad incoraggiare lo sviluppo di nuove tecniche e di nuovi metodi che possano essere standardizzati. Alcuni metodi come ad esempio la determinazione della *o*-tirosina (5) che può essere utilizzata per gli alimenti ricchi di proteine, è oggetto di studio di numerosi laboratori; promettenti si sono dimostrate anche le tecniche immunochimiche che potrebbero portare a saggi di semplice attuazione (6).

Parallelamente allo sviluppo di nuove metodiche ulteriori sforzi si stanno effettuando per mettere a punto procedure atte a semplificare e/o perfezionare i metodi già esistenti. A tale riguardo sono state proposte per esempio procedure alternative di estrazione per quei metodi che si basano sulle modificazioni della matrice lipidica degli alimenti che, oltre ad offrire il vantaggio di una estrazione più selettiva, permettono un minore consumo di solventi organici (7). Tecniche cromatografiche accoppiate con la spettrometria di massa sono state inoltre utilizzate con successo per migliorare la selettività e la sensibilità dei metodi chimici. L'aumento della sensibilità permetterebbe di identificare prodotti irradiati a basse dosi o ingredienti irradiati presenti in piccole quantità in alimenti non irradiati. Una recente rassegna dei metodi di identificazione degli alimenti irradiati è riportata nella *review* di Delincè del 2002 (8).

Sicuramente la disponibilità di test multipli per l'identificazione del trattamento radiante è auspicabile sia per migliorare l'affidabilità dei risultati che per permettere una scelta più ampia ai laboratori deputati al controllo in base alle attrezzature e al personale disponibile.

## Conclusioni

Le ricerche compiute in questi ultimi anni hanno sicuramente raggiunto l'obiettivo fissato: rendere possibile il controllo degli alimenti irradiati attraverso l'applicazione di metodi affidabili, praticabili e standardizzabili.

L'unico limite degli attuali metodi riguarda la possibilità di rilevare esattamente la dose assorbita dagli alimenti per verificare la conformità alla normativa vigente che prevede finora il limite di 10 KGy. Inoltre per alcuni prodotti in cui solo una piccola parte degli ingredienti (erbe e spezie) sono stati irradiati esistono ancora problemi relativi ad una adeguata determinazione legata alla sensibilità dei metodi. È anche vero che lo sviluppo di metodi quantitativi e anche più sensibili non dovrebbe essere eccessivamente enfatizzata dal momento che l'irraggiamento degli alimenti è ritenuto un trattamento che non presenta alcun rischio per la salute qualora vengano osservate tutte le prescrizioni previste.

I metodi di identificazione degli alimenti irradiati attualmente disponibili, se affiancati ad altre procedure o sistemi di certificazione internazionalmente riconosciuti, possono essere quindi utili per facilitare gli scambi commerciali e per convalidare l'etichettatura necessaria per informare i consumatori e le aziende. Allo stato attuale è auspicabile che tutti gli stati membri, ciascuno attraverso le proprie autorità sanitarie competenti, implementino i metodi di identificazione al fini di espletare i controlli previsti dalla normativa vigente.

## Bibliografia

1. McMurray CH, Stewart EM Gray R., Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - Current status*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1996.
2. Raffi J, Delincèe H, Marchioni E, Hasselmann C, Sjoberg AM, Leopardi M, Kent M, Bogl KW, Schreiber G, Stevenson H, Meier W. *Concerted action of the Community Bureau of Reference on method of identification of irradiated food. Final Report. 1994*. Luxembourg: Commission of the European Communities; 1994. (EUR-15261).
3. Italia. DL.vo 30 gennaio 2001, n. 94 attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1999/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n. 79 del 4.4.2001.
4. Relazione della Commissione delle Comunità Europee relativa al trattamento mediante irradiazione degli alimenti nel periodo da settembre 2000 a dicembre 2001. Bruxelles, 9.10.2002 COM(2002) 549 definitivo. Disponibile all'indirizzo: [http://europa.eu.int/comm/food/resources/publications\\_eu.htm](http://europa.eu.int/comm/food/resources/publications_eu.htm); ultima consultazione 12 /10/04.
5. Krach C, Sontag G, Solar S. A simple chemical method for identification of irradiated industrial processed food. *Food Res Int* 1999;32:43-7.
6. Nolan M, Elliot CT, Pearce J, Stewart EM. Development of an ELISA for the detection of irradiated liquid whole egg. *Food Sci Technol Today* 1998;12:106-8.
7. Horvatovich P, Miesch M, Hasselmann C, Marchioni E. Supercritical fluid extraction of hydrocarbons and 2-alkyl cyclo butanones for the detection of irradiated food stuffs. *J Chromatogr A* 2000;897:259-68.
8. Delincèe H. Analytical methods to identify irradiated food- a review. *Radiation Physics Chemistry* 2002;63:455-8.

## METODI FISICI DI IDENTIFICAZIONE

Sandro Onori

Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

È consuetudine considerare fra i metodi fisici di identificazione quelli relativi alla rivelazione, tramite la tecnica ESR (*Electron Spin Resonance*, risonanza di spin elettronico), dei radicali liberi radioindotti e quelli legati alla misura della luce di luminescenza stimolata termicamente (termoluminescenza, TL) o stimolata otticamente (*Photo-Stimulated Luminescence*, PSL). Secondo questa classificazione, i metodi fisici costituiscono la maggior parte dei metodi CEN, poiché 5 metodi su un totale di 9 corrispondono a questa categoria. Tre sono relativi all'utilizzo della tecnica ESR:

- EN 1786:1996,
- EN 1787:2000,
- EN 13708:2001,

e due alla misura della luce di luminescenza:

- EN 1788:2001,
- EN 13751:2002.

Nel seguito i vari metodi verranno descritti raggruppandoli nelle due categorie: misura dei radicali liberi e misura della luce di luminescenza.

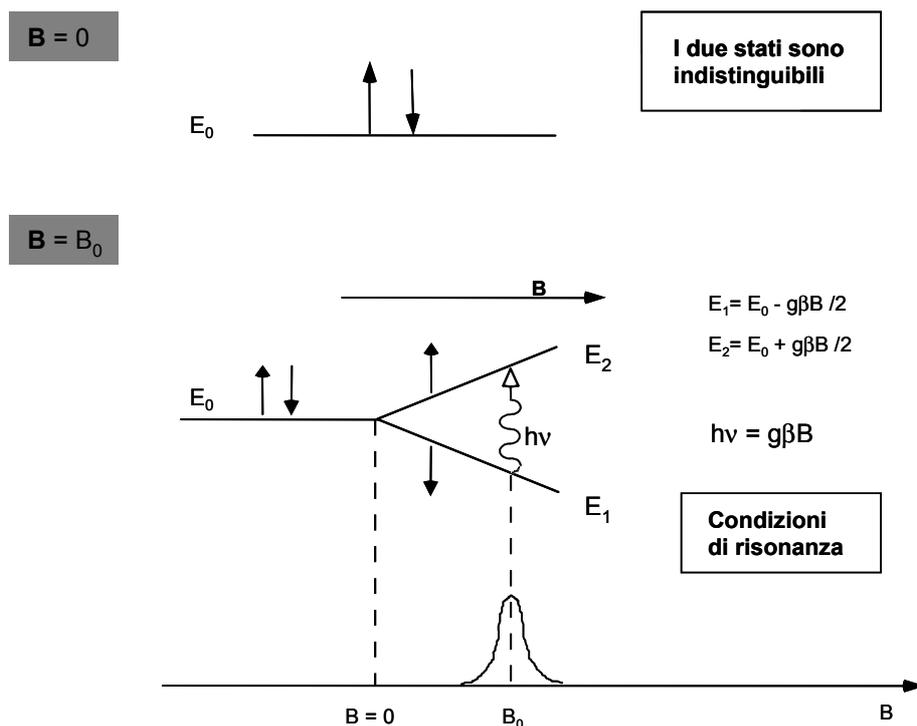
### Misura dei radicali liberi

L'effetto qualitativamente e quantitativamente più importante delle radiazioni ionizzanti è la produzione di radicali liberi. Se, per esempio, si confronta l'innalzamento ipotetico di temperatura provocato in un alimento in seguito ad irradiazione con una dose di 1 kGy (dell'ordine di 0,25 °C) con il numero di radicali prodotti con la stessa dose (tipicamente dell'ordine di  $10^{17}$ - $10^{18}$  radicali per kg di alimento) si comprende come la possibilità di misurare la presenza di radicali radioindotti abbia costituito da sempre l'obiettivo da perseguire per l'identificazione dei prodotti alimentari trattati con le radiazioni ionizzanti. Sfortunatamente, però, nella maggior parte dei casi la vita media dei radicali prodotti è brevissima, dell'ordine di  $10^{-12}$  s, a causa dell'elevato contenuto d'acqua presente negli alimenti. Ovviamente, in questi casi il metodo non può essere utilizzato.

Al contrario, nelle matrici cristalline, o comunque in matrici dove la diffusione è fortemente ridotta, quali osso, lische di pesce, frutta secca o parti legnose, i radicali prodotti rimangono sufficientemente stabili per tutta la *shelf life* del prodotto, rendendo possibile l'utilizzo della tecnica ESR per l'identificazione.

### Tecnica ESR

La tecnica di risonanza di spin elettronico (ESR) o, come viene più comunemente denominata, "risonanza paramagnetica elettronica" (*Electron Paramagnetic Resonance*, EPR), permette di rivelare la presenza di radicali liberi, cioè di molecole caratterizzate da un momento magnetico diverso da zero, generato dalla presenza di uno o più elettroni non accoppiati (1, 2). Il fenomeno fisico su cui si basa è quello dell'assorbimento risonante, schematizzato in Figura 1.



**Figura 1. Due elettroni con spin opposti, sono nello stesso livello energetico  $E_0$ . Un campo magnetico  $B$  rimuove la degenerazione e crea due livelli energetici  $E_1$  ed  $E_2$  separati della quantità  $g\beta B$ . Si hanno transizioni fra i due stati di spin tramite eccitazione con un'onda elettromagnetica di frequenza tale da soddisfare le condizioni di risonanza**

In una estrema semplificazione, supponiamo che gli elettroni non accoppiati non risentano dell'interazione elettromagnetica con il nucleo della molecola (interazione spin-nucleo) o dell'influenza reciproca fra i momenti magnetici di spin (interazione spin-spin), di avere, cioè, una popolazione di elettroni liberi. Il movimento di rotazione della carica elettronica produce un momento magnetico associato, o momento magnetico di spin,  $S$ , pari a  $+1/2$  o  $-1/2$ , a seconda del senso di rotazione dell'elettrone. L'energia magnetica, associata ad uno spin  $S$  in presenza di campo magnetico  $B$ , è data da:

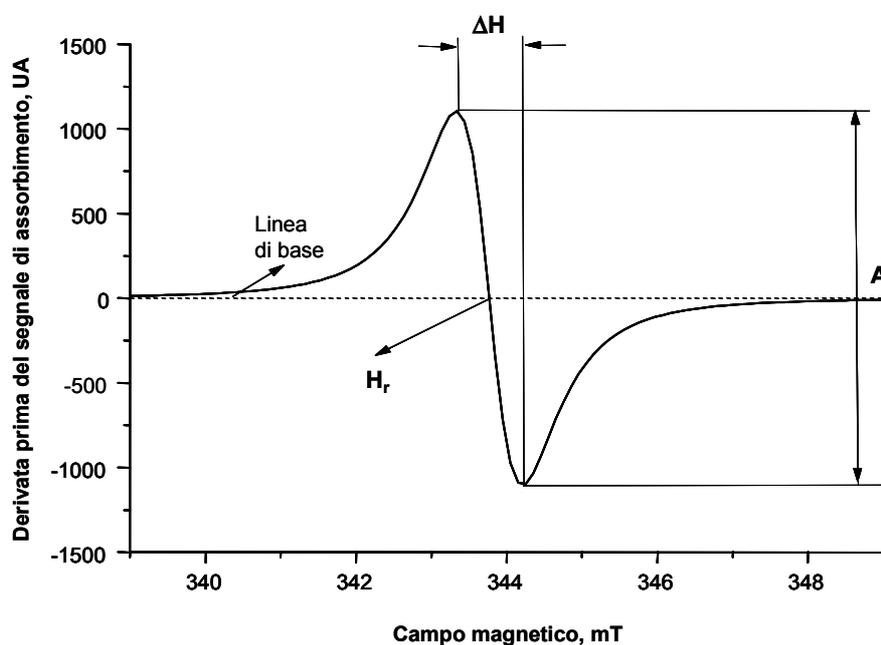
$$E = g\beta SB$$

dove "g" è un fattore (detto fattore di Landè) caratteristico dell'atomo e della molecola cui l'atomo appartiene (per l'elettrone libero  $g=2$ ) e  $\beta$  è il magnetone di Bohr.

In assenza di campo magnetico ( $B=0$ ), i due stati di spin sono indistinguibili, poiché ad essi è associata la stessa energia magnetica. Ma se la sostanza viene posta in presenza di un campo magnetico, a causa dell'interazione del momento magnetico di spin con il campo esterno, gli elettroni caratterizzati da spin  $+1/2$  saranno in un livello energetico  $E_1 = +1/2 g\beta B$ , mentre gli elettroni caratterizzati da spin  $-1/2$  saranno in un livello energetico  $E_2 = -1/2 g\beta B$ . In presenza di campo magnetico i due stati di spin diventano distinguibili e separati in energia della quantità  $g\beta B$ . In queste condizioni, è possibile far passare un elettrone dallo stato  $E_1$  allo stato  $E_2$ , o viceversa, fornendo al sistema l'energia necessaria, sotto forma di radiazione elettromagnetica di frequenza  $\nu$ , in modo tale che sia verificata la condizione di risonanza:

$$h\nu = g\beta B$$

La spettroscopia ESR rivela, quindi, le transizioni energetiche fra stati di spin elettronici attraverso l'assorbimento di energia di una radiazione elettromagnetica che genera uno spettro di assorbimento analogo a quello di qualunque altra forma di spettroscopia. Sfortunatamente, poichè a temperatura ambiente i due livelli energetici sono quasi ugualmente popolati, i segnali che si otterrebbero in questo modo sarebbero molto deboli, caratterizzati, cioè, da un rapporto segnale-rumore tale da rendere inapplicabile la tecnica. Per aumentare la sensibilità della tecnica, gli spettrometri ESR utilizzano una modulazione ad alta frequenza del campo magnetico applicato, e una rivelazione a sensibilità di fase che consente di rivelare solo quei segnali che sono in fase con un opportuno segnale di riferimento. In questo modo, a causa della drastica riduzione del rumore, si ottengono segnali di assorbimento caratterizzati da un rapporto segnale-rumore che è ordini di grandezza superiore. Comunque, a causa di questa particolare tecnica di rivelazione, detta a "sensibilità di fase", il segnale che si registra non avrà più la classica forma dei segnali di assorbimento (vedi Figura 1), ma sarà la derivata prima di questo, come mostrato in Figura 2.



**Figura 2. Come risultato di una misura ESR si ottiene la derivata prima del segnale di assorbimento, chiamata segnale ESR**

La derivata prima del segnale di assorbimento, generalmente indicata come segnale o spettro ESR (EPR), è caratterizzata dai seguenti parametri: ampiezza picco-picco,  $A$ , (cresce proporzionalmente alla concentrazione di radicali), campo di risonanza,  $H_r$ , larghezza di riga,  $\Delta H$ . Poichè i valori del campo magnetico e della frequenza di risonanza dipendono dalla quantità di campione e dal porta campione inserito nella cavità di misura, si preferisce valutare il loro rapporto, costituito dal fattore  $g$ , che è una caratteristica intrinseca di ogni specie radicalica. Ogni specie radicalica è caratterizzata, quindi, da uno spettro ESR unico, definito dalla sua larghezza di riga, forma e fattore  $g$ . Lo spettro mostrato in Figura 2 corrisponde al caso molto semplice di spin  $1/2$  senza interazione nucleare. Se queste condizioni non sono soddisfatte,

lo spettro mostra varie righe di assorbimento, in dipendenza della complessità del sistema in studio, caratteristiche di ciascuna specie radicalica.

È opportuno sottolineare un vantaggio della tecnica ESR rispetto ad altre metodiche di identificazione, consistente nella possibilità di misurare il campione in esame ripetutamente senza alterarne il contenuto informativo (lettura non distruttiva). Ciò è di particolare importanza, perchè permette una più approfondita analisi di situazioni dubbie e consente di ridurre la possibilità di errore nella misura.

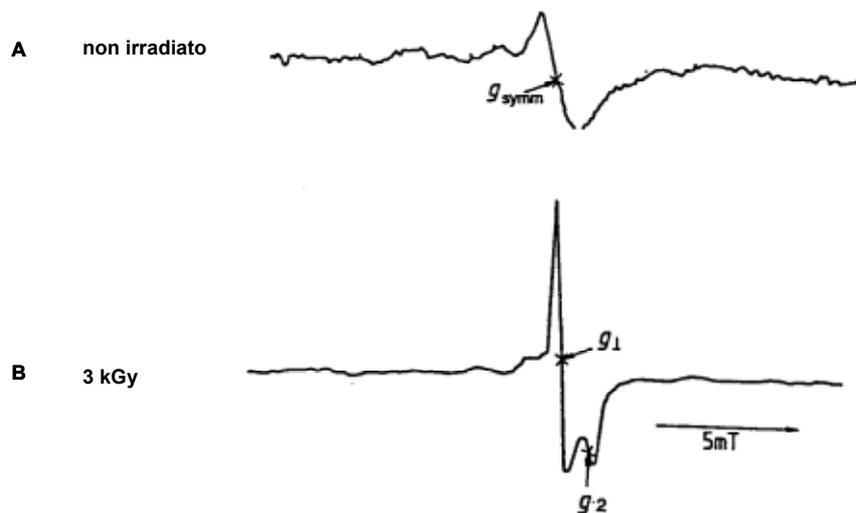
### Standard CEN: EN 1786:1996

#### **Detection of irradiated food containing bone. Method by ESR spectroscopy**

Questo standard europeo descrive un metodo per la identificazione di carni e pesci contenenti osso. Come detto precedentemente, le radiazioni ionizzanti producono radicali liberi che possono essere stabili in alimenti solidi o in componenti essiccate dell'alimento. È questo il caso dell'osso, dove i radicali radioindotti risultano stabili per anni, rendendo possibile una loro rivelazione per tutta la *shelf life* dell'alimento in cui l'osso è contenuto. Nel caso del tessuto osseo la radiazione induce un radicale nella matrice inorganica (idrossiapatite) la cui concentrazione cresce linearmente con la dose; questo radicale è invece assente nei campioni non trattati.

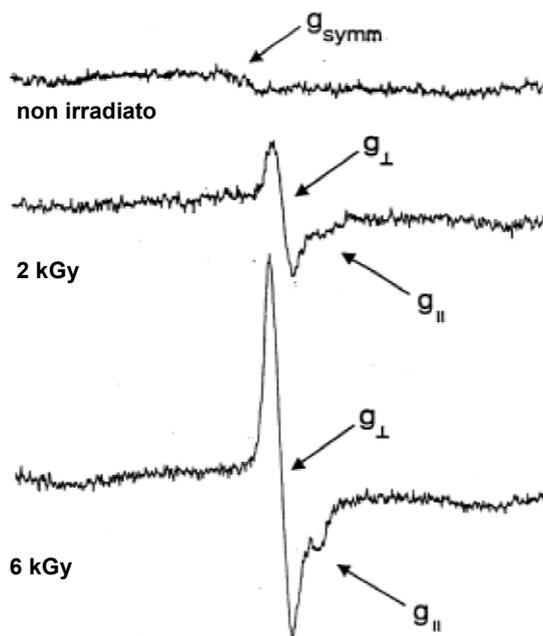
La misura va effettuata su un frammento di osso al quale sia stato tolto ogni residuo di polpa e, possibilmente, anche il midollo (per i dettagli sulla procedura di preparazione del campione e dei parametri da utilizzare per una corretta misura ESR si rimanda allo Standard CEN). In Figura 3 è mostrato, a titolo di esempio, lo spettro ESR ottenuto da un frammento di osso proveniente da una coscia di pollo.

Lo spettro a) si riferisce al campione non irradiato; si può notare la presenza di un debole segnale ESR ( $g=2,005$ ) simmetrico dovuto alla parte organica dell'osso. Nel caso del campione irradiato a 3 kGy, è presente un intenso segnale (spettro b), dovuto ai radicali generati dalla radiazione nell'idrossiapatite che maschera totalmente il segnale inizialmente presente. Il segnale è asimmetrico e caratterizzato dai valori  $g_1=2,002$  e  $g_2=1,998$  per il fattore  $g$ .



**Figura 3. Spettri ESR dell'osso di una coscia di pollo non irradiato (spettro A, campo centrale 350 mT  $\pm$  10 mT, Gain  $3,2 \times 10^5$ ) e irradiato con una dose di 3 kGy (spettro B, campo centrale 350 mT  $\pm$  10 mT, Gain  $1,0 \times 10^5$ ). (Estratto autorizzato della norma UNI EN 1786 © UNI, Milano)**

La Figura 4 mostra un esempio relativo a lische di trota. Anche in questo caso è presente un debole segnale simmetrico per il campione non irradiato, mentre si nota la presenza del segnale di idrossiapatite nel caso del campione irradiato, anche se di intensità inferiore a quello normalmente registrato nel caso del pollo.



**Figura 4. Spettri ESR di lische di trota non irradiate (spettro in alto), irradiate a 2 kGy (spettro intermedio) e a 6 kGy (spettro in basso)**

Riassumendo, si possono avere due possibili spettri:

- a) segnale simmetrico con  $g=2,005$   
in questo caso il campione è giudicato come non irradiato;
- b) segnale asimmetrico con  $g_1=2,002$  e  $g_2=1,998$   
in questo caso il campione è giudicato irradiato.

Sebbene il metodo sia altamente affidabile, è bene notare che l'intensità del segnale ESR può variare fortemente da campione a campione, poiché la concentrazione dei radicali radiondoti e la loro stabilità dipende dal grado di mineralizzazione e cristallinità dell'idrossiapatite nel campione. È anche importante sottolineare che il metodo è applicabile anche a campioni cotti o congelati.

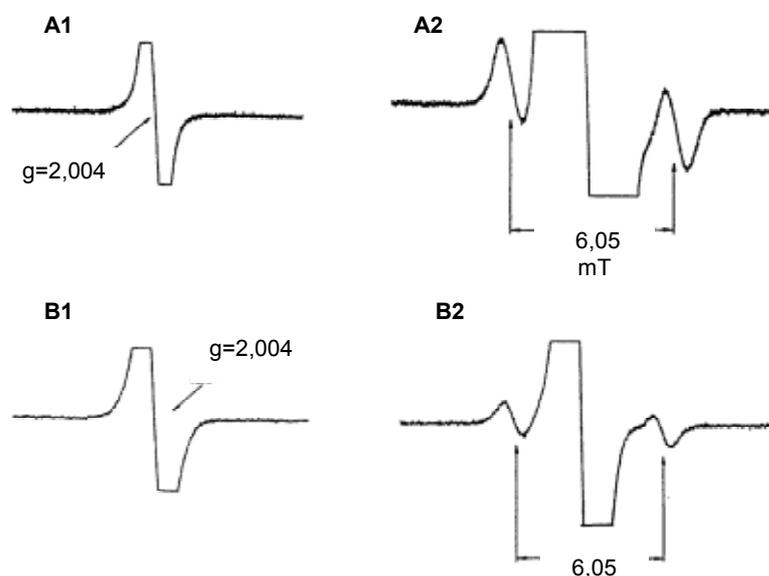
Il metodo è stato validato tramite test ciechi condotti, a livello internazionale, dal *Community Bureau of Reference (Bureau Communautaire de Référence, BCR)* su manzo e trote, cui hanno partecipato 21 laboratori (tra cui l'Istituto Superiore di Sanità), e dal *German Federal Health Office* su pollo e trote, cui hanno partecipato 18 laboratori. Sebbene il metodo sia stato al momento validato per un numero ristretto di alimenti (manzo, pollo e trote), vi è una estesa evidenza sperimentale della sua applicabilità anche, per esempio, a anatra, rana, oca, lepore, agnello, tacchino, e maiale, per quanto riguarda le carni, e a anguilla, merlano, sardina, pesce martello, halibut, aringa, merluzzo, salmone, sgombro e carpa, per quanto riguarda i pesci. In alcuni casi, è anche possibile l'identificazione di carne macinata, se da essa si può estrarre tessuto osseo.

**Standard CEN: EN 1787:2000****Detection of irradiated food containing cellulose by ESR spectroscopy**

Alcuni alimenti, o parti di essi, quali la parte legnosa di alcuni frutti (ad esempio pistacchi, noci di cocco, mandorle o fragole, lamponi, mirtilli) o spezie (paprica) contengono cellulosa. Il metodo si basa sulla misura, con tecnica ESR, dei radicali liberi stabili radiondoti nella cellulosa.

La misura va effettuata sulle spezie come tali (meglio se essiccate), sugli acheni di fragole o simili (questi vanno opportunamente estratti e preparati secondo la procedura descritta nello Standard CEN) o su frammenti del guscio di pistacchi o simili (per i dettagli sulla procedura di preparazione del campione e dei parametri da utilizzare per una corretta misura ESR si rimanda allo Standard CEN).

Diversamente da quanto descritto a proposito dell'identificazione di alimenti contenenti osso, in questo caso l'identificazione è resa più problematica, a causa della sovrapposizione di più segnali nello spettro ESR. La Figura 5 mostra due esempi, uno relativo a pistacchio (spettri A1 e A2) e l'altro relativo a fragole (spettri B1 e B2).



**Figura 5. Esempi di spettri ESR di alimenti contenenti cellulosa: pistacchi e fragole. A1: pistacchio non irradiato; A2: pistacchio irradiato a 4 kGy; B1: fragole non irradiate; B2: fragole irradiate a 3,5 kGy. (Estratto autorizzato della norma UNI EN 1787 © UNI, Milano)**

In entrambi i casi è presente nei campioni non irradiati (spettri a sinistra) un segnale intenso e simmetrico. Nei campioni irradiati (spettri a destra) si nota, oltre ad un aumento del segnale originariamente presente, anche la comparsa di due righe di risonanza, alla sinistra e alla destra del segnale principale. Queste righe appartengono alla cellulosa e devono essere spaziate di 6,05 mT. La presenza, nello spettro ESR delle due righe della cellulosa è indice di un alimento irradiato. La difficoltà nell'identificazione risiede nel fatto che queste due righe non sono molto intense, anche in un caso "ottimale", e che l'intensità e stabilità del segnale ESR è fortemente influenzato dalla quantità di cellulosa e umidità del campione in esame. In queste condizioni "sfavorevoli", l'intensità del segnale spesso si confonde con il rumore. Ne segue che, mentre la presenza delle righe è indice di trattamento, la loro assenza non può essere considerata evidenza

di un campione non irradiato. Il problema principale è comunque relativo all'umidità. La stabilità dei radicali dipende dalle condizioni di conservazione e l'identificazione è generalmente possibile entro un anno per i pistacchi e un massimo di tre settimane per le fragole; nel caso della paprica la stabilità potrebbe essere inferiore alla *shelf life*.

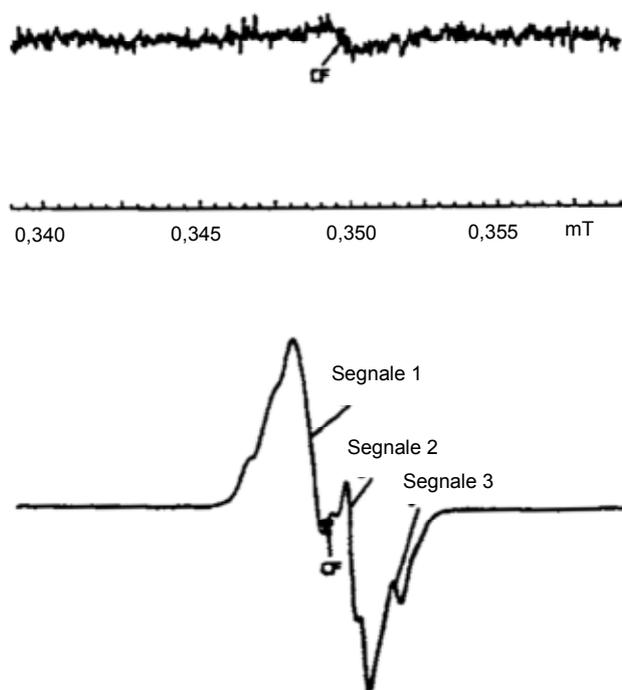
Il metodo è stato validato tramite test ciechi condotti, a livello internazionale, dal BCR su pistacchi, cui hanno partecipato 21 laboratori (tra cui l'Istituto Superiore di Sanità), dal German Federal Health Office su paprica, cui hanno partecipato 20 laboratori e dal German Federal Institute for Health protection of Consumers and Veterinary Medicine su fragole. Sebbene il metodo sia stato al momento validato per un numero ristretto di alimenti (pistacchi, paprica e fragole), vi è una estesa evidenza sperimentale della sua applicabilità anche, per esempio, a lamponi, mirtili, prugne, noci di cocco, mandorle e noci.

### Standard CEN: EN 13708:2001

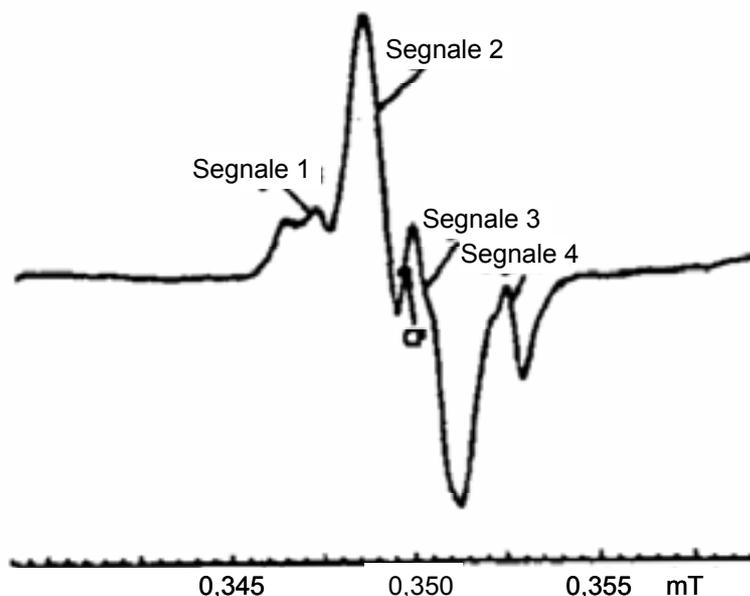
#### **Detection of irradiated food containing crystalline sugar by ESR spectroscopy**

Il metodo si basa sulla misura, con tecnica ESR, dei radicali liberi stabili radiondotti nello zucchero cristallino contenuto nella frutta secca, come fichi, uvetta, mango o simili.

La misura va effettuata su una porzione di alimento opportunamente essiccato (per i dettagli sulla procedura di preparazione del campione e dei parametri da utilizzare per una corretta misura ESR si rimanda allo Standard CEN). Le Figure 6 e 7 mostrano un esempio di spettri ESR ottenuti, rispettivamente, nel caso di mango e fichi secchi. In entrambi i casi, lo spettro del campione non irradiato non presenta alcun segnale, o se presente di debole intensità.



**Figura 6. Tipico spettro ESR di un alimento contenente zucchero: mango secco nel caso specifico. Lo spettro in alto è relativo a mango secco non irradiato; lo spettro in basso è relativo a mango secco irradiato a 3 kGy. (Estratto autorizzato della norma UNI EN 13708 © UNI, Milano)**



**Figura 7. Tipico spettro ESR di un alimento contenente zucchero: fichi secchi nel caso specifico. Lo spettro in alto è relativo a fichi secchi non irradiati; lo spettro in basso è relativo a fichi secchi irradiati a 3 kGy. (Estratto autorizzato della norma UNI EN 13708 © UNI, Milano)**

Dopo trattamento con radiazioni ionizzanti, si nota la presenza di un segnale complesso, costituito dalla sovrapposizione di numerose righe, dovuto ai radicali radioindotti nello zucchero cristallino. Sfortunatamente, lo spettro che si registra può variare da campione a campione, anche se preparati dallo stesso tipo di alimento, e per lo stesso campione nell'ambito di misure ripetute. La variabilità fra diversi campioni può essere dovuta alla presenza di differenti mono- e disaccaridi e alla loro diversa percentuale nei diversi campioni. La variabilità nell'ambito dello stesso campione, in genere di piccola entità, è dovuta alla anisotropia dei segnali ESR. Poiché nell'alimento è contenuto zucchero in forma cristallina, la diversa orientazione dei microcristalli nella cavità di misura può dar luogo a variazioni fra le intensità relative delle varie componenti spettrali nello spettro ESR e, quindi, ad una diversa forma dello spettro.

Quanto descritto non costituisce, però, una reale limitazione al metodo, perchè, in ogni caso, la presenza di un segnale a molte componenti (con un valore centrale di  $g$  pari a 2,0035 e ampiezza totale dello spettro fra 7,4 e 7,8 mT per mango e papaia secchi; con un valore centrale di  $g$  pari a 2,0035 e ampiezza totale dello spettro fra 8,7 e 9,1 mT per fichi secchi e uvetta) è facilmente rivelabile ed è indice del trattamento con radiazioni ionizzanti. Tuttavia l'applicabilità del metodo dipende dalla presenza di una quantità sufficiente di zucchero cristallino e dal contenuto di acqua presente. Come nel caso degli alimenti contenenti cellulosa, la presenza del segnale a molte componenti è indice di trattamento, mentre la sua assenza non può essere considerata evidenza di un campione non irradiato.

Il metodo è stato validato tramite test ciechi condotti, a livello internazionale, dal BCR su uvetta e papaia secca, cui hanno partecipato 21 laboratori (tra cui l'Istituto Superiore di Sanità), dal *German Federal Institute for Health protection of Consumers and Veterinary Medicine* su fichi e mango secchi, cui hanno partecipato 17 laboratori.

Riassumendo quanto precedentemente esposto, i metodi di identificazione basati sulla tecnica ESR sono stati validati per:

- manzo, pollo, trote contenenti osso;
- pistacchi, paprica, fragole;
- fichi secchi, mango secchi, uvetta, papaia secca.

Vi è una vasta evidenza che il metodo può essere applicato anche per l'identificazione di:

- anatra, rana, oca, agnello, tacchino, maiale;
- anguilla, merlano, sardina, pesce martello, halibut, aringa, merluzzo, salmone, sgombro, carpa;
- lamponi, mirtilli;
- prugne, noci di cocco, mandorle, noci.

In attesa che la validazione del metodo ESR venga esteso ad una più vasta tipologia di alimenti, al momento in Italia è utilizzabile solo per quegli alimenti per il quale è stato validato.

## Misura della luce di luminescenza

I metodi di identificazione basati sulla misura della luce di luminescenza sono fra quelli più comunemente usati, in particolar modo come screening.

Con riferimento alla Figura 8, si possono immaginare gli elettroni di un solido isolante nello stato fondamentale come appartenenti alla banda di valenza, essi sono cioè legati all'atomo o alla molecola di appartenenza. L'effetto della radiazione ionizzante è quello di strappare alcuni di questi elettroni dalla banda di valenza a quella di conduzione, fornendo loro l'energia necessaria per questa transizione. Da questo stato ad energia più elevata, gli elettroni tendono spontaneamente a ritornare nello stato fondamentale (banda di valenza). Però in un solido sono sempre presenti difetti strutturali od impurezze che generano livelli energetici intermedi nella gap fra la banda di valenza e quella di conduzione. In un solido sono sempre presenti difetti strutturali od impurezze che generano livelli energetici intermedi nella gap fra la banda di valenza e quella di conduzione.

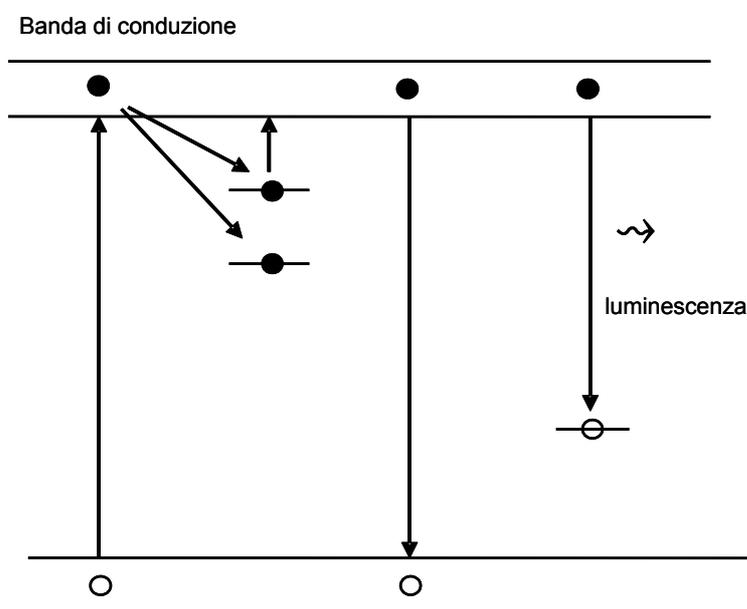


Figura 8. Schema dei livelli energetici di un isolante che illustra il meccanismo dell'emissione di luce di luminescenza

Questi livelli si chiamano “superficiali” o “profondi”, a seconda che si trovino, rispettivamente, in prossimità della banda di conduzione o di valenza. Gli elettroni, nel transitare dalla banda di conduzione a quella di valenza, possono venire intrappolati nei livelli energetici intermedi, e lì rimanere in uno stato metastabile. Questo nome deriva dal fatto che questi stati non sono propriamente stabili e che ad esempio, la semplice agitazione termica può fornire l’energia sufficiente ad un elettrone, che si trovi in un livello superficiale, per tornare nella banda di conduzione, svuotando in tal modo la trappola.

Gli elettroni tornano nello stato fondamentale (banda di valenza) o in trappole in cui esistono siti attivi riemettendo l’energia di eccitazione immagazzinata sotto forma di luce, e in ciò consiste il fenomeno della luminescenza. Gli elettroni possono essere rimossi dalle trappole fornendo ad essi energia in modo opportuno.

Quando l’energia viene fornita scaldando il campione (energia termica) si parla di termoluminescenza (TL) (3), mentre se l’energia viene fornita illuminando il campione con luce di frequenza opportuna, si parla di luminescenza otticamente stimolata (OSL, *Optically Stimulated Luminescence*) (4, 5) o, in modo equivalente, di luminescenza foto-stimolata (PSL, *Photo-Stimulated Luminescence*).

## Termoluminescenza

Nel caso della TL, il campione viene progressivamente riscaldato (generalmente in un intervallo fra 50°C e 400°C) e si misura la luce di termoluminescenza tramite un fototubo. La curva che si ottiene è detta *glow-curve* ed è caratterizzata dalla sovrapposizione di più curve di emissione, tante quanti sono i livelli energetici metastabili coinvolti nel processo. All’aumentare della temperatura, prima vengono svuotati i livelli superficiali e poi, in sequenza, i livelli più profondi. Un esempio di *glow-curve* è mostrato in Figura 9, spettro di sinistra.

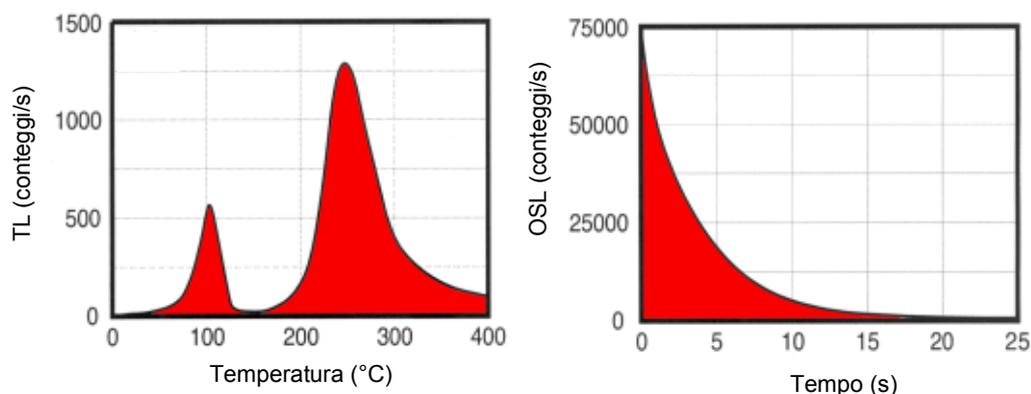


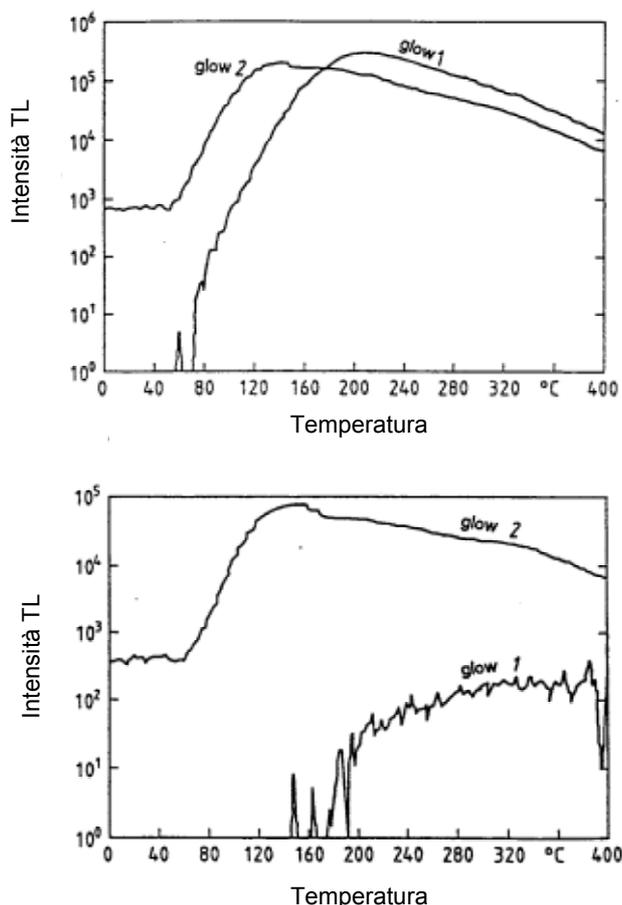
Figura 9. Misura della luce di luminescenza in una misura TL (a sinistra) e in una OSL (a destra)

### Standard CEN: EN 1788:2001

#### ***Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated***

Il metodo si basa sulla misura della luce di termoluminescenza del particolato a base di silicati presente nell’alimento come contaminante. I silicati vengono isolati dall’alimento,

principalmente tramite tecniche di separazione per densità, e posizionati su dischetti di acciaio inossidabile per la misura TL (per i dettagli sulla procedura di preparazione del campione e dei parametri da utilizzare per una corretta misura TL si rimanda allo Standard CEN). È importante che il particolato estratto sia il più possibile privo di parti organiche, per non oscurare il segnale TL da questo generato. Si registra, quindi, una prima *glow-curve* del particolato e se ne calcola l'intensità integrata (glow1) su un prestabilito intervallo di temperatura.



**Figura 10. Tipico esempio di *glow-curve* per un campione irradiato (in alto) e uno non irradiato (in basso). (Estratto autorizzato della norma UNI EN 1788 © UNI, Milano)**

Un campione irradiato presenta una *glow-curve* di intensità integrata molto superiore a quella di un campione dello stesso lotto non irradiato, come è mostrato, a titolo di esempio, in Figura 10 (la presenza di un segnale TL in un alimento non irradiato è dovuta alla radiazione del fondo naturale). Sfortunatamente, però, nella pratica non si ha a disposizione un campione di controllo. A causa della forte variabilità nell'intensità della *glow-curve*, dovuta alla diversa quantità e qualità (il particolato può essere formato da silicati di varia natura) del particolato estratto, non è in generale possibile identificare senza ambiguità un alimento come irradiato dalla sola misura di glow1. Per una corretta identificazione, è necessario avere una stima della sensibilità alle radiazioni ionizzanti del campione in esame. Questo viene effettuato irradiando il particolato estratto, dopo la prima lettura TL, ad una dose nota. Quindi, si registra una seconda

*glow-curve* e se ne misura l'intensità integrata (*glow2*). La Figura 10 mostra come *glow1* e *glow2* siano molto simili nel caso di un alimento irradiato, mentre *glow2* risulta molto maggiore di *glow1* nel caso di un alimento non irradiato. La prima indicazione per una identificazione di un alimento viene fornita dal valore del rapporto *glow1*/*glow2*, secondo il seguente criterio:

$\text{glow1}/\text{glow2} > 0,1 \rightarrow$  indica un campione irradiato  
 $< 0,1 \rightarrow$  indica un campione non irradiato

In aggiunta a questa prima valutazione, l'analisi della forma della *glow-curve* consente di avere una corretta identificazione. Infatti, vi è una differenza importante fra la *glow-curve* del particolato estratto da un alimento non irradiato e quella del particolato estratto da un alimento trattato con radiazioni. Nel primo caso il particolato ha subito unicamente l'effetto della radiazione di fondo nel corso di millenni prima di essere parte dell'alimento come impurezza. Le trappole più superficiali, per effetto dell'agitazione termica si sono svuotate, e la *glow-curve* avrà solo componenti ad alta temperatura, corrispondenti alle trappole profonde ancora piene. Invece, nel caso di un alimento trattato con radiazioni, l'identificazione avviene in un tempo inferiore alla *shelf life* del prodotto, in un tempo, cioè, infinitamente più breve di quello geologico. In questo caso, nella *glow-curve* saranno presenti anche le componenti a bassa temperatura, che rappresentano un'indicazione dell'avvenuto trattamento. Quanto descritto è ben visibile in Figura 10.

Il metodo è, in linea di principio, applicabile a tutti gli alimenti dai quali sia possibile estrarre del particolato. Tuttavia esso è stato validato, sulla base di numerosi trials internazionali, solo per: erbe, spezie e loro miscele, molluschi, crostacei, frutta e verdure fresche e deidratate, patate.

In conclusione, la tecnica TL ha una potenzialità molto ampia, in quanto la tecnica è diffusa (la TL costituisce una delle tecniche di dosimetria più usate in campo ambientale e medico), la strumentazione è di costo contenuto, e può essere applicata ad una numerosa varietà di tipologie alimentari. Tuttavia, la necessità di valutare la radiosensibilità individuale dei campioni, se da un lato rende la tecnica praticamente utilizzabile, ne costituisce d'altro canto lo svantaggio principale poiché, in generale, i laboratori di analisi non dispongono di sorgenti radioattive adeguate e, in ogni caso, non è auspicabile una proliferazione di tali sorgenti sul territorio. Una soluzione di compromesso, potrebbe essere di utilizzare questa tecnica solo presso quei laboratori regionali dove già sono presenti sorgenti ad alto rateo di dose, necessarie per effettuare questo tipo di analisi, a cui dovrebbero fare riferimento le regioni che ne sono sprovviste.

## **Luminescenza otticamente stimolata**

Nel caso della OSL, tutti i livelli metastabili vengono eccitati contemporaneamente e decadono verso lo stato fondamentale con emissione di luce la cui intensità decade nel tempo (a destra in Figura 9).

### **Standard CEN: EN 13751:2002**

#### ***Detection of irradiated food using photostimulated luminescence***

In molti alimenti è presente particolato minerale in forma di silicati o di materiali bioinorganici, quali la calcite, che deriva dai gusci dei molluschi e crostacei o dall'esoscheletro, e l'idrossiapatite, che deriva da ossi o denti. Questi materiali sono luminescenti e, se precedentemente irradiati, emettono luce in seguito ad eccitazione ottica (PSL). È questo il principio su cui si basa il metodo CEN, che può avere una doppia valenza: di screening e di

identificazione. Se usato come screening, è sufficiente una sola misura PSL, sulla base della quale è possibile distinguere fra alimenti non trattati e alimenti che probabilmente lo sono stati. In questo secondo caso, è necessario applicare uno dei metodi precedentemente descritti per una corretta identificazione. Una seconda misura PSL, dopo irradiazione dell'alimento ad una dose nota, consente di determinare (come nel caso TL) la sensibilità individuale del campione. Come nel caso della TL, un confronto fra la seconda e la prima misura PSL (PSL2 e PSL1, rispettivamente) consente di identificare un alimento irradiato.

La misura PSL viene effettuata, in generale, su una porzione di campione tal quale, senza necessità di alcuna estrazione (per i dettagli sulla preparazione del campione e sulle condizioni di misura si rimanda allo standard CEN). È questo un grosso vantaggio rispetto ad altre tecniche, in particolare rispetto alla TL dove l'estrazione del particolato costituisce una fase cruciale del metodo. L'unica accortezza riguarda la necessità di selezionare una porzione di alimento non esposta alla luce. La strumentazione necessaria non è eccessivamente costosa e la misura semplice da eseguire. Ciò che si misura è l'intensità dell'emissione luminosa, in termini di conteggi per unità di tempo. Il numero di conteggi misurato in un tempo di 60 s viene confrontato con due valori di soglia,  $T_1$  (soglia inferiore) e  $T_2$  (soglia superiore). La maggior parte degli alimenti irradiati presenta un segnale PSL1 molto superiore alla soglia  $T_2$  (screening positivo): il campione deve essere analizzato con uno dei metodi di identificazione CEN per una corretta classificazione. Segnali inferiori alla soglia inferiore  $T_1$  (screening negativo) suggeriscono un alimento non trattato (non è possibile però escludere che il campione abbia una scarsa sensibilità): in questi casi l'alimento viene classificato come non irradiato. Nei casi intermedi (screening intermedio) è necessario utilizzare un ulteriore metodo di indagine.

Come accennato precedentemente, la PSL può essere utilizzata anche per una corretta identificazione tramite una seconda misura, dopo irradiazione dell'alimento ad una dose nota (PSL2). Tuttavia, il metodo presenta delle forti limitazioni quando si è in presenza di campioni con bassa sensibilità che può dar luogo a falsi negativi. La presenza di sale genera un segnale PSL che potrebbe mascherare i segnali provenienti dagli ingredienti trattati. Sulla base di queste limitazioni, e considerando la necessità di avere un'ideale sorgente di radiazioni ionizzanti per poter applicare la PSL come metodo di identificazione, si è assistito, almeno a livello europeo, ad un largo uso di questa tecnica come metodo di screening (anche se non si possono escludere falsi negativi).

Il metodo è stato validato sulla base di trial internazionali organizzati dal Scottish Universities Research and Reactor Center per molluschi, crostacei, erbe, spezie e condimenti.

## Bibliografia

1. Eaton GR, Eaton SS, Salikhov KM. *Foundations of modern EPR*. Singapore: World Scientific; 1998.
2. Ikeya M. *New applications of electron spin resonance – Dating, dosimetry and microscopy*. Singapore: World Scientific; 1993
3. McKeever SWS. *Thermoluminescence of solids*. Cambridge: Cambridge University Press; 1988. (Cambridge Solid State Science Series).
4. Aitken MJ. *An introduction to optical dating*. London: Oxford University Press; 1988.
5. McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods – Current status*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 1996.

## METODI CHIMICI DI IDENTIFICAZIONE

Stefania Giammarioli

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e dei Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nel corso degli anni un sempre crescente numero di Paesi ha approvato l'irraggiamento come mezzo di conservazione di differenti prodotti alimentari e questo ha reso necessario che i laboratori deputati al controllo degli alimenti potessero far riferimento a metodi affidabili, in grado di rivelare in modo inequivocabile il trattamento con le radiazioni ionizzanti. Dal 1989, anno in cui *Community Bureau of Reference (Bureau Communautaire de Référence, BCR)* (ora *Institute for Reference Material and Measurement*) ha varato un'azione concertata per determinare protocolli di identificazione degli alimenti irradiati, sono stati fatti progressi significativi nello sviluppo e nella validazione di tali protocolli, in particolare nel 1996 sono stati adottati i primi standard europei e da allora altri metodi sono stati standardizzati o sono in fase di sviluppo.

I metodi di rivelazione proposti possono essere separati in metodi fisici, biologici e chimici. Per quanto riguarda questi ultimi, lo sviluppo di metodi idonei a rivelare il trattamento con le radiazioni ionizzanti non è stato un compito facile. Infatti se da un lato è positivo che le alterazioni chimiche a carico dei macronutrienti (proteine, lipidi e carboidrati) siano estremamente contenute, dall'altro lato ciò rende complessa la messa a punto di metodi analitici affidabili. Va inoltre aggiunto che molte delle modificazioni indotte dall'irraggiamento sono molto simili a quelle provocate da altri trattamenti tecnologici e non sono quindi idonee a rivelare in modo specifico il trattamento con le radiazioni ionizzanti (1).

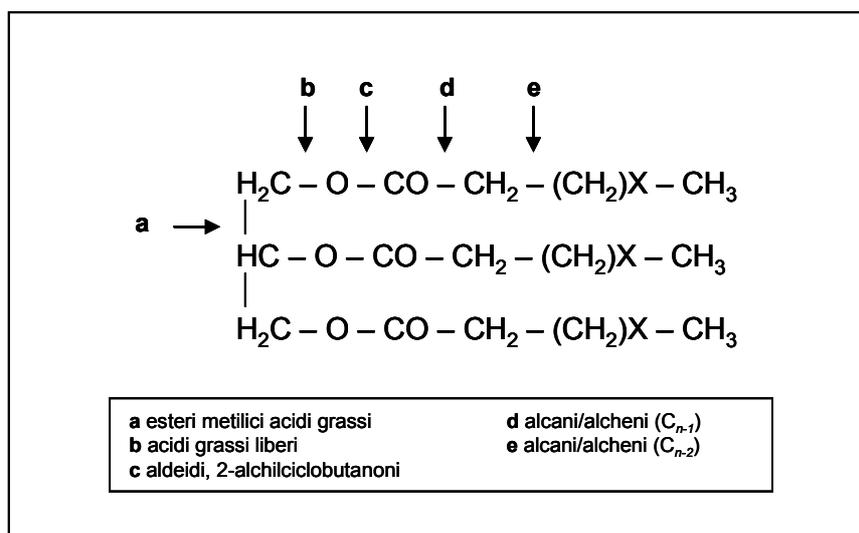
La Tabella 1 riporta schematicamente i *marker* chimici che si sono rivelati più promettenti ai fini del controllo degli alimenti irradiati (1).

**Tabella 1. Marker chimici rivelati più promettenti ai fini del controllo degli alimenti irradiati**

<b>Biomolecola</b>	<b>Marker chimico</b>
Proteine	o-tirosina Formaldeide Legami crociati Frammentazione
Lipidi	Idrocarburi 2-alcilciclobutanoni Idroperossidi Prodotti di ossidazione del colesterolo
Glucidi	Isomeri ottici
Acidi nucleici	Danneggiamento basi Rotture eliche

Tra i diversi metodi di identificazione, quelli che sono risultati più soddisfacenti sono basati sulle modificazioni a carico della frazione lipidica degli alimenti. In seguito al trattamento con le radiazioni ionizzanti i trigliceridi subiscono scissioni in diversi punti della molecola dando

origine a esteri metilici degli acidi grassi, acidi grassi liberi, aldeidi, 2-alchilciclobutanoni, idrocarburi saturi e insaturi (vedi Figura 1) (2,3).



**Figura 1. Prodotti di radiolisi dei trigliceridi**

I due metodi attualmente riconosciuti dalla Comunità Europea, relativi alla identificazione degli alimenti irradiati contenenti grassi, sfruttano la formazione di idrocarburi e di 2-alchilciclobutanoni:

– *Metodo EN 1784*

Identificazione degli alimenti irradiati contenenti grassi. Analisi gascromatografica degli idrocarburi (Approvazione CEN 05.12.1996).

– *Metodo EN 1785*

Identificazione degli alimenti irradiati contenenti grassi. Analisi dei 2-alchilciclobutanoni per gascromatografia/spettrometria di massa (Approvazione CEN 05.12.1996).

Per quanto attiene al metodo EN 1784 relativo alla determinazione degli idrocarburi, è noto che durante l'irraggiamento gli acidi grassi legati ai trigliceridi vengono scissi principalmente a livello dei legami in posizione  $\alpha$  e  $\beta$  rispetto ai gruppi carbonilici, dando luogo alla formazione di idrocarburi con 1 o 2 atomi di carbonio in meno (3-6).

La formazione di idrocarburi volatili derivati dalla rottura delle catene degli acidi grassi non è specifica dell'irraggiamento, in quanto tali composti possono formarsi anche in seguito a trattamenti termici o come risultato di processi ossidativi, tuttavia il pattern di idrocarburi che si forma è molto specifico (1, 5).

Infatti in seguito all'irraggiamento compaiono in quantità più elevate due tipi di idrocarburi:

- idrocarburi con un atomo di carbonio in meno e lo stesso numero di doppi legami dell'acido grasso progenitore ( $\text{C}_{n-1}$ );
- idrocarburi con 2 atomi di carbonio in meno e 1 doppio legame, situato in posizione 1, in più rispetto all'acido grasso progenitore ( $\text{C}_{n-2;1}$ ).

Conoscendo quindi la composizione in acidi grassi di uno specifico alimento è possibile prevedere i principali prodotti di radiolisi che si originano, come di seguito indicato per i principali acidi grassi delle carni (3):

– 16:0 acido palmitico	→	15:0 pentadecano
		14:1 tetradecene
– 18:0 acido stearico	→	17:0 eptadecano
		16:1 esadecene
– 18:1 acido oleico	→	17:1 eptadecene
		16:2 esadecadiene
– 18:2 acido linoleico	→	17:2 eptadecadiene
		16:3 esadecatriene

Inoltre le proporzioni relative degli idrocarburi formati, in particolare di quelli insaturi, riflettono quella degli acidi grassi progenitori nei trigliceridi totali (3, 4). In Tabella 2 è riportato un esempio, relativo ad un campione di avocado irradiato (4):

**Tabella 2. Idrocarburi prodotti dagli acidi grassi in seguito all'irraggiamento in un campione di avocado (10 kGy) con relativa composizione percentuale**

Acidi grassi		Idrocarburi C <sub>n-1</sub>		Idrocarburi C <sub>n-2</sub>	
C16:0	18,9%	C15:0	18,9%	C14:1	16,8%
C16:1	9,8%	C15:1	8,4%	C14:2	9,5%
C18:1	52,4%	C17:1	50,5%	C16:2	52,6%
C18:2	19,0%	C17:2	22,1%	C16:3	21,1%

Il metodo è stato validato su: carni crude di pollo, maiale e manzo; camembert; avocado, papaya e mango.

Schematicamente il metodo prevede una estrazione della frazione lipidica mediante fusione o con solvente e l'isolamento della frazione idrocarburica mediante cromatografia di adsorbimento, seguita da analisi gascromatografica.

L' estrazione della fase lipidica viene condotta mediante metodiche diverse a seconda delle matrici in esame, in particolare nei prodotti carnei può essere effettuata per:

- fusione;
- estrazione mediante omogeneizzazione in *blender* con miscela *n*-pentano/2-propanolo;
- estrazione in Soxhlet con *n*-esano o *n*-pentano;
- estrazione a ricadere con *n*-esano.

Le diverse procedure forniscono risultati sovrapponibili, la scelta può dipendere dal contenuto lipidico del campione e dalla necessità di ridurre le possibilità di contaminazione (3). Per formaggi e frutta l' estrazione viene invece effettuata per miscelazione del campione con *n*-esano.

L' isolamento della frazione idrocarburica prevede l' utilizzo di una colonna di Florisil disattivato su cui viene introdotto il grasso estratto (puro o in soluzione) addizionato di uno standard interno (eicosano C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>).

Questa fase rappresenta uno dei punti critici della metodica in quanto il grado di attivazione del Florisil condiziona il recupero degli idrocarburi. Il Florisil attivato di fresco presenta infatti alte capacità di ritenzione, soprattutto nei confronti degli idrocarburi più insaturi, con conseguente perdita o bassi recuperi. La disattivazione parziale con il 3% acqua aumenta significativamente il recupero di idrocarburi bi- e tri-insaturi (6). È comunque opportuno effettuare prove di recupero per ogni set di analisi.

Un altro fattore critico nell'esecuzione del metodo è legato alla possibilità di fenomeni di contaminazione. Le impurezze riscontrate nei materiali utilizzati per l'analisi sono rappresentate principalmente da idrocarburi saturi che sono stati individuati nel Florisil, nei solventi impiegati per l'estrazione, come anche nella carta da filtro e nei ditali da estrazione (6). Per eliminare tali fonti di contaminazione si deve aver cura di attivare accuratamente il Florisil, controllare la purezza dei reattivi per ciascuna serie di analisi (concentrando i solventi prima del controllo) e lavare i filtri e i ditali con il solvente impiegato nell'estrazione.

La fase finale della metodica prevede infine la *separazione* della miscela di idrocarburi *per via gascromatografica* utilizzando colonne capillari idonee, un sistema di iniezione *splitless* o *on-colum* e rivelazione mediante rivelatore a ionizzazione di fiamma (*Flame Ionisation Detector*, FID) o spettrometria di massa (*Mass Spectrometry*, MS).

Per la separazione possono essere utilizzate sia colonne non polari che polari (Figura 2), con risultati nettamente migliori nel caso delle prime (6).

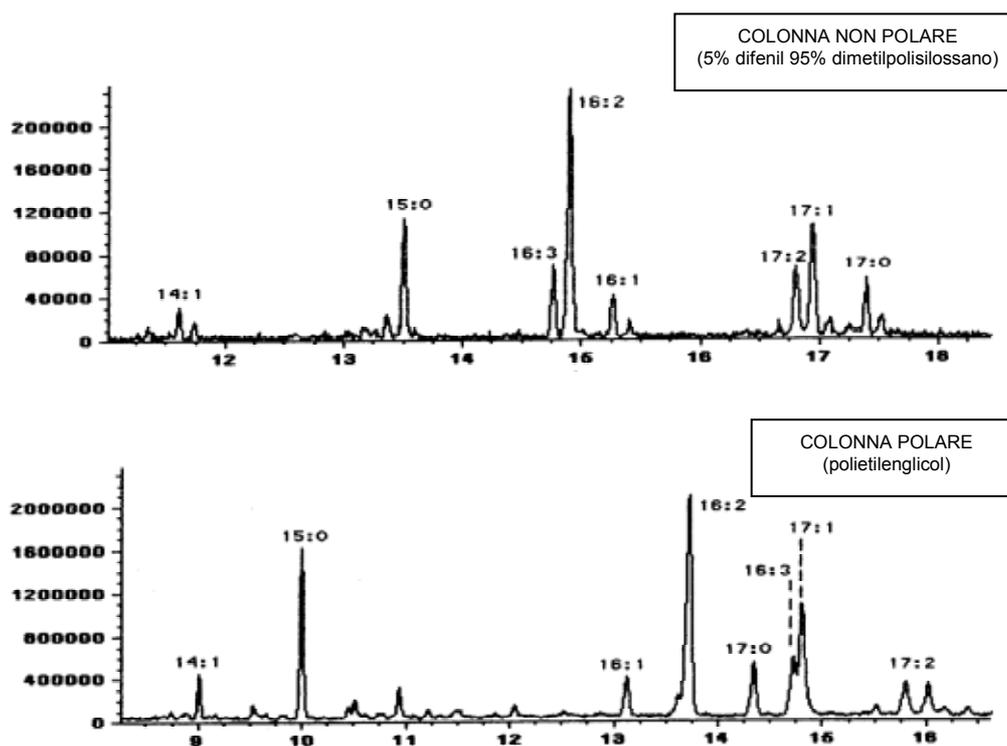


Figura 2. Ordine di eluizione degli idrocarburi su colonne capillari diverse

Un campione viene identificato come irradiato se tutte le coppie di idrocarburi  $C_{n-1} / C_{n-2:1}$ , previste sulla base della composizione in acidi grassi, sono chiaramente identificabili e nelle proporzioni attese.

Il metodo è stato sottoposto a *validazione* dal BCR e dal *German Federal Health Office* (*Bundesgesundheitsamt*, BGA) entro determinati dosaggi:

- dosi non inferiori a 0,5 kGy per le carni crude irradiate e il camembert;
- dosi non inferiori a 0,3 kGy per avocado, papaya e mango freschi.

Nel caso di trattamenti con basse dosi di radiazione, le concentrazioni di idrocarburi derivati da acidi grassi che sono presenti in basse concentrazioni in uno specifico alimento, possono essere inferiori al limite di rivelabilità del metodo.

Di seguito viene riportato un riassunto dei principali risultati ottenuti negli studi di validazione (7-11), dove per falsi negativi si intendono campioni irradiati identificati come non irradiati; mentre per falsi positivi i campioni non irradiati identificati come irradiati.

- Test condotti su campioni di carne di pollo (n.=239), irradiati con dosi di circa 0,5-3,0-5,0 kGy, analizzati dopo 1 e 6 mesi dall'irraggiamento.  
Falsi negativi: 6,3%. Falsi positivi: 0,8%
- Test condotti su campioni di carne di pollo, maiale e manzo (n.=864), irradiati con 0,8-2,8-7,0 kGy, analizzati dopo 3 e 6 mesi dall'irraggiamento.  
Falsi negativi: 0,7%. Falsi positivi: 1,0%
- Test condotti su campioni di camembert (n.=126), irradiati con dosi di circa 0,5-1,0 kGy.  
Falsi negativi: 1%. Falsi positivi: 0%
- Test condotti su campioni di avocado, papaya e mango (n.=305), irradiati con 0,3-0,5-1,0 kGy.  
Falsi negativi: 2,0%. Falsi positivi: 0,3%

I falsi negativi riscontrati erano, nella maggioranza dei casi, rappresentati da campioni trattati con basse dosi di radiazioni; mentre i falsi positivi erano dovuti a contaminazioni, scambio di campioni o erronea interpretazione dei dati.

Ancora più specifico per l'individuazione del trattamento con le radiazioni ionizzanti risulta essere il metodo EN 1785. Durante l'irraggiamento l'ossigeno acilico legato nei trigliceridi viene scisso, dando luogo alla formazione di 2-alcilciclobutanoni contenenti lo stesso numero di atomi di carbonio dell'acido grasso progenitore, con il gruppo alchilico localizzato in posizione 2 (12-15), come mostrato in Figura 3.

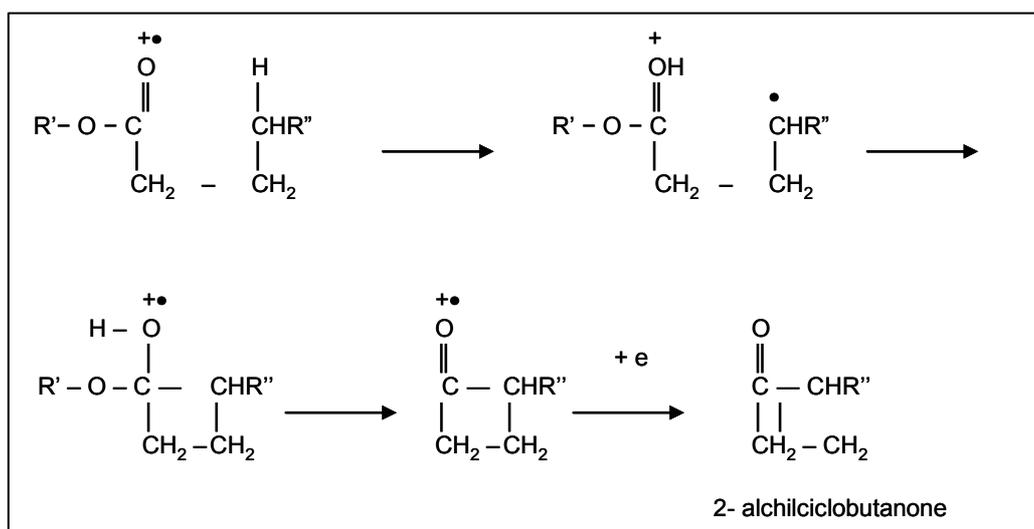


Figura 3. Formazione di alchilciclobutanoni in seguito ad irraggiamento

Anche in questo caso il tipo di alchilciclobutanoni formati dipende dalla composizione in acidi grassi dell'alimento, come indicato in Tabella 3 (15) :

**Tabella 3. Acidi grassi e relativi 2-alchilciclobutanoni originati dall'irraggiamento**

Acido grasso	2-alchilciclobutanone derivato
Ac. palmitico (16:0)	2 - Dodecilciclobutanone (DCB)
Ac. stearico (18:0)	2 - Tetradecilciclobutanone (TCB)
Ac. oleico (18:1)	2 - (5'-Tetradecenil) ciclobutanone
Ac. linoleico (18:2)	2 - (5',8'-Tetradecadienil) ciclobutanone
Ac. linolenico (18:3)	2 - (5',8',11'-Tetradecatrienil) ciclobutanone

A differenza degli idrocarburi, la formazione di alchilciclobutanoni sembra essere specifica del processo di irraggiamento e, a tutt'oggi, tali composti non sono stati riscontrati in alimenti non irradiati (13, 14).

Al momento attuale il metodo prevede solo la determinazione del dodecilciclobutanone (DCB) e del tetradecilciclobutanone (TCB), ed è stato validato su carni crude di pollo e maiale e su uova intere liquide.

Schematicamente il metodo consiste in una estrazione della frazione lipidica in Soxhlet con *n*-esano, nell'isolamento degli alchilciclobutanoni mediante cromatografia di adsorbimento e successiva determinazione per gascromatografia/spettrometria di massa.

Per quanto riguarda l'*estrazione della fase lipidica*, in linea di principio possono essere accettabili altre procedure di estrazione, tuttavia metodiche che utilizzino etere etilico o miscela pentano/2-propanolo si sono rivelate insoddisfacenti e non dovrebbero quindi essere usate. In ogni caso eventuali procedure alternative dovrebbero essere utilizzate solo dopo averne verificato l'idoneità, per confronto con la procedura Soxhlet.

L'*isolamento degli alchilciclobutanoni* prevede l'utilizzo di una colonna di Florisil disattivato (al 20%) su cui viene introdotto una opportuna aliquota dell'estratto lipidico; l'aggiunta dello standard interno (2-cicloesilcicloesano) avviene in questo caso sull'eluato.

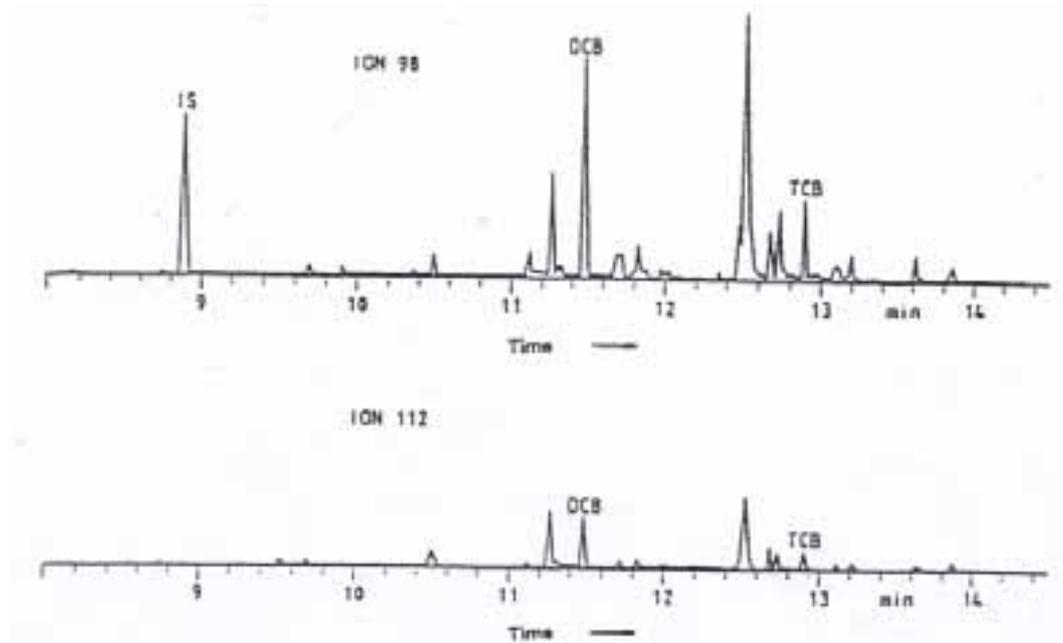
La *separazione gascromatografica* dei 2-alchilciclobutanoni viene solitamente effettuata utilizzando colonne capillari non polari e identificazione mediante MS utilizzando gli ioni *m/z* 98 e 112 (Figura 4). Tali frammenti sono presenti negli spettri di massa in un rapporto caratteristico:

- 4,0-4,5:1 nel caso del dodecilciclobutanone;
- 3,8-4,2:1 nel caso del tetradecilciclobutanone.

Per dare una identificazione positiva dei singoli ciclobutanoni, entrambi gli ioni (98 e 112) debbono essere presenti e nel rapporto previsto.

I campioni vengono considerati irradiati quando almeno uno dei 2-alchilciclobutanoni è stato identificato positivamente e le concentrazioni stimate superano quelle equivalenti ad un rapporto segnale/noise di 3:1. Inoltre, di solito, il rapporto DCB:TCB riflette il rapporto tra gli acidi palmitico e stearico presente nel prodotto in esame, fatta eccezione per i campioni di carne di maiale (14).

Il protocollo EN 1785 prevede l'effettuazione regolare di *controlli di qualità interni* principalmente per quanto riguarda la linearità (da verificare utilizzando soluzioni standard dei 2-alchilciclobutanoni a concentrazioni crescenti addizionate di quantità fisse di standard interno) e il recupero del metodo (da effettuare utilizzando campioni non irradiati addizionati e non con quantità note di DCB e TCB); nonché una correzione dei dati analitici per il recupero percentuale, in considerazione del fatto che l'aggiunta dello standard interno viene effettuata dopo la cromatografia su colonna.



**Figura 4. Cromatogramma degli ioni m/z 98 e 112 di carne di pollo irradiata con una dose di circa 4,0 kGy (IS = standard interno, DCB = dodecilciclobutanone, TCB = 2-tetradecilciclobutanone) (Estratto autorizzato della norma UNI EN 1785 © UNI, Milano)**

Anche in questo caso il metodo è stato sottoposto a *validazione* mediante test interlaboratorio condotti dal BCR e dal *Food and Agricultural Organization* (FAO) in collaborazione con l'*International Atomic Energy Agency* (IAEA), entro determinati dosaggi:

- dosi non inferiori a 0,5 kGy per la carne cruda di pollo;
- dosi non inferiori a 1 kGy per carne cruda di maiale e uovo intero liquido.

Un riassunto dei risultati ottenuti negli studi di validazione (7,16) viene qui di seguito riportato:

- Test condotti su campioni di carne di pollo (n.=134), irradiati con dosi di circa 0,5-3,0-5,0 kGy, analizzati dopo 1 e 6 mesi dall'irraggiamento.  
Falsi negativi: 1,5%. Falsi positivi: 0,0%
- Test condotti su campioni di carne di pollo e di maiale (n.=171), irradiati con 1,0 e 3,0 kGy  
Falsi negativi: 0,6%. Falsi positivi: 0,0%
- Test condotti su campioni di uovo intero liquido (n.=99), irradiati con 1,0 e 3,0 kGy  
Falsi negativi: 0,0%. Falsi positivi: 0,0%

I falsi negativi erano rappresentati da campioni trattati con basse dosi di radiazioni o da campioni codificati in modo erroneo.

In conclusione, da quanto sopra illustrato, si evidenzia come i metodi EN 1484 e 1485 siano specifici e affidabili, anche se il loro campo di applicazione risulta al momento limitato

- *ad alcune matrici alimentari*  
carni crude di pollo, maiale e manzo; camembert, uovo intero liquido, avocado, mango e papaia;
- *a trattamenti al disopra di un certo dosaggio*  
0,3-0,5 kGy per l'analisi degli idrocarburi  
0,5-1,0 kGy per l'analisi dei 2-alcilciclobutanoni.

Per ovviare a questi inconvenienti sono attualmente in corso studi sia per estendere l'applicabilità di tali metodi ad altre matrici, che per aumentarne la sensibilità allo scopo di rivelare trattamenti effettuati con dosaggi ancora più bassi, come anche la presenza di ingredienti irradiati all'interno di alimenti preparati non irradiati (1, 17).

Qui di seguito vengono riportati alcuni esempi di modifiche proposte (17):

- *Miglioramento della fase di estrazione*  
Estrazione con fluidi supercritici  
Estrazione accelerata
- *Miglioramento della selettività e della sensibilità*  
Cromatografia a scambio cationico con ioni argento  
Rivelazione fluorimetrica  
Rivelazione immunochimica  
Tecniche cromatografiche accoppiate: LC-GC-(MS), LC-LC-GC-(MS), TLC-HPLC, TLC-GC-MS.

Va inoltre ricordato che le metodiche descritte consentono di distinguere con sufficiente affidabilità i prodotti irradiati da quelli che non lo sono, mentre la possibilità di quantificazione delle dosi impiegate nel trattamento rimane un interrogativo ancora aperto; infatti sebbene la concentrazione dei composti dosati tenda ad aumentare in modo lineare con la dose di irraggiamento, dipende anche in modo significativo dalla temperatura utilizzata nel trattamento (3-6, 14-15). Ad ogni modo la rivelazione qualitativa è di maggiore importanza della stima quantitativa in quanto il trattamento con le radiazioni ionizzanti è un processo auto-limitante, dosi eccessivamente elevate tendono infatti a determinare alterazioni organolettiche inaccettabili (e alti costi), mentre certe dosi minime sono indispensabili per ottenere l'effetto desiderato (1, 3).

## Bibliografia

1. Delincée H. Detection of food treated with ionizing radiation. *Trends Food Sci Technol* 1998;9:73-82.
2. Nawar WW. The decomposition of food lipids by ionizing radiation. In: *Proceedings International Colloquium. Identification of irradiated food.*, Luxembourg: Commission of the European Communities; 1973. (EUR 5126 d/e/f/i/n). p. 117-25.
3. Schreiber GA, Helle N, Bögl KW. Detection of irradiated food – methods and routine applications. *Int J Radiat Biol* 1993;63:105-30.
4. Lesgards G, Raffi J, Pouliquen I, Chaouch AA, Giamarchi P, Prost M. Use of radiation-induced alkanes and alkenes to detect irradiated food containing lipids. *JAACS* 1993;70:179-85.
5. Bergaentzle M, Sanquer F, Hasselmann C, Marchioni E. Detection of g-irradiated raw-milk Camembert cheeses by capillary gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbons. *Food Chem* 1994;51:177-82.
6. Spiegelberg A, Schulzki G, Helle N, Bögl KW, Schreiber GA. Methods for routine control of irradiated food: optimization of a method for detection of radiation-induced hydrocarbons and its application to various food. *Radiat Phys Chem* 1994;43:433-44.
7. Stevenson MH, Meier W, Kilpatrick DJ. *A European collaborative blind trial using volatile hydrocarbons and 2-dodecylcyclobutanones to detect irradiated chicken meat.* Luxembourg: Commission of the European Communities; 1994. (BCR Report EUR/15969/en).
8. Schreiber GA, Schulzki G, Spiegelberg A, Helle N, Adam S, Ammon J, Baumann P, Brockmann R, Bänziger U, Delincée H, Droz CH, Esterdorfer S, Gemperle C, von Grabowski HU, Känzig A, Krölls W, Matter L, Metschies M, Mildau G, Pfordt J, Plaga-Lodde A, Punkert M, Rönnefahrt B, Ruge W,

- Stemmer H, Vater N, Wilmers K, Bögl KW. *Gas chromatographic analysis of volatile hydrocarbons to detect irradiated chicken, pork and beef – an intercomparison study. Report of the Institute of Social Medicine and Epidemiology of the Federal Health Office*. Berlin: Bundesgesundheitsamt; 1993. (SozEp-Heft 1/93).
9. Schreiber GA., Schulzki G, Spiegelberg A, Helle N, Bögl KW. Evaluation of a gas chromatographic method to identify irradiated chicken, pork and beef by detection of volatile hydrocarbons. *J Assoc Off Anal Chem* 1994;77:1202-17.
  10. Schreiber GA, Schulzki G, Spiegelberg A, Ammon J, Bänziger U, Baumann P, Brockmann R, Droz CH, Fey P, Fuchs K, Gemperle C, Göllner T, Hees CH, Jahr D, Jonas K, Krölls W, Langer W, Lohse H, Mildau G, Parsch F, Pfordt J, Rönnefahrt B, Rümenapp J, Ruge W, Stemmer H, Studer B, Trapp C, Voigt F, Vreden N, Wohlfahrt R, Bögl KW. *An inter-laboratory study on the detection of irradiated camembert, avocado, papaya and mango by gas chromatographic analysis of radiation induced hydrocarbons*. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin); 1995. (BgVV-Heft 6/1995).
  11. Schreiber GA, Helle N, Schulzki G, Linke B, Spiegelberg A, Mager M, Bögl K.W. Inter-laboratory tests to identify irradiation treatment of various foods via gas chromatographic detection of hydrocarbons, ESR spectroscopy and TL analysis. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods – current status*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 98-107.
  12. Le Tellier PR, Nawar W. 2-Alkylcyclobutanones from the radiolysis of triglycerides. *Lipids* 1972;7:75-6.
  13. Boyd DR, Crone AVJ, Hamilton JTG, Hand MV, Stevenson MH, Stevenson PJ Synthesis, characterization, and potential use of 2-dodecylcyclobutanone as a marker for irradiated chicken. *J Agric Food Chem* 1991;39:789-92.
  14. Stevenson HM. Identification of irradiated foods. *Food Technol* 1994;141-4.
  15. Lee HJ, Byun MW, Kim KS. Detection of radiation-induced hydrocarbons and 2-alkylcyclobutanones in irradiated Perilla seeds. *J Food Prot* 2000;63:1563-9.
  16. Stevenson MH, Kilpatrick DJ, McMurray CH. *FAO/IAEA Collaborative blind trial using 2-dodecylcyclobutanone and 2-tetradecylcyclobutanone to detect irradiated chicken, pork and liquid whole egg*. Vienna, Austria: FAO/IAEA; 1994.
  17. Delincée H. Analytical methods to identify irradiated foods – a review. *Radiat Phys Chem* 2002;63:455-8.

## METODI MICROBIOLOGICI DI IDENTIFICAZIONE

Paolo Aureli

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La Direttiva 1993/3/CE stabilisce l'elenco comunitario degli alimenti e loro ingredienti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti. A tutt'oggi, sebbene la Direttiva 1999/2/CE prevedeva l'obbligo per la Commissione di presentare entro il 31 dicembre 2000 una proposta tendente a completare un elenco comunitario positivo, esso contiene una sola categoria di alimenti: le erbe aromatiche disseccate, le spezie e i condimenti vegetali. Le stesse normative prevedono che le autorità svolgano controlli sui prodotti irradiati anche nella fase di commercializzazione utilizzando metodi standardizzati e convalidati.

Le spezie e le piante aromatiche sono prodotti naturali di origine vegetale che, singoli o in miscela, sono usati nelle preparazioni alimentari per insaporire, condire o impartire aromi agli alimenti (1). Più precisamente, sono un gruppo eterogeneo di componenti (piante, parti fogliari di piante, cortecce, radici, bacche, bulbi, rizomi, corpi fruttiferi e semi) di specie botanicamente diverse, freschi o essiccati, interi o sminuzzati, provenienti da varie aree geografiche in prevalenza tropicali e subtropicali, che trovano da lunga data ampio impiego in campo alimentare proprio per la proprietà di conferire una certa variabilità di sapori e, quindi, di appetibilità ai cibi.

Per le caratteristiche intrinseche (umidità e composizione) e le modalità di raccolta e trasporto, le spezie e le piante aromatiche non di rado possono presentare problemi microbiologici, primo tra tutti una massiccia contaminazione fungina, che sono conseguenti alla colonizzazione che si verifica quando sono tenute in condizioni di umidità e temperatura inappropriate e che possono causare occasionalmente fenomeni di deterioramento o più raramente episodi di malattia quando addizionate agli alimenti.

Data la mancanza di consistenti studi sulla composizione della flora microbica contaminante le spezie e le piante aromatiche all'origine, si può ragionevolmente presumere che essa non differisca sensibilmente da quella di altri prodotti agricoli coltivati e raccolti nelle medesime condizioni e che le forme essiccate presentino in prevalenza le specie microbiche indigene delle piante da cui originano e quelle derivanti dalle modalità di raccolta e dal suolo in cui sono state coltivate. A queste specie microbiche ovviamente vanno aggiunte quelle derivanti dalle contaminazioni fecali prodotte da uccelli, roditori e insetti, quelle dei contaminanti delle acque nere e, infine, quelle portate dalla polvere. In base a quanto rilevato in varie indagini sui prodotti campionati all'importazione o agli impianti di processo (2), le forme microbiche prevalenti sono i batteri mesofili aerobi, sporigeni e non, con cariche microbiche oscillanti nel range  $10^5$ - $10^8$  cfu/g, e le muffe seguite da batteri termofili, coliformi, clostridi, occasionalmente da *S.aureus* e *E.coli*. Proprio per questo, la presenza di batteri mesofili e termofili in elevata quantità nelle spezie addizionate ad alimenti destinati ad essere utilizzati per la preparazione di conserve o prodotti trasformati non refrigerati è considerata indesiderabile (3-5). Alcune volte le spezie possono veicolare batteri che sono di rilevanza ai fini della sanità pubblica, quali *B. cereus*, *C. perfringens*, muffe tossigene, *S. aureus*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp. (6); e ancora oggi le spezie sono sottoposte ad analisi per la loro ricerca prima di essere utilizzate o avviate al commercio (7). In effetti, sono descritti in letteratura episodi di tossinfezione alimentare (8) in cui l'alimento implicato è risultato essere stato contaminato dalla addizione di una spezia contaminata; tuttavia, i dati epidemiologici disponibili non ci dicono che le spezie sono una tra le più importanti sorgenti di patogeni alimentari.

Le spezie vengono sottoposte a vari trattamenti tendenti a prolungarne la conservabilità, primo tra tutti l'essiccamento, e ad implementarne le caratteristiche igieniche; il più frequente mezzo per ridurre la carica microbica è stata per lungo tempo la fumigazione con ossido di etilene il cui uso, però, è andato progressivamente scemando a causa dei problemi di mutagenicità e cancerogenicità del gas. Tra i trattamenti alternativi, la decontaminazione con l'irraggiamento è quello che ha ricevuto i maggiori consensi in quanto produce risultati altrettanto efficaci di quelli che possono essere ottenuti con la fumigazione. Nel caso della contaminazione fungina, l'irraggiamento consente addirittura di ottenere risultati migliori che con la fumigazione; inoltre le specie microbiche che sopravvivono al trattamento radiante mostrano una più marcata sensibilità ad un successivo trattamento termico. Varie indagini hanno ampiamente dimostrato che trattamenti radianti a dosi <10 kGy riducono la carica microbica delle spezie fino a valori tecnologicamente e igienicamente accettabili.

Di qui l'interesse delle imprese all'uso del trattamento radiante e l'autorizzazione delle autorità. Per verificare il pieno rispetto delle norme che regolano gli aspetti generali e tecnici dell'attuazione del processo di irraggiamento, le condizioni di autorizzazione e, in particolare, la corretta etichettatura con cui garantire il diritto all'informazione dei consumatori per i quali gli alimenti irradiati o gli ingredienti irradiati possono suscitare riserve di ordine etico, le autorità preposte alla vigilanza sottopongono gli alimenti del commercio a controllo utilizzando metodi standardizzati e convalidati; inoltre il ricorso a metodi per il riconoscimento degli alimenti irradiati è l'unico mezzo per controllare l'importazione illegale di prodotti irradiati non etichettati. Per poter raggiungere lo scopo, sono state esaminate varie soluzioni, in particolare sono state analizzate e considerate le modificazioni che sopravvengono negli alimenti in seguito ad irraggiamento. Tali modifiche possono essere di natura fisica, chimica e biologica e ciascun tipo può servire per rivelare gli effetti del trattamento radiante sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo (9, 10). Il problema analitico, tuttavia, è complicato dal fatto che moltissime, se non tutte le sostanze chimiche formatesi in seguito all'irraggiamento non vengono esclusivamente da questo trattamento, ma possono essere presenti normalmente nell'alimento non trattato oppure esservi generate in seguito ad altri processi di lavorazione. Questo fatto ha impedito lo sviluppo di un metodo di rilevazione universale e spiega perché la distinzione degli alimenti irradiati da quelli non trattati ha costituito un problema analitico di non facile soluzione. In termini generali, i metodi attualmente disponibili possono essere suddivisi in:

- a) *metodi di screening*, per indicare se un alimento è stato trattato o meno;
- b) *metodi di rilevamento*, che forniscono un certo grado di assicurazione del trattamento con radiazioni;
- c) *metodi quantitativi*.

Così nel caso di prodotti irraggiati e ancor più nel caso di ingredienti presenti nelle formulazioni alimentari appare ragionevole ammettere che solo il ricorso a metodi analitici combinati può risolvere il problema del corretto riconoscimento di un alimento irradiato. Per una più ampia trattazione sui metodi di riconoscimento degli alimenti irradiati, in particolare delle spezie, e sulle ragioni del loro sviluppo si rimanda alla consultazione di un interessante rassegna edita dalla IAEA (*International Atomic Energy Agency*) (11).

La constatazione che le diverse specie microbiche presentano una diversa sensibilità alle radiazioni (Tabella 1) e che la composizione della microflora di un alimento si modifica in maniera significativa in funzione delle condizioni di processo, ha fatto pensare che la concentrazione della microflora vivente residua possa essere utilizzata come *marker* del trattamento se si può provare che il cambiamento che è intervenuto è specifico del processo di irraggiamento.

**Tabella 1. Valori dei tempi di riduzione decimale (D<sub>10</sub>)\* di patogeni alimentari espressi in minuti**

Microrganismo	Alimento	D <sub>10</sub> (kGy)/min
<i>C. jejuni</i>	Carne di manzo macinata	0,175
<i>E. coli</i> 0157:H7	Carne di manzo macinata	0,241
<i>L. monocytogenes</i>	Carne di manzo macinata	0,722
<i>S. enteritidis</i>	Carne di manzo macinata	0,590
<i>S. typhimurium</i>	Carne di manzo macinata	0,490
<i>S. aureus</i>	Carne di manzo macinata	0,770
<i>V. parahaemolyticus</i>	Pesce di mare	0,038
<i>Y enterocolitica</i>	Carne di manzo macinata	0,196

\*Il valore D<sub>10</sub> rappresenta la dose di radiazioni necessaria per distruggere il 90% della popolazione batterica

Da lungo tempo i microbiologi hanno sviluppato metodi con cui quantificare la popolazione microbica per varie finalità. Per soddisfare taluni criteri (in particolare precisione, sensibilità, convenienza, economicità e rapidità di risposta) una specifica attenzione è stata riservata ai metodi di conteggio diretti; tra questi quelli basati sull'uso di agenti coloranti hanno ricevuto una grande attenzione perché consentivano di eliminare alcune limitazioni quali la mancanza di sensibilità, l'affaticamento dell'operatore dopo un uso prolungato, l'interferenza delle impurezze proprie di altri metodi diretti.

La conta diretta su filtro con microscopio a epifluorescenza (*Direct Epifluorescent Filter Technique*, DEFT) è quella tra le tecniche dirette con colorazione che ha riscosso i maggiori consensi perché 100 volte più sensibile delle altre, fornisce risposte in 30 minuti, non è influenzata da interferenti, può essere automatizzata e mostra una ottima correlazione con i metodi di conteggio standardizzati (12). Tale tecnica è stata messa a punto negli anni '80 presso il *National Institute for Research in Dairying* (Reading UK), per la conta dei microrganismi del latte crudo nell'ambito dei test per il pagamento del latte a qualità e successivamente è stata proposta anche per la determinazione rapida della carica microbica di altri alimenti quali carni, pesce, vegetali freschi o congelati (13), superfici di lavoro (14), manzo e pollame (15), nell'acqua minerale (16), nel prosciutto cotto (17).

Poiché l'irraggiamento influenza la vitalità dei microrganismi ma non la loro capacità di essere colorati con l'arancio di acridina, la tecnica DEFT è stata proposta anche per contare le cellule microbiche di un alimento sottoposto a trattamento radiante confrontando le conte batteriche ottenute con la numerazione delle colonie in piastra (cioè le cellule che mantengono la loro vitalità dopo l'irraggiamento) e quelle ottenute mediante tecnica di conteggio diretto su filtro con microscopio a epifluorescenza (cioè quelle che erano vive prime del trattamento ma che sono state inattivate dal processo) (18).

Se il campione ha una conta DEFT più alta di quella ottenuta con APC (*Aerobic Plate Count*), si può affermare con ragionevole sicurezza che il campione è stato trattato. L'efficacia di tale metodica è dovuta, infatti, per una gran parte proprio all'uso del colorante fluorescente arancio di acridina (3,6-Acridinediamine, N,N,N',N'-tetramethyl-, monohydrochloride, C17-H19-N3.Cl-H, CAS Reg N. 65-61-2), in quanto colora in maniera differenziale il materiale nucleare dei microrganismi: quelli "attivi" prima di essere sottoposti al processo presentano una colorazione giallo arancio mentre quelli "inattivi" mostrano una fluorescenza verde quando esposti alla luce blu alla lunghezza di 450-490 nm. Il colorante fluorescente arancio di acridina è una base debole idrofobica che si lega a gruppi carichi negativamente, in particolare i fosfati. Il meccanismo con cui provoca le differenze di colorazione non sono chiaramente note: si ritiene, tuttavia, che l'arancio di acridina si leghi a gruppi fosfato adiacenti presenti nei filamenti singoli degli acidi nucleici dando la classica colorazione arancio per effetto di una interazione colorante-colorante in presenza di un alto rapporto colorante-nucleotide; la colorazione

fluorescente verde si manifesta, invece, quando le molecole del colorante si intercalano singolarmente negli acidi nucleici a doppia elica. In sintesi sembra probabile che la diversa fluorescenza cui l'arancio di acridina dà luogo possa essere correlata a una complessa combinazione della quantità di colorante assunto dalle cellule, con i tipi e le quantità relative di DNA e RNA presenti nelle cellule e il grado di denaturazione degli acidi nucleici (cioè a dire della quantità relativa di filamenti singoli e doppi).

In vista della definizione della norma comunitaria che fissa le regole tecniche cui debbono soddisfare gli impianti per l'irraggiamento e la lista dei prodotti autorizzati a tale trattamento, il *Commission Reference Bureau* (meglio noto come BCR, *Bureau Communautaire de Référence*) nei primi anni '90, ha avviato un programma di ricerca per lo sviluppo e la validazione di metodi per alimenti trattati con radiazioni ionizzanti.

In particolare, un gruppo di lavoro coordinato dalla Finlandia e dall'Italia si è occupata della possibilità di utilizzare un metodo microbiologico di screening per il riconoscimento delle specie disidratate irradiate basato sulla combinazione della tecnica di conteggio su filtro con l'esame al microscopio a fluorescenza (conta DEFT con cui si ottiene il numero totale di microrganismi, compresi quelli inattivi, presenti nel campione) con la conta convenzionale su terreno colturale agarizzato in piastra (APC, che indica invece solo il numero dei microrganismi vivi presenti nel campione dopo un possibile trattamento d'irraggiamento) (19).

Il metodo DEFT/APC, dopo opportune verifiche, è stato sottoposto al vaglio del *Comité Européen de Normalisation* (CEN) e quindi standardizzato come metodo EN 13783 (*Foodstuffs – Detection of irradiated food using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count*). Nella Figura 1 viene riportato il diagramma di flusso di tale procedura nella quale un noto volume di campione viene filtrato su membrane filtrante per concentrare i microrganismi. Questi vengono colorati con un colorante fluorescente che produce una colorazione arancione o giallo arancione quando è esposta ad una luce blu alla lunghezza di 450-490 nm (20). I microrganismi sono contati usando un microscopio a fluorescenza per dare la conta DEFT; in parallelo, la APC è determinata con una seconda porzione dello stesso campione di saggio.

L'esperienza acquisita nell'uso di tale metodica, suggerisce di adottare i seguenti accorgimenti:

- a) utilizzare oculari dotati di retino per facilitare il conteggio;
- b) quando si debbono esaminare numerosi campioni è bene lasciar riposare la vista per qualche minuto tra un campione e l'altro per assicurare una buona lettura;
- c) ove possibile, ricorrere all'uso di dispositivi automatici o semiautomatici.

Va fatto presente che se il campione contiene una carica microbica bassa ( $APC < 10^3$  cfu) il metodo non può essere applicato. Infatti, è una buona sovrapposibilità tra le conte DEFT e APC nell'intervallo  $10^4$ - $10^7$  cfu/g.

C'è altresì da sottolineare il fatto che la probabilità di avere campioni falsamente positivi è bassa quando si usa una differenza limite di 4,0 log; tuttavia, con campioni di basilico è stato dimostrato che tale valore può dare risultati falsamente negativi (21).

Infine, va ricordato che il metodo DEFT/APC non è specifico per i trattamenti d'irraggiamento; di conseguenza, le differenze di conteggio possono essere provocate anche da altri trattamenti e, quindi, i risultati positivi vanno confermati utilizzando un altro metodo standardizzato per provare specificatamente il fatto che le specie sono state sottoposte ad irraggiamento.

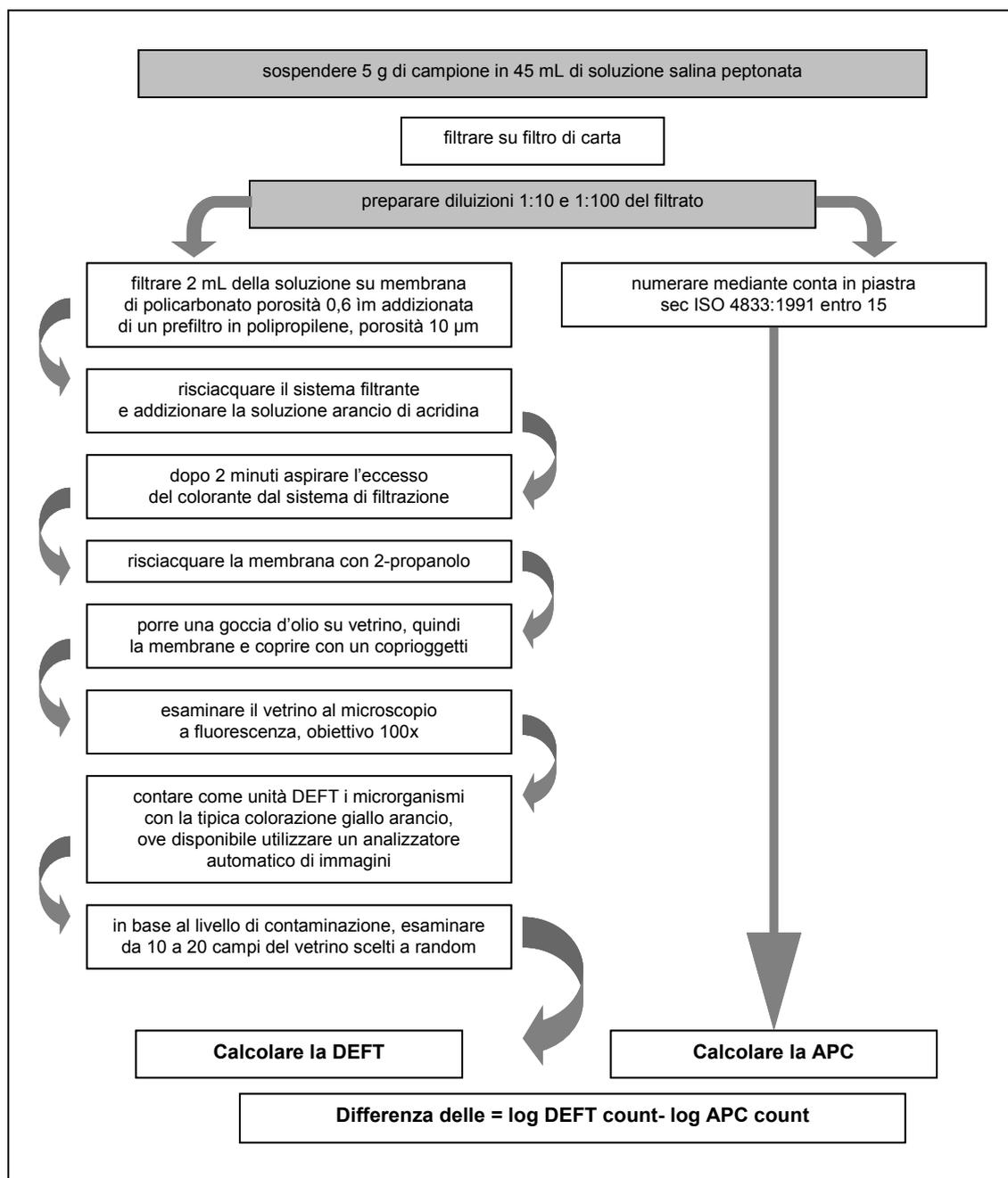


Figura 1. Diagramma di flusso del metodo DEFT/APC

## Bibliografia

1. Codex Alimentarius Commission. *Code of hygienic practice for spices and dried aromatic plants*, Roma: FAO/WHO; 1995. (CAC/RCP 42-1995).
2. von Lorch L, Aureli P, DeMichele T, Vignolo E. Aspetti microbiologici delle spezie in relazione al loro impiego alimentare. *Riv Soc Ital Sci Alim* 1979;5:293-8.

3. Surkiewicz BF, Johnston RW, Elliot RP, Simmons ER. Bacteriological survey of fresh pork sausage produced at establishments under federal inspection. *Appl Microbiol* 1975;29:331-4.
4. Surkiewicz BF, Johnston RW, Carosella JM. Bacteriological survey of frankfurters produced at establishments under federal inspection. *J Milk Food Technol* 1976;39:227-37.
5. Leistner L. Spices as a source of microorganisms in foods. In: Leistner L, Fabech B, Jordy A, Nilsson T, Gry P, Anthonsen KR, Berkelind A, Simon T, Lingnert H, Heinarsson H, Movitz J (Ed.). *SIK. document No 15*. Goteborg, Sweden: Svenska Livsmedelinstitut 1984. p.73-84.
6. Toofanian F, Stegeman H. Comparative effect of ethylene oxide and gamma irradiation of the chemical, sensory and microbial quality of ginger, cinnamon, fennel and fenugreek. *Acta Alimentaria* 1988;17(4):271-81.
7. Horwitz W (Ed.). *AOAC Official methods of analysis of AOAC International*. V.2. - 17. ed. Arlington, Va.: AOAC International; 2000.
8. Gustavsen S, Breen O. Investigation of an outbreak of Salmonella oranienburg infections in Norway, caused by contaminated black pepper. *Am J Epidemiol* 1984;119(5):806-12.
9. Delincée H. International cooperation on the detection of irradiated food. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993;197(3):217-26.
10. Schreiber GA, Helle N, Bogl KW. Detection of irradiated food-methods and routine applications *Int J Radiat Biol* 1993;63(1):105-30.
11. International Atomic Energy Agency. *Analytical detection methods for irradiated foods. A review of the current literature*. Vienna, Austria: IAEA; 1991. (IAEA-TECDOC-587).
12. Pettipher GL, Fulford RJ, Mabbitt LA. Collaborative trial of the direct epifluorescent filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk. *J Appl Bacteriol* 1983;54(2):177-82.
13. Pettipher GL, Rodrigues UB. Rapid enumeration of microorganisms in food by the direct epifluorescent filter technique. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44:809-13.
14. Holah JT, Betts RP, Thorpe RH. The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *J Appl Bacteriol* 1988;65(3):215-2.
15. Shaw BG, Harding CD, Hudson WH, Farr L. Rapid estimation of microbial numbers on meat and poultry by the Direct Epifluorescent Filter Technique. *J Food Prot* 1987;50:652-7.
16. Oger C, Hernandez JF, Delattre JM, Delabroise AH, Krupsky S. Study by epifluorescence of the fate of total bacterial flora in a bottled mineral water. *Wat Res* 1987;21(4):469-74.
17. Libersky DJA. Bacteriological examinations of chilled, cured canned pork hams and shoulders using a conventional microbiological technique and the DEFT method. *Int J Food Microbiol* 1990;19:19-22.
18. Betts RP, Farr L, Bankes P, Stringer MF. The detection of irradiated foods using the Direct Epifluorescent Filter Technique. *J Appl Bacteriol* 1988;64 (4):329-35.
19. Wirtanen G, Sjoberg AM, Boisen F, Alanko T. Microbiological screening method for indication of irradiation of spices and herbs: a BCR collaborative study. *J AOAC Int* 1993;76(3):674-81.
20. Sanderson DCW, Carmichael LA, Naylor JD. Recent advances in thermoluminescence and photostimulated luminescence detection methods for irradiated foods. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - current status*. Cambridge UK: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 139-48.
21. Sanderson DCW, Carmichael LA, Fisk S. Establishing luminescence methods to detect irradiated foods. *Food Sci Technol today* 1998;12(2):97-102.

## METODI BIOLOGICI DI IDENTIFICAZIONE

Orazio Sapora, Beatrice Di Carlo

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Scopo, limiti e vantaggi

Il DNA Comet Assay è un metodo di screening rapido è basato sulla elettroforesi di una singola cellula o nucleo per rilevare possibili frammentazioni del DNA presente nelle cellule dell'alimento provocate dal trattamento radiante (1-5). Non è un metodo specifico per le radiazioni, risultati positivi devono essere confermati impiegando un metodo standardizzato che possa convalidare specificatamente il trattamento radiante su quel tipo di alimento, poiché la frammentazione del DNA può essere prodotta anche da altri tipi di trattamento. Tuttavia anche in questi casi è possibile valutare, dalla distribuzione delle comete e dalla loro forma, se l'alimento è stato sottoposto a trattamento radiante.

Gli studi interlaboratorio per la validazione di questo metodo sono stati compiuti con successo su molti tipi di alimenti sia di origine animale che vegetale (6, 7). Sebbene esistano limitazioni alla sua applicabilità tuttavia questo metodo può essere impiegato per il controllo dell'avvenuto irraggiamento su una larga varietà di alimenti (5). Fino ad ora il Comet è stato applicato ad alimenti di origine animale, quali carne di pollo, anatra, quaglia, fagiano, maiale, manzo vitella, agnello, cervo, trota e salmone, e di origine vegetale quali mandorle, fichi, lenticchie, semi di soia, semi esotici, fragole, pompelmo, semi di sesamo, semi di girasole e pepe rosa. È necessario sottolineare che se il test è impiegato su un nuovo tipo di alimento questo deve essere preventivamente testato in condizioni standard controllate. Infatti la soluzione di lisi, il tempo di trattamento, l'elettroforesi e il tempo di corsa possono cambiare a seconda dell'alimento per poter ottenere una adeguata migrazione del DNA.

Poiché al momento la conoscenza sulla forma e la lunghezza della cometa in differenti alimenti è limitata è consigliabile prima di impiegare questa tecnica di valutazione provare differenti tipi di alimenti esposti e non esposti a radiazioni ionizzanti. Non è ancora chiaro l'effetto su questi test dell'immagazzinamento e della conservazione.

Un punto critico di questa tecnica è la preparazione della sospensione cellulare essendo un punto essenziale al test, il Comet può essere applicato solo su cellule. Per esempio per alcuni frutti come la papaya e il tamarindo un consistente fondo dovuto a frammenti di tessuto interferisce con il test per cui è necessario purificare ulteriormente la sospensione cellulare (8). Per alcuni prodotti è difficile se non impossibile ottenere una sospensione cellulare come per alcuni tipi di noccioli (8). Non è infine possibile usare il test su cibi, come gamberetti o carne di pollo, trattati con il calore che provoca forti alterazioni nella struttura delle cellule.

A seconda delle condizioni di conservazione della carne fresca, si può avere una naturale degradazione del DNA dovuta a specifici enzimi cellulari che provocano una frammentazione della molecola, stesso fenomeno si riscontra nel caso di ripetuti congelamenti e scongelamenti (9). In questi casi la forma e la lunghezza delle comete sono fortemente variabili, da comete simili a quelle di controllo a comete estese, a causa della presenza di cellule con differenti gradi di degradazione del DNA. Al contrario comete di cellule irraggiate mostrano una forma estesa e omogenea, solo in casi di avanzata degradazione enzimatica non è possibile decidere se un alimento è stato irraggiato o no.

Un altro limite della tecnica può essere una lisi insufficiente delle cellule che non permette al DNA di migrare liberamente fuori dal nucleo. Nei primi esperimenti si era notato che la

concentrazione di SDS (sodiododecilsolfato) dello 0,1% dava una lisi incompleta con risultati non costanti. Fu quindi stabilito che per cellule di origine animale una concentrazione del 2,5% era sufficiente per risolvere il problema (3). Per alcune cellule vegetali è necessario aumentare il tempo di lisi da 30 a 60 minuti. In generale le cellule vegetali sono più resistenti alle condizioni di lisi.

Per alcuni alimenti vi possono essere difficoltà nello stabilire se l'alimento è stato irradiato o no. Si può incontrare la stessa difficoltà nel caso di alimenti, come le cipolle e le patate, irradiati con basse dosi (3, 8). In questi casi possono essere utili più sofisticate tecniche di analisi di immagini, poiché la semplice osservazione della forma e della lunghezza delle comete può dare risultati incerti.

È altamente raccomandabile stabilire per ogni nuovo alimento, a cui si vuole applicare il test della cometa, il danno di fondo (background) presente in campioni non irradiati; è inoltre consigliabile confrontare i risultati ottenuti con campioni non irradiati e campioni irradiati con dosi note. Sebbene non sia necessaria la presenza di controlli negativi e positivi è tuttavia consigliabile far correre l'elettroforesi in presenza di un campione non irradiato e uno irradiato con una dose nota.

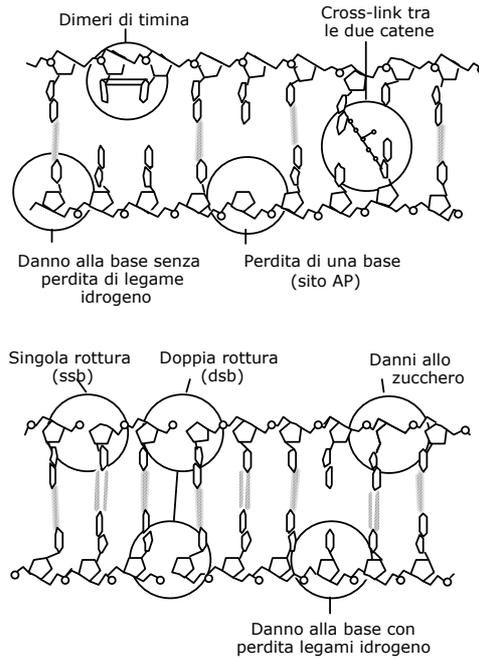
Il test sebbene sia stato validato per molti tipi di alimenti, lascia tuttavia aperte molte domande a cui è necessario dare una risposta. Per esempio l'influenza delle condizioni di trattamento e di conservazione, il dose-range entro cui il test può essere applicato e se è valido per tutta la vita dell'alimento.

## Principio di funzionamento

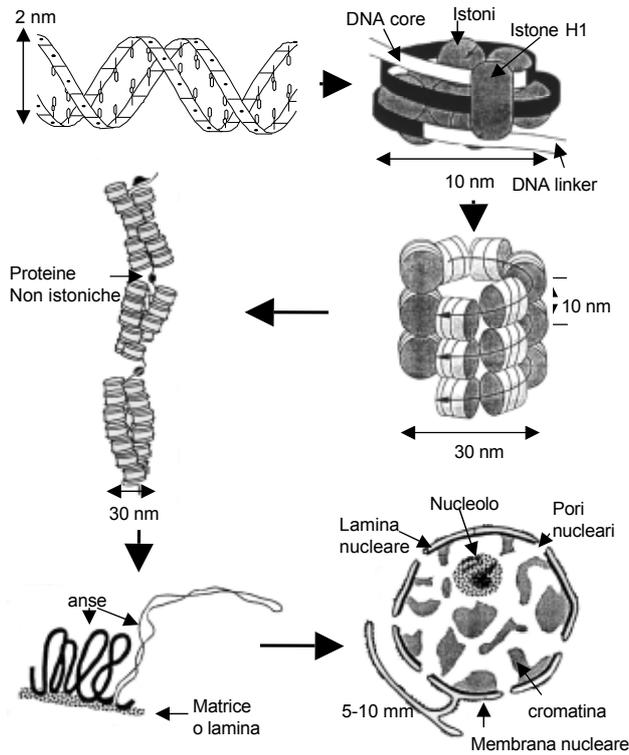
Numerosi agenti chimici e fisici possono produrre danni sulla molecola del DNA cellulare. Quando un alimento è trattato con radiazioni ionizzanti vengono prodotti sul DNA differenti classi di danno tra cui le singole (ssb= *single strand break*) e le doppie rotture (dsb=*double strand break*) della catena (Figura 1).

Questi due tipi di danno possono essere misurati con differenti tecniche come gradienti di saccarosio, colonnine di idrossipatite e eluzione. Recentemente è stata messa a punto la tecnica del Comet Assay una micro-elettroforesi di singole cellule o nuclei. Le cellule vengono incluse in una sottile matrice di agarosio posta su vetrini da microscopio, e lisate con un detergente per rimuovere le membrane. Durante l'elettroforesi i frammenti di DNA vengono estratti dal nucleo dal campo elettrico e migrano verso l'anodo formando una coda caratteristica, che ricorda quella di una cometa, la cui lunghezza è funzione della dose (10, 11). Il protocollo del Comet prevede due differenti condizioni di pH, alcalino (pH > 12), per la misura delle ssb e siti alcali labili (1), e neutro (pH 8) per le dsb (12).

In condizioni neutre in teoria sono misurabili solo le doppie rotture tuttavia le singole rotture anche in condizioni neutre possono esercitare una forte influenza sulla forma della cometa e ciò è dovuto al rilassamento indotto dai danni singoli del DNA super-avvolto. Il DNA all'interno del nucleo è organizzato in differenti livelli di complessità (Figura 2). La doppia elica con avvolgimento a spirale è avvolta intorno ad un rocchetto di proteine, gli istoni, formando il nucleosoma. Questa catena di nucleosomi a sua volta è organizzata in solenoidi e fibre più o meno complesse e condensate che formano anse di fibra cromatinica (*loop*) ancorate alla lamina e alla matrice nucleare. Quando le cellule, incluse in una matrice di agarosio, vengono sottoposte a lisi, i *loop* vengono liberati rimanendo però ancorati alla struttura nucleare. Il trattamento con radiazioni ionizzanti produce rotture sulla catena liberando i *loop* e frammenti di *loop*, i quali, sotto l'azione di un campo elettrico, sono liberi di migrare verso l'anodo.



**Figura 1. Rappresentazione schematica delle differenti classi di danno prodotte dalle radiazioni ionizzanti sulla molecola del DNA**



**Figura 2. Rappresentazione schematica dell'organizzazione su successivi e più complessi livelli della cromatina nel nucleo di cellule di mammifero**

Cellule non irradiate, in cui il DNA dei *loop* non presenta danni, mostreranno, al contrario di cellule irradiate, comete molto compatte e corte (Figura 3).

A causa delle dosi relativamente alte impiegate in campo alimentare, che producono un alto numero di danni, il test della cometa deve essere eseguito a pH neutro, a basso voltaggio e con tempi di elettroforesi brevi.

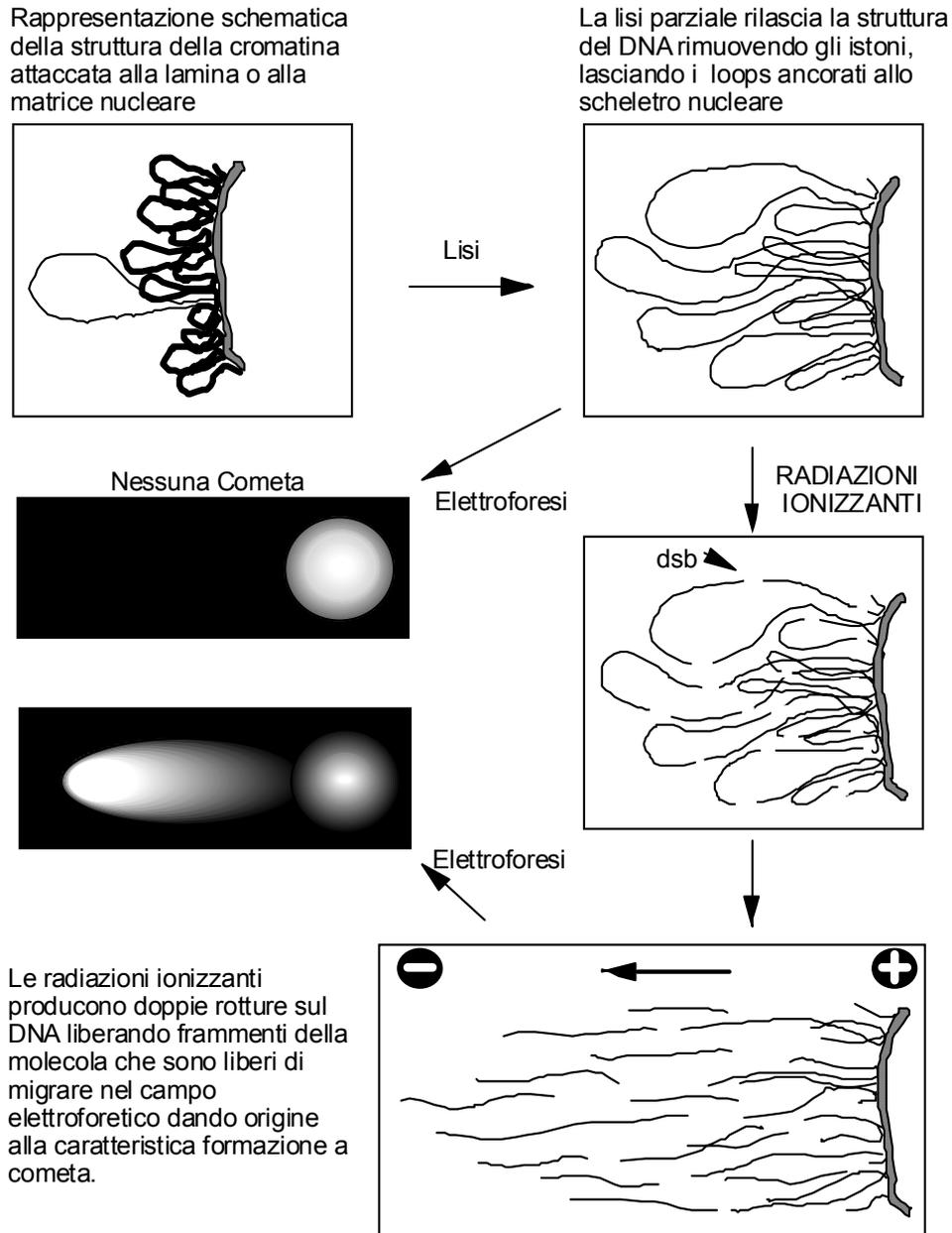


Figura 3. Rappresentazione schematica dell'effetto del campo elettrico sul DNA di nuclei non trattati o trattati con radiazioni ionizzanti

## Standard CEN: EN13784:2001

### **Foodstuffs – DNA Comet Assay for the detection of irradiated foodstuffs – Screening method**

La descrizione del metodo segue le indicazioni riportate nel protocollo EN 13784 della Comunità Europea.

#### **Reagenti**

Tutti i reagenti devono essere di grado analitico e l'acqua impiegata almeno di grado 1 secondo il protocollo EN Iso 3696.

La colorazione del DNA può essere eseguita in due differenti modi o impiegando un composto fluorescente per cui è necessario un microscopio a fluorescenza o con la colorazione argento (*silver staining*) per cui è sufficiente un normale microscopio.

#### **Procedura**

La descrizione dettagliata della procedura è riportata nel protocollo EN 13784. Qui di seguito vengono solo riportati e commentati i punti critici del metodo che l'eventuale operatore deve tenere presente.

##### *a) Preparazione della sospensione cellulare*

Per una corretta esecuzione del test è necessaria una sospensione monocellulare e una corretta distribuzione delle cellule sul vetrino. Nel caso di un numero di cellule troppo alto le comete tendono a sovrapporsi dando problemi per una corretta identificazione. Una corretta concentrazione è compresa tra  $5$  e  $10 \times 10^4$  cellule per mL. Per ottenere il numero necessario è possibile contare il numero di cellule della sospensione con una camera contaglobuli, ciò permette inoltre di controllare, per osservazione diretta, se la sospensione è monocellulare o se sono presenti aggregati cellulari. La sospensione cellulare può essere mantenuta a  $0^\circ\text{C}$  fino al momento dell'uso possibilmente per un tempo non superiore a 15 minuti. Aggiungendo DMSO (5-10%), come protettore dal congelamento, è possibile conservare la sospensione a  $-18^\circ\text{C}$  per lunghi periodi. È regola generale che tutte le operazioni siano svolte alla temperatura di  $4^\circ\text{C}$ , mantenendo le soluzioni e i recipienti in uso in ghiaccio. I metodi per ottenere una sospensione cellulare da un tessuto possono variare in funzione della consistenza e resistenza alla disgregazione meccanica del tessuto stesso. Il midollo osseo del pollo, un tessuto poco consistente, può essere raccolto dall'osso della coscia, circa 50-100 mg, trasferito in PBSS freddo e disgregato con l'aiuto di una bacchetta di vetro con punta arrotondata. La sospensione così ottenuta deve essere poi filtrata prima dell'uso con filtro di nylon da 100 micron di diametro. Quando si ha un tessuto più consistente, come un tessuto muscolare, sono necessarie più operazioni. Il campione privo di grasso deve essere sminuzzato con un bisturi, trasferito in PBSS freddo e omogeneizzato a freddo a 500 rpm per 5 minuti. La sospensione così ottenuta deve essere filtrata prima attraverso un filtro a 500 micron e poi a 200 micron e lasciata a sedimentare per 5 minuti. La parte superiore della sospensione viene prelevata e impiegata per il test. Nel caso di tessuti di origine vegetale la parte iniziale della procedura di isolamento può variare notevolmente. Per esempio i semi devono essere prima disgregati mediante l'uso di un mortaio e i frammenti così ottenuti trasferiti in un becker con PBSS freddo. La sospensione deve essere omogeneizzata,

filtrata attraverso filtri di nylon da 200 e 100 micron e lasciata a sedimentare. Si impiega per il test la parte superiore della sospensione. Per le patate invece non è necessario l'impiego di un mortaio, si tagliano con un bisturi fettine sottili che poi vengono omogeneizzate. È bene tenere presente che le procedure di isolamento, caratterizzate da un alto numero di passi o da violenti stress fisici, tendono a dare sospensioni cellulari con un alto background dovuto all'alto numero di nuclei frammentati. Un alto background può seriamente influenzare l'attendibilità del test.

b) *Preparazione dei vetrini*

Particolare attenzione deve essere posta nella preparazione dei vetrini da impiegare nell'elettroforesi (sistema di *precoating*). Prima di poter essere impiegati devono essere tenuti in metanolo per tutta la notte e successivamente rimossi senza toccare la superficie e lasciati asciugare all'aria. I vetrini puliti, per aumentare l'adesione del gel contenete le cellule, vengono ricoperti con un primo strato di agarosio (0,05 mL di agarosio 0,5%), e lasciati asciugare all'aria per 30 minuti. Così preparati i vetrini possono essere conservati lontano dalla polvere per settimane. Le cellule vengono sospese in una soluzione di agarosio Low Gelling Point (0,7% finale) e poi trasferite sui vetrini preparati. Molta attenzione deve essere posta nel distribuire in maniera omogenea la sospensione cellulare sulla superficie del vetrino. Questo può essere ottenuto ponendo un vetrino coprioggetto di opportune dimensioni sull'agarosio, contenente la sospensione cellulare, prima che esso si solidifichi. Si lascia a 4°C per 15 minuti circa e si rimuove il coprioggetto. Più vetrini possono essere preparati in parallelo da un singolo campione o da più campioni.

c) *Lisi delle cellule*

I frammenti di DNA possono migrare fuori dal nucleo solo se la membrana e gli istoni sono rimossi. Questo può essere ottenuto con la lisi della cellula che si ottiene immergendo i vetrini in una soluzione contenente un detergente. È critica la durata della lisi in generale sono più brevi nel caso di cellule animali e più lunghi nel caso di cellule vegetali. Una lisi troppo lunga può dare comete anche nei controlli non trattati.

d) *Elettroforesi*

I vetrini vengono posti nelle camere per elettroforesi e ricoperti con il tampone di corsa, 3-4 mm al disopra della superficie del vetrino. Dopo 5 minuti di condizionamento si esegue la corsa al voltaggio di 2 v/cm per due minuti a temperatura ambiente. Al termine della corsa si rimuovono attentamente i vetrini che vengono posti su un vassoio lavati con acqua e lasciati ad asciugare all'aria o in stufa a 45°C. I vetrini così essiccati possono esser conservati per lungo tempo prima di essere colorati, letti e valutati.

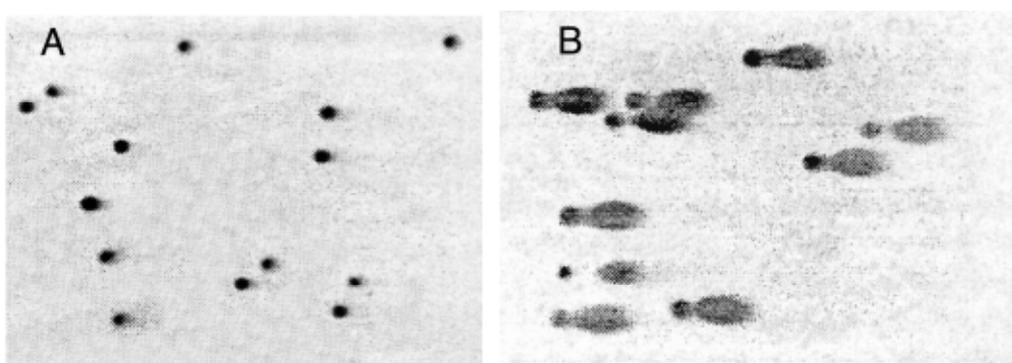
e) *Colorazione*

Come già detto il DNA può essere colorato con due differenti tecniche. La prima, probe fluorescente, è più rapida e immediata tuttavia richiede un microscopio a fluorescenza più dispendioso di un normale microscopio, mentre al seconda richiede l'impiego di un normale microscopio ma la tecnica è più lunga da eseguire. Se si usa il probe fluorescente i vetrini devono essere colorati immediatamente prima dell'osservazione poiché con il tempo la fluorescenza decade. Al contrario la colorazione con argento è stabile nel tempo. Occorre notare tuttavia che nel caso dei vetrini colorati con il probe fluorescente, possono essere lavati con etanolo, essiccati, conservati e ricolorati con lo stesso probe.

In Figura 4 sono riportate le microfotografie di comete ottenute da cellule estratte da petto di tacchino surgelato non irradiato (A) e irradiato con 2 kGy (B). Le comete del campione irradiato

appaiono più lunghe e più omogenee nella loro forma di quelle ottenute con il campione surgelato, infatti nel controllo appaiono comete più o meno lunghe e immagini di nuclei intatti.

Una raccomandazione generale da tenere ben presente è che ogni volta che si deve eseguire un test della Cometa su campioni di un alimento precedentemente non impiegato e di cui non si conoscono le caratteristiche di corsa, è necessario prima mettere a punto la tecnica variando le condizioni di preparazione, lisi e di corsa impiegando campioni dello stesso alimento non trattati e trattati con una dose nota di radiazioni ionizzanti.



**Figura 4. Microfotografia di comete di DNA ottenute da carne di manzo congelata non trattata (A) o trattata (B) con 7 Gy di radiazioni ionizzanti (le comete sono state colorate con il *silver staining*; l'anodo è a destra e l'obiettivo del microscopio impiegato è un 20x (Estratto autorizzato della norma UNI EN 13784 © UNI, Milano)**

## Validazione

Il protocollo descritto nel EN13784 è basato su studi interlaboratorio su alimenti sia di origine animale (6, 7, 13) che vegetale (3, 14). Un test interlaboratorio organizzato dalla *Swedish National Food Administration* ha coinvolto nove differenti laboratori che hanno analizzato tre differenti tipi di sospensioni cellulari codificate costituite da midollo osseo di pollo e tessuto muscolare di pollo e di maiale trattati o non trattati con radiazioni ionizzanti. Le dosi di radiazioni variavano da 0 a 5 kGy. Dei 162 campioni sono stati ottenuti risultati validi da 148, di cui 138 correttamente identificati. Alcuni dei laboratori coinvolti non avevano molta esperienza con questa tecnica e sebbene insieme ai campioni codificati siano stati inviati campioni di controllo irradiati con dosi conosciute, alcuni laboratori hanno trovato difficoltà con questo nuovo metodo.

Un ulteriore trial è stato condotto con differenti alimenti di origine vegetale, come mandorle, fichi, lenticchie, pepe e altri (3). I campioni codificati erano stati irradiati con 0,2, 1, e 5 kGy o non irradiati. Anche in questo caso insieme è stato inviato un gruppo di campioni trattati con dosi conosciute come riferimento. Quattro laboratori hanno partecipato al programma. Dei 78 campioni inviati ne sono stati identificati correttamente 74, cioè il 95%.

Il protocollo EN raccomanda di compilare il rapporto finale sui test eseguiti riportando le seguenti indicazioni:

- a) informazioni per l'identificazione del campione;
- b) riferimento allo standard europeo;

- c) risultato del test;
- d) data e procedura della campionatura;
- e) data di ricevimento;
- f) data di esecuzione del test;
- g) ogni osservazione di ciò che è avvenuto durante l'esecuzione del test;
- h) ogni operazione non contemplata nel protocollo o considerata come possibile che possa aver influenzato l'esecuzione del test;
- i) una documentazione dei risultati sotto forma di microfotografie o immagini prese con una telecamera e programma di analisi di immagine.

## Conclusioni

Il Comet Assay è un test rapido di screening basato sull'elettroforesi del DNA di una singola cellula. Rileva possibili frammentazioni di questa macromolecola prodotte dal trattamento radiante. Non è un metodo specifico in quanto altri agenti sia fisici che chimici possono produrre simili frammentazioni. Per questo gli eventuali risultati positivi devono essere confermati impiegando un metodo standardizzato specifico. È un test di larga applicabilità che presenta tuttavia punti critici nella preparazione della sospensione monocellulare, nella lisi e nel tempo di elettroforesi. Per questo è necessario, prima della sua applicazione, standardizzare le condizioni per lo specifico alimento da controllare.

## Bibliografia

1. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical Biophysical Research Communication* 1984; 123:291-8.
2. Johanson KJ. The microelectrophoresis method, a method for determination of irradiated food. In: Raffi JJ, Belliardo JJ (Ed). *Potential new methods of detection of irradiated food*. BCR-Information. Luxembourg: Commission of the European Community; 1991. p. 52-54. (Report EUR/13331/en).
3. Cerda H, Delincè H, Haine H, Rupp H. The DNA comet assay as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutation Research* 1997; 375:167-81.
4. McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay: a European review. *Mutation Research* 1993;288:47-63.
5. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 1995;339:37-59.
6. Delincè H. Application of the DNA comet assay to detect irradiation treatment of foods. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray EM, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods - current status*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 349-54.
7. Cerda H. Detection of frozen irradiated meat with the comet assay. Interlaboratory test. *Journal Sci Food Agric* 1998;76:435-442.
8. Khan AA, Delincè H. DNA comet assay for detection of irradiated food: 5. Deutsche Tagung Lebensmittelbestrahlung. In: Ehlermann DAE (Ed.). *Bericht der Bundesforschungsanstalt für Ernährung*. Karlsruhe: Bundesforschungsanstalt für Ernährung, BFE; 1998. p. 98-104.
9. Cerda H, Koppen G. DNA degradation in chilled fresh chicken studied with the neutral comet assay. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1998;207:22-5.
10. Kent CRH, Eady JJ, Ross GM, Steel GG. The comet moment as a measure of DNA damage in the comet assay. *International Journal of Radiation Biology* 1995;67:655-60.

11. Hellman B, Vaghef H, Bostrom B. The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 1995;336:123-31.
12. Delincée H. Comet assay for rapid detection of irradiated food. *Acta Alimentaria* 1996;25:319-21.
13. Haine H, Cerda H, Jones JL. Microgel electrophoresis of DNA to detect irradiation of foods. *Sci Technol Today* 1995;9:139-40.
14. Haine H, Cerda H, Jones JL. Detecting irradiation of seeds using microgel electrophoresis (a collaborative trial). Campden & Chorleywood Food Research Association, R&D report n. 10. 1995 MAFF Project n. 19456, 1-16.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, settembre 2004 (n. 3) 9° Suppl.*