

A. LAI, A. PALUCCI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati, Roma

**S. ALMAVIVA, L. CANEVE, R. CHIRICO
L. FIORANI, V. LAZIC, V. SPIZZICHINO, A. PUIU**

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati, Roma

INDAGINE SPETTROSCOPICA NON DISTRUTTIVA SU CAMPIONI DI RISO E TESSUTO DI OSTRICA PER METROFOOD

RT/2018/19/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

A. LAI, A. PALUCCI

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati, Roma

S. ALMAVIVA, L. CANEVE, R. CHIRICO
L. FIORANI, V. LAZIC, V. SPIZZICHINO, A. PUIU

Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare
Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute
Laboratorio Diagnostica e Metrologia
Centro Ricerche Frascati, Roma

INDAGINE SPETTROSCOPICA NON DISTRUTTIVA SU CAMPIONI DI RISO E TESSUTO DI OSTRICA PER METROFOOD

RT/2018/19/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina www.enea.it

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

INDAGINE SPETTROSCOPICA NON DISTRUTTIVA SU CAMPIONI DI RISO E TESSUTO DI OSTRICA PER METROFOOD

Antonia Lai, Antonio Palucci, Salvatore Almaviva, Luisa Caneve, Roberto Chirico, Luca Fiorani, Violeta Lazic, Valeria Spizzichino, Adriana Puiu

Riassunto

Il Laboratorio Diagnostiche e Metrologia (DIM) del Dipartimento FSN-TECFIS dell'ENEA ha, tra i suoi obiettivi, lo sviluppo di strumentazioni spettroscopiche per la diagnostica precoce e non distruttiva nonché la sua applicazione in numerosi campi quali agroalimentare, sicurezza ed ambiente. Nell'ambito della Infrastruttura Europea sul Food (METROFOOD) coordinata da ENEA BIOAG del Dipartimento SSPT l'utilizzo delle metodologie sviluppate possono contribuire ad una diagnostica sinergica in quanto si affianca al portfolio di strumentazione già prevista nel progetto. Le misure sono state eseguite su campioni di riso e tessuto di ostrica forniti dal progetto ma che possono essere sviluppate per applicazioni industriali. I risultati ottenuti incoraggiano e confermano l'utilizzo delle tecniche spettroscopiche utilizzate, in quanto si sono dimostrate versatili ed utili per la diagnostica e la caratterizzazione non distruttiva dei prodotti studiati. Si propone anche lo sviluppo di strumenti dedicati al controllo della filiera agro-alimentare, in funzione della necessità e della matrice da analizzare.

Parole chiave: Filiera agroalimentare, controllo di qualità, monitoraggio precoce, non distruttivo spettroscopia laser.

Abstract

The development of innovative instruments for early and non-destructive detection in agro-food field is one of the objectives for Diagnostics and Metrology Laboratory (DIM) of the FSN TECFIS Department of ENEA. In the framework of the European Infrastructure for promoting METROlogy in FOOD and nutrition (METROFOOD) lead by ENEA BIOAG -SSPT Department, the physics technologies can be useful tools, together with the portfolio instrumentation already available in the project, for a more comprehensive monitoring of food quality. The results obtained on Rice and Oyster, provided by the project, encourage and confirm the advantageous use of that technologies, for their adaptability and, mainly, for their peculiarities of early and non-destructive detection. The development of specific tools for the quality control in the agro-food chain is also proposed.

Keywords: Agro-food chain, quality control, early detection, no destructive detection, laser spectroscopy.

INDICE

1 Introduzione	7
2 Metodologia	10
3 Discussione	11
4 Conclusioni e prospettive	13
1. Annex 1 – Misure Raman	14
2. Annex 2 Misure FT-IR	22
3. Annex 3-Misure LPAS	28
4. Annex 4 Misure LIBS	33
5 Ringraziamenti	48
6 Bibliografia	48

1 Introduzione

Nell'ambito della Infrastruttura Europea sul Food, denominata METROFOOD e coordinata da ENEA BIOAG-SSPT, il Laboratorio Diagnostica e Metrologia (DIM) del Dipartimento FSN-TECFIS, vista l'esperienza maturata nel tempo nella diagnostica non distruttiva, ha voluto proporsi per incrementare ed affiancare la strumentazione già prevista nel progetto, con la metodologia spettroscopica e la strumentazione a disposizione nel proprio laboratorio.

Lo sviluppo di sistemi diagnostici precoci e non distruttivi da utilizzare nel campo agroalimentare è uno degli obiettivi del Laboratorio DIM. La partecipazione a questa iniziativa permetterà, non solo di soddisfare le richieste di METROFOOD, ma anche di migliorare, così, le proprie tecnologie. In particolare, i sensori che vengono sviluppati in DIM, sono basati sulla tecnologia laser, di cui sfruttano le peculiarità e le proprietà elettrotiche, che si riflettono, poi in elevata capacità di analisi, discriminazione, sensibilità, possibilità di effettuare misure a distanza e risposta in tempo reale sui campioni tal quali.

In Tabella 1 sono riportate le metodologie e le tecnologie spettroscopiche implementate ed utilizzate nel range di misura delle sorgenti laser, che vanno dall'ultravioletto all'infrarosso termico (da circa 250 a 12000 nm).

Spettroscopia di Fluorescenza	Apparato LIF (Laser Induced Fluorescence)
Spettroscopia Atomica	Apparato LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)
Spettroscopia Raman	Sistema Laser Raman
Spettroscopia Fotoacustica	Apparato LPAS (Laser PhotoAcoustic Spectroscopy)

Tabella 1 - Le metodologie di indagine spettroscopica e tecnologie implementate in METROFOOD

I sensori sviluppati da DIM sono stati utilizzati in varie campagne esterne, in Italia ed all'estero, ed in diversi campi di applicazione: dal controllo ambientale, ai Beni Culturali passando per i sensori per la Security. Questi sensori, essendo ad ampio spettro, si sono dimostrati adatti anche alla rilevazione di parametri di interesse in campo agroalimentare, per il controllo della qualità degli alimenti. DIM, infatti, negli anni è stato coinvolto in progetti PON e in quelli di Industria 2015, sia per la individuazione della migliore metodologia per la diagnostica precoce e non distruttiva di patologie non visibili di ortofrutta, dal momento della raccolta fino al carico per il trasporto che sulla individuazione di contaminazione sugli alimenti. I risultati ottenuti sono stati importanti per il controllo della qualità sia in riferimento alla conservazione lungo la filiera, anche

in post-raccolta [1; 2; 3] sia per la tracciabilità di prodotti sani inclusi i parametri nutritivi [4, 5; 6]. L'esperienza ha permesso quindi di sviluppare conoscenze tecnologiche anche in campo agroalimentare.

Negli ultimi 20 anni l'applicazione delle tecniche ottiche e spettroscopiche ha dimostrato la sua efficacia anche nel post packaging lungo la catena di distribuzione, proprio per la non invasività e la possibilità di monitorare in continuo le sostanze che possono essere rilasciate, incidendo sul valore nutrizionale dell'alimento [7]. L'utilizzo di queste tecniche, però, è ancora confinato nei laboratori o nelle grandi industrie. Il loro sviluppo tecnologico, finalizzato ad una semplificazione dei sistemi, per aumentarne la maneggevolezza e la facilità di utilizzo lungo la filiera, è, quindi, uno degli obiettivi degli ultimi anni. Esistono già in commercio esempi, pochi, di dispositivi che sono in grado di rilevare in maniera non distruttiva la qualità della frutta [7; 8]. Aumentare il range di applicazione anche ad altri prodotti agroalimentari, è importante ed è uno degli obiettivi del Laboratorio DIM.

Si è deciso quindi di iniziare la collaborazione con METROFOOD analizzando i campioni forniti dalla Divisione SSPT-BIOAG di Casaccia, quali:

1. Riso, sia in grani che in farine, proveniente dall'Ente Risi
2. Tessuto liofilizzato di Ostrica, originario dell'Oceano Atlantico (Francia)

Il riso (*Oryza sativa* L.) è uno degli alimenti base per gran parte della popolazione mondiale e per questo è il cereale più diffuso al mondo. L'Italia è tra i principali produttori Europei, insieme a Francia e Spagna, mentre i paesi orientali coprono più del 90% della produzione mondiale (fonte FAO 2016). Esistono più di 10.000 varietà di riso, e solo in Italia ci sono 126 tipi di riso registrati di cui più di 50 sono coltivate.

Il riso si suddivide in tre tipi: *Japonica* dal chicco corto e tondo (p.e Carnaroli, Arborio ecc), *Indica* dai chicchi lunghi e sottili (Basmati, Long thai) e *Javanica* poco conosciuta, dai chicchi larghi e piatti, diffusa nell'isola di Giava, da cui il nome. Per poter essere commercializzato il riso deve subire diverse lavorazioni, la prima delle quali e più importante, è la *pilatura*, così il risone (riso grezzo che si ottiene dopo la trebbiatura) viene pulito dalla lolla e dalla pula. A questa prima lavorazione fa seguito la *sbiancatura* che, eliminando la pellicola che riveste il chicco e gli strati più interni (ricchi in vitamine e sali minerali), lo rendono più bianco e più concentrato in amido. Il riso integrale non subisce questa lavorazione ed è quindi più ricco oltre che di fibre, anche di vitamine e minerali [9; 10].

L'ostrica è un mollusco che appartiene alla famiglia delle *Ostreidae* ed è uno dei più conosciuti e allevati animali marini. Si distinguono diverse specie tra cui la *Ostrea edulis*, del mar Mediterraneo, la *Cassostrea angulata* specie portoghese e la *Crassostrea gigas* endemica delle coste asiatiche dell'Oceano Pacifico, ma ormai allevata anche in Europa soprattutto in Francia. L'ostrica è un importante fonte di acidi grassi polinsaturi e di zinco, ferro e calcio.

Per un corretto confronto anche con materiale certificato, le misure sono state eseguite, oltre che sui materiali forniti da SSPT –BIOAG, anche su due standard:

- Standard NIST (National Institute of Standards and Technology) di farina di riso
- Standard ERM-CE278k di liofilizzato di tessuto di cozza

Inoltre, per evidenziare eventuali differenze tra differenti campioni, sia per quanto riguarda il riso in grani che in farine, le misure sono state confrontate inoltre con grani e farine di altre varietà di riso commerciali. Per i tessuti di Ostrica, invece, si è analizzato solo il campione di METROFOOD e confrontato con lo standard di Cozze liofilizzate. In tabella 2 sono riassunti sia le tecniche utilizzate che i campioni misurati per ogni tecnica.

Campione	Tecnologia Utilizzata				
	Raman	LIBS	FT-IR (ATR)	LPAS	LIF
RISO CHICCHI					
METROFOOD	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Riso Basmati E	Sì	---	Sì	Sì	--
Riso Carnaroli	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Riso Integrale C	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Riso Venere	(Campione bruciato)	Sì	---	--	--
Riso Basmati C	Sì	Sì	Sì		Sì
RISO FARINE					
METROFOOD	Sì	No	Sì	Sì	--
Riso Basmati C	Sì	No	Sì	--	Sì
Riso Basmati E	Sì	No	--	Sì	Sì
Riso Carnaroli	Sì	No		Sì	Sì
Riso Integrale C	Sì	No	Sì	--	Sì
Riso Venere	---	No		--	--
OSTRICA LIOFILIZZATA (METROFOOD)	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Standard farina di riso (NIST)	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Standard di tessuto di cozza liofilizzata (ERM CE278K)	Sì	Sì			Sì

Tabella 2 - Strumenti e campioni utilizzati nell'indagine di METROFOOD.

Come verrà ricordato nel seguito, si è preferito dare subito un quadro di insieme dei risultati di discriminazione rimandando la consultazione delle singole misure acquisite con le varie tecniche alle relative appendici.

2 Metodologia

L'approccio utilizzato in questa indagine, proprio per le caratteristiche delle tecnologie adottate e riportate in Tabella 1, ha permesso di analizzare i campioni tal quali senza manipolazioni. E' evidente che tutte queste tecnologie forniscono informazioni differenti ma complementari. Ad esempio LIBS e LIF, anche se assegnano informazioni nello stesso dominio spettrale, non contengono le stesse informazioni strutturali (atomiche, molecolari, ecc). Così le tecniche di spettroscopia molecolare risultano spesso integrabili una all'altra, e.g non tutte le sostanze attive al Raman hanno spettri di fluorescenza e viceversa.

Spesso si riesce a discriminare all'interno di uno spettro complesso il segnale indicativo della presenza di uno specifico elemento chimico o gruppo funzionale molecolare, ma più spesso si ricevono informazioni più complesse che fungono da impronta digitale del materiale analizzato e che occorre trattare con algoritmi numerici o con metodi statistici di data mining. Mentre il primo approccio cerca di estrarre le bande/linee spettrali corrispondenti a valori tabellati in banche dati ottenute a partire da sostanze di riferimento, con algoritmi di estrazione e confronto (reti neurali o simili), i metodi statistici di tipo chemometrico, quali p.e. Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Square regression (PLSr) e altre, cercano di estrarre da un grande numero di variabili, quelle non correlate tra loro e più significative per la discriminazione dei materiali in studio.

In particolare, per esempio, mentre per la LIBS è possibile identificare all'interno dello spettro di emissione elettronica, i segnali relativi a singoli elementi chimici (nella forma neutra o ionica) costituenti la superficie analizzata, e ciò grazie al fatto che i picchi sono spesso molto stretti e ben risolti spettralmente tra loro, per le altre tecniche si ottengono informazioni spettrali spesso non identificabili univocamente. Anche nel caso della spettroscopia Raman frequentemente le bande di emissione sono strette e riconducibili a specifici metaboliti o molecole, ma trattandosi di materiali complessi, quali sono i materiali biologici, il gran numero di segnali presenti nel range spettrale fa sì che essi risultino spesso parzialmente sovrapposti e non del tutto risolti, complicando, in tal modo, l'interpretazione dello spettro ottenuto. Tale situazione è ancora più frequente ed evidente per tecniche come la LIF, in cui la larghezza ed in numero delle bande presenti fa sì che esse non siano sempre facilmente leggibili ed univocamente assegnabili. In tutti questi casi l'analisi delle componenti principali (PCA) diventa essenziale per la classificazione dei campioni.

E' per questi motivi che, mentre per la LIBS è stato possibile presentare anche una tabella degli elementi identificati, per le altre tecniche, si è ricorsi all'uso della PCA.

Discussione

Come accennato nell'introduzione, l'ipotesi iniziale di lavoro era quella di dimostrare se le tecniche ottiche di DIM fossero in grado di discriminare vari campioni simili da quello fornito da METROFOOD con le peculiarità proprie di essere tecniche non invasive, non distruttive, a distanza e senza manipolazione del campione. Riporteremo qui subito i risultati ottenuti in una tabella sinottica mentre verranno descritti nel dettaglio nelle sezioni specifiche dedicate alle singole tecniche.

In particolare nella

abbiamo riportato la capacità discriminativa di ogni singola tecnica implementata nell'analisi dei campioni METROFOOD, per le varie matrici, dalla quale emerge un risultato sicuramente incoraggiante per il riso mentre è più delicata la situazione dei molluschi. Andiamo a riassumere, tecnica per tecnica le problematiche incontrate.

Tecnologia	Campione/Matrice		
	RISO GRANI	RISO FARINE	MOLLUSCHI LIOFILIZZATI
Raman	Sì	Sì	No
LIBS	Sì	----	Sì
LPAS	Sì	Sì	
LIF	No	Sì	

Tabella 3 – Tavola sinottica tecnologie DIM e campioni METROFOOD

Per quanto che riguarda i **grani di riso** delle diverse varietà, messe a confronto col campione METROFOOD, la tecnica **Raman** (*Annex 1 – Misure Raman*) ha mostrato capacità discriminante, sia nelle varietà dei risi raffinati, dovute presumibilmente soprattutto al contenuto in amilosio e amilopectina [11; 12], principale componente presente sulla superficie del grano, che nel riso integrale. Quest'ultimo si differenzia spettralmente rispetto a tutti gli altri proprio per il suo contenuto in crusca e germe maggiore, e una più alta concentrazione delle vitamine del gruppo B [13]. Confrontando poi la varietà Carnaroli, classificato come superfino, con il Riso METROFOOD, di cui non si conosce la varietà, ma il grano è simile al tipo superfino, si osservano differenze in corrispondenza delle bande assegnate all'amilosio e all'amilopectina [12]. La PCA ha confermato il risultato spettrale sia, ovviamente, sul riso integrale, che sui campione di riso raffinato, separando il campione METROFOOD (assunto come incognito) da tutti gli altri.

La tecnica **LPAS** (*Annex 3-Misure LPAS*) abbinata all'analisi statistica PCA, ha permesso di separare con successo i gruppi di campioni delle diverse varietà. In particolare, il campione METROFOOD si separa molto bene rispetto alla varietà Carnaroli, morfologicamente simile, ma probabilmente con un contenuto metabolico differente.

Le emissioni spettrali osservate con la tecnica **LIBS** (*Annex 4 Misure LIBS*), specifiche per ogni elemento presente nei diversi campioni di riso analizzato, hanno permesso di rilevare un contenuto di manganese, silicio e di sodio anche 10 volte superiore nel riso integrale, rispetto agli altri. Anche l'analisi del profilo elementare nel grano, dalla superficie fino al centro, ha dimostrato una riduzione degli stessi tranne per il carbonio e lo stronzio. I risultati elaborati con la PCA, hanno evidenziato una separazione netta del campione METROFOOD rispetto a tutte le altre varietà di riso prese in esame.

Tutti i campioni analizzati con la tecnica LIF (*Annex 5 Misure LIF*) presentano spettri di fluorescenza simili, sia in riferimento alla posizione delle bande principali di emissione che alla loro intensità relativa. Ciò nonostante, anche in questo caso, l'applicazione della PCA ai dati raccolti ha permesso di separare in 4 gruppi distinti le varietà misurate. La tecnica ha inoltre dimostrato la sua elevata sensibilità, rilevando in alcuni dei risi raffinati, una debole emissione in corrispondenza del picco di emissione della clorofilla. Visto che si tratta di riso raffinato, questo risultato è dovuto probabilmente a contaminazioni delle lavorazioni industriali, ma sottolinea la elevata sensibilità della tecnica.

Il confronto tra **le farine**, ottenute dagli stessi grani di riso analizzati precedentemente e il campione METROFOOD fornito già come farina, ha evidenziato profili spettrali **Raman** (*Annex 1 – Misure Raman*) sovrapponibili, tranne per la farina integrale, come aspettato. Le differenze sono meno evidenti rispetto a quelle osservate nei grani. Questo è dovuto probabilmente alla macinatura che mescola i composti biochimici che si trovano all'esterno del chicco, con quelli presenti nelle strutture interne, comuni anche al raffinato (embrione ed endosperma). Il confronto con lo standard fornito da NIST ha evidenziato, soprattutto grazie alla PCA, differenze tra le varietà che raggruppano nettamente, confermando in parte i risultati osservati sui chicchi. Infatti anche il campione di farina Carnaroli è significativamente diverso dal campione di farina METROFOOD.

I risultati degli spettri ottenuti misurando le farine tra gli 8.3 e gli 11 μm , con **LPAS** (*Annex 3-Misure LPAS*) evidenziano piccole differenze in intensità di assorbimento, come confermato anche dalla PCA dove il campione METROFOOD e lo standard NIST sono separati dagli altri campioni.

Lo Standard di farina di riso NIST misurato con la **LIBS** (*Annex 4 Misure LIBS*) ha confermato la presenza dei principali elementi certificati ed è stato in grado di rilevare anche alcuni contaminanti in tracce (Si, Ti) nonostante il limite di rilevamento (LOD) corrisponda a $S/N \approx 3$.

Lo spettro di emissione di fluorescenza **LIF** (*Annex 5 Misure LIF*) mostra diverse bande per ogni campione. Infatti, non si osserva più la banda della clorofilla perché, come osservato per i metaboliti misurati con la tecnica Raman, la macinatura mescola i metaboliti profondi rispetto a quelli esterni e quindi attenua il risultato della misura che è appunto di superficie e/o dovuto a contaminazioni.

Per quello che riguarda il campione di tessuto liofilizzato di *Ostrica* confrontato con lo standard ERM CE 278 K di tessuto liofilizzato di *Cozza*, la misura di spettroscopia **Raman** ha evidenziato due picchi a 1082 e 1470 cm^{-1} solo nello standard.

L'intensa emissione di fluorescenza copre eventuali altri deboli segnali. Inoltre, si sono osservate differenze soprattutto nel contenuto elementale (**LIBS**) e come emissione di fluorescenza (**LIF**) sia nelle lunghezze d'onda che corrispondono ai contenuti proteici che di presenza della clorofilla (filtratori in acqua).

Sono state eseguite misure anche con FT-IR, (*Annex 2 Misure FT-IR*) e i risultati ottenuti hanno permesso di caratterizzare e confermare le firme spettrali ottenute con Raman e LPAS.

3 Conclusioni e prospettive

I risultati ottenuti sono incoraggianti ed hanno confermato le ipotesi di lavoro iniziali e suggeriscono l'impiego di questi strumenti per la diagnostica e la caratterizzazione non distruttiva per questo confronto. Le tecniche si sono dimostrate versatili tanto da promuoverne l'uso anche per altri e diversi prodotti agroalimentari.

Quindi, le tecniche spettroscopiche proposte, ognuna con le proprie caratteristiche peculiari ed integrabili, pur analizzando la superficie del campione fino pochi μm di profondità, sono comunque in grado di discriminare tra le diverse varietà in base alla composizione sia atomica che molecolare. Una volta caratterizzati bene i picchi e individuati quelli più significativi, quali p.e. quelli che rilevano i cambiamenti nella interazione tra le proteine e l'amido, o quelli che seguono l'evoluzione dei metaboliti come l'amilosio e l'amilopectina, essendo tecniche non distruttive, si potrebbero proporre per monitorare l'invecchiamento o la shelf life oltre che di grani di riso [14] anche di altri prodotti ortofruttili. In particolare, la tecnica LIBS, pur essendo microdistruttiva, è in grado di determinare la composizione elementale anche in traccia utile per l'identificazione dei micronutrienti e contaminanti [15]. Sempre con la LIBS ma applicando la profilometria, è possibile ottenere informazioni importanti sia sulla composizione che sulla distribuzione elementale del grano di riso in profondità. Tale informazione potrebbe fornire le indicazioni sull'origine geografica del riso [16; 17] e può essere un fattore alla composizione sia atomica che molecolare per la loro classificazione.

Occorre infine ricordare che queste tecniche si possono integrare tra loro, strumenti che ne utilizzano tre o più insieme sono già stati sviluppati in DIM, e quindi avere la possibilità di fornire un quadro completo della caratterizzazione del campione in esame sempre alle condizioni iniziali di partenza di non contatto, senza manipolazione, non distruttiva, a distanza ed in tempo reale.

In questa ottica si può pensare in un futuro di sviluppare strumenti dedicati anche per il controllo della filiera alimentare, da ritagliare a secondo dell'esigenza e della matrice da analizzare.

1. Annex 1 – Misure Raman

1.1 Riso

1.1.1 Grani

Con lo scopo di individuare eventuali differenze o analogie tra diversi risi commerciali e il campione METROFOOD le misure sono state effettuate anche su le sottoelencate varietà in commercio

- Basmati C,
- Basmati E,

provenienti da due esercizi commerciali diversi

- Carnaroli E
- Integrale C
- Venere (cv Sarda)

Sulla cv Venere non è stato possibile ottenere spettri in quanto il campione si è danneggiato durante la misura (l'assorbimento del laser lo ha bruciato)

In figura 1.1 sono mostrati gli spettri Raman di tutte le varietà misurate. Gli spettri sono stati normalizzati da 0 a 1 e sottratto il background.

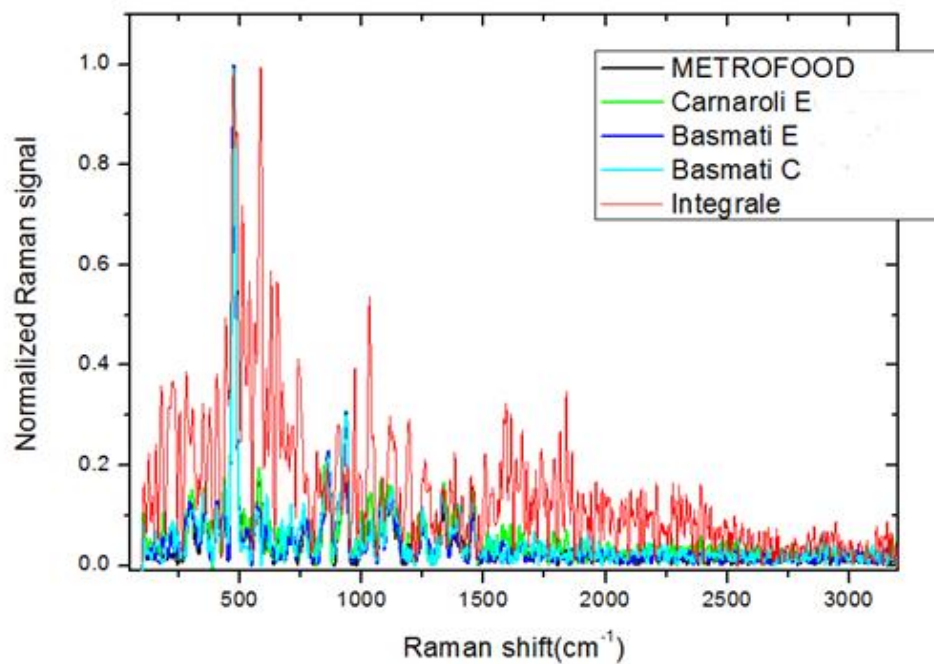


Figura 1-1 Spettro Raman completo di tutte le varietà misurate

Lo spettro del campione di riso integrale si differenzia evidentemente rispetto a tutti gli altri (picchi visibili a circa 530, 750, 1000, 1600 e 1800 cm^{-1}). Il risultato è aspettato in quanto i composti chimici caratteristici [9] del riso, si trovano soprattutto nella zona esterna del grano e l'analisi Raman è di tipo superficiale. Visto che il riso integrale, rispetto a quello raffinato (bianco), ha un contenuto in crusca e germe maggiore e mantiene una maggiore concentrazione delle vitamine del gruppo B [13], questo lo differenzia spettralmente dagli altri campioni.

Nel riso integrale, infatti, non viene rimossa la lolla, costituita dalle glumelle e dal germe (embrione) che contiene la maggior parte delle fibre, lipidi, proteine, oltre che vitamine e sali minerali. Nel riso raffinato, inoltre, l'endosperma amidaceo viene sottoposto ad un ulteriore trattamento di lucidatura (riso brillato) che ne impoverisce ulteriormente il contenuto di proteine e grassi. Per questo motivo, probabilmente, gli spettri Raman ottenuti dalle diverse cv di riso raffinato, incluso il METROFOOD, sono molto simili tra loro (

Figura 1-1). Tuttavia, per poter distinguere anche piccole differenze in contenuto biochimico nelle diverse varietà, si è proceduto ad applicare la Principal Component Analysis (PCA) escludendo il riso integrale, proprio perché dai primi risultati, mostrati in **Figura 1-2**, si osserva la già aspettata netta separazione tra tutti i tipi di riso raffinato, rispetto al riso Integrale..

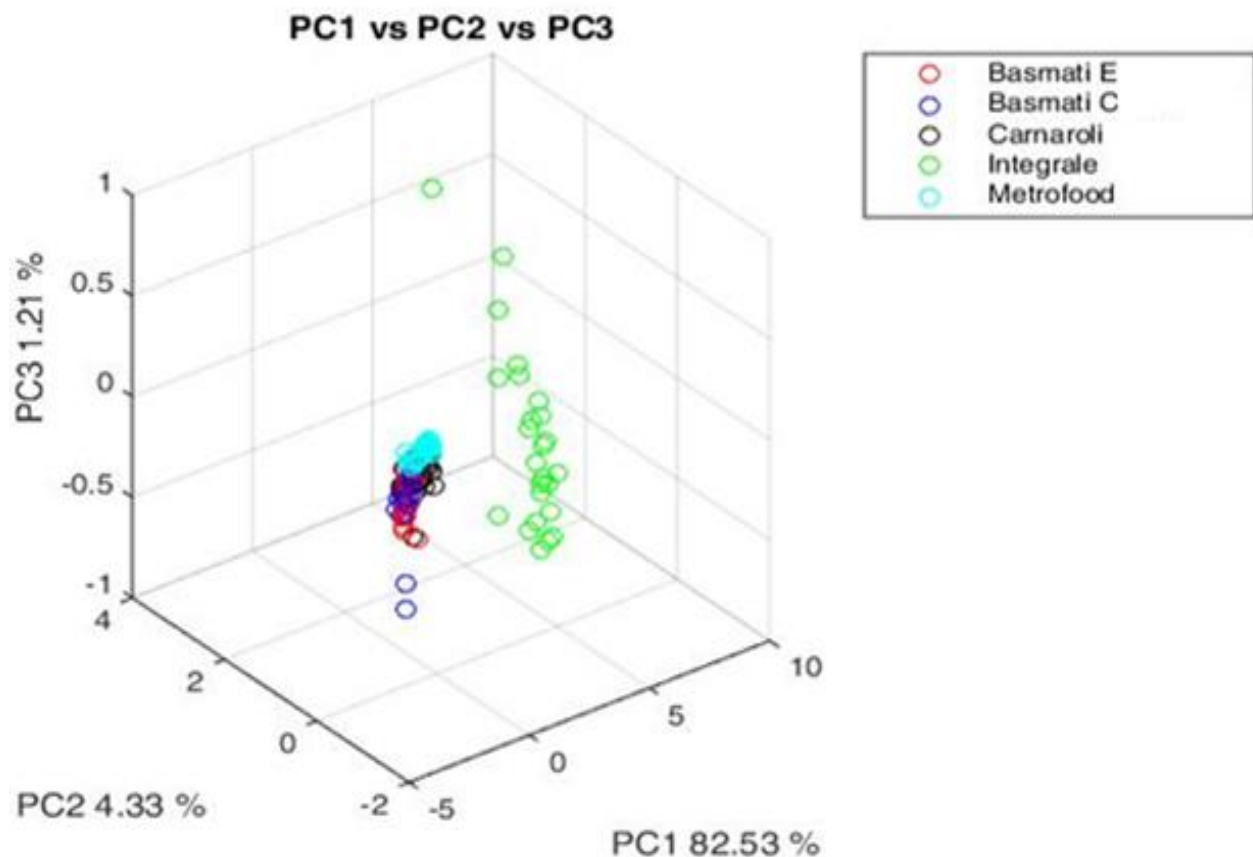


Figura 1-2 . Principal Component Analysis (PCA) delle varietà di riso analizzate (grani).

In **Figura 1-3** sono mostrati il confronto dei soli risi raffinati e si osserva che, la separazione tra le diverse cultivar, pur non essendo così netta, è evidente soprattutto tra il campione METROFOOD e la varietà Carnaroli.

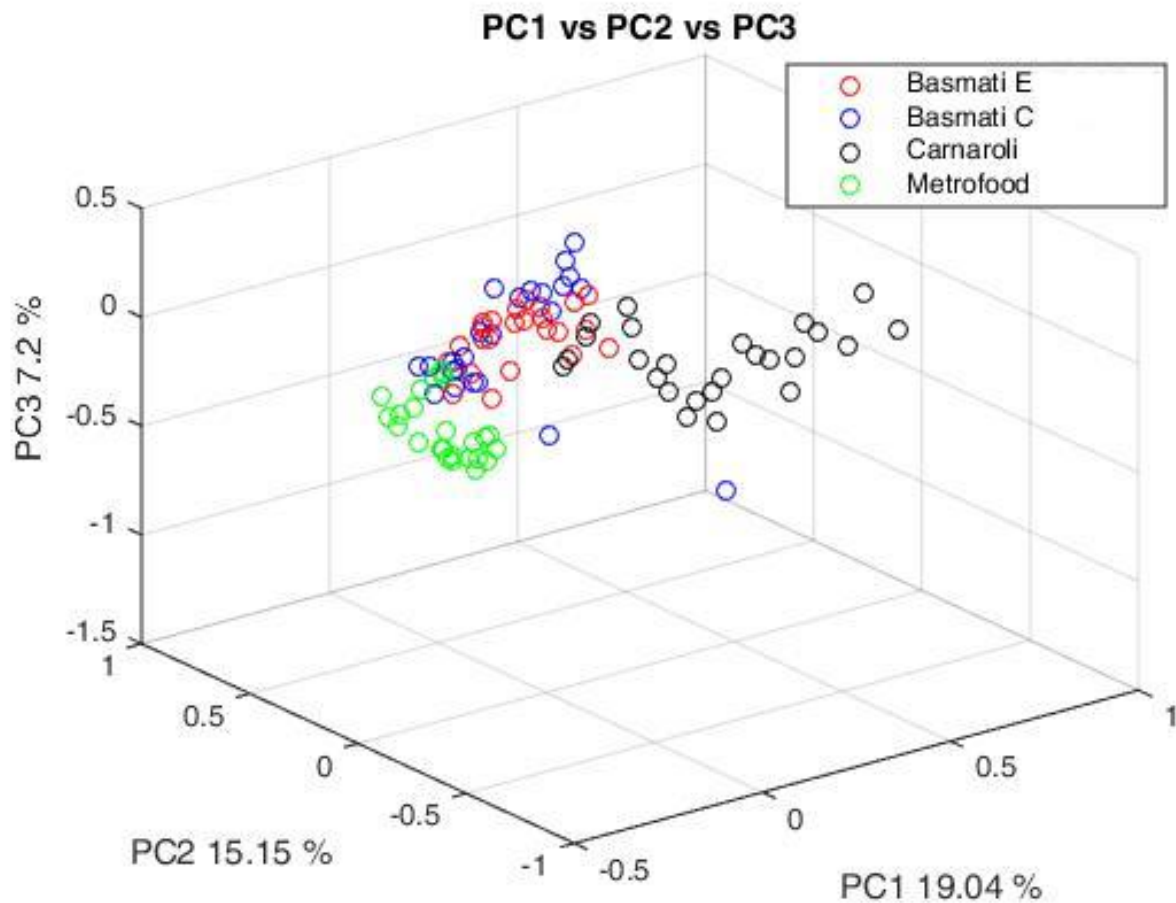


Figura 1-3- Principal Component Analysis (PCA) delle varietà di riso analizzate, esclusa varietà integrale (grani).

Questo risultato diventa importante nel momento in cui si evidenzia che i grani sono morfologicamente simili (**Figura 1-4**).

Carnaroli

METROFOOD

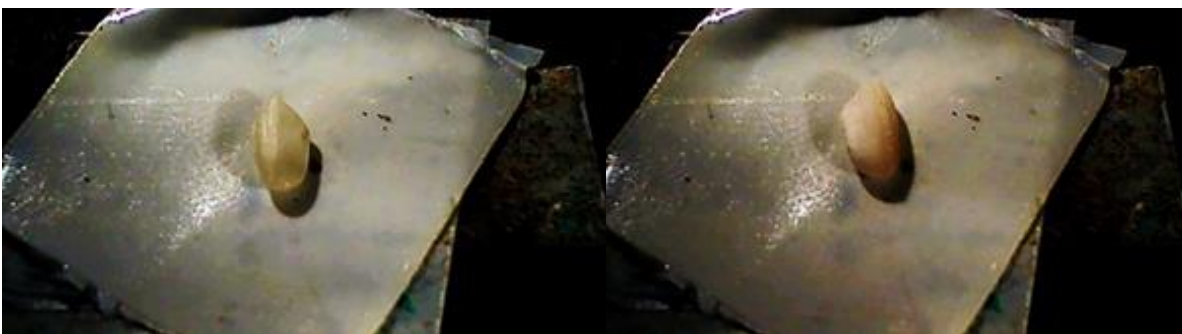


Figura 1-4 Confronto tra la varietà Carnaroli (classificato superfino) e il campione METROFOOD, morfologicamente simile

Nel dettaglio del confronto dello spettro tra la varietà Carnaroli e il riso METROFOOD, anche se si evidenzia una buona sovrapposizione tra i due campioni, e i picchi osservati sono in accordo con la letteratura [4; 5], l'elaborazione delle singole PC1 PC2 e PC3, che tengono conto di un totale del 52.4% di varianza, evidenzia differenze significative soprattutto nella PC1, come mostrato in Figura 1-6, dove è mostrato l'andamento delle tre componenti principali in funzione dello shift Raman.

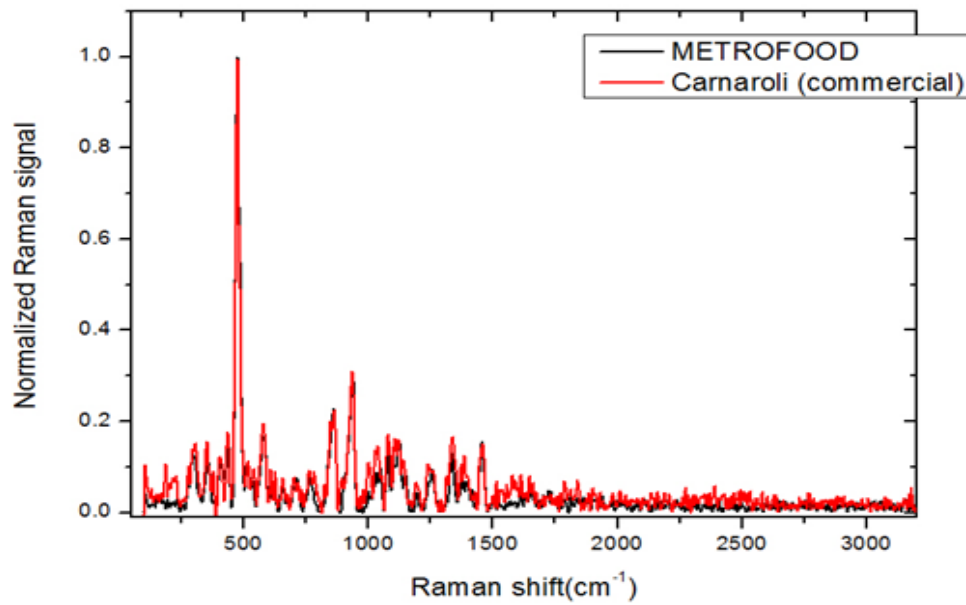


Figura 1-5 Spettro Raman tra la varietà Carnaroli e il campione METROFOOD

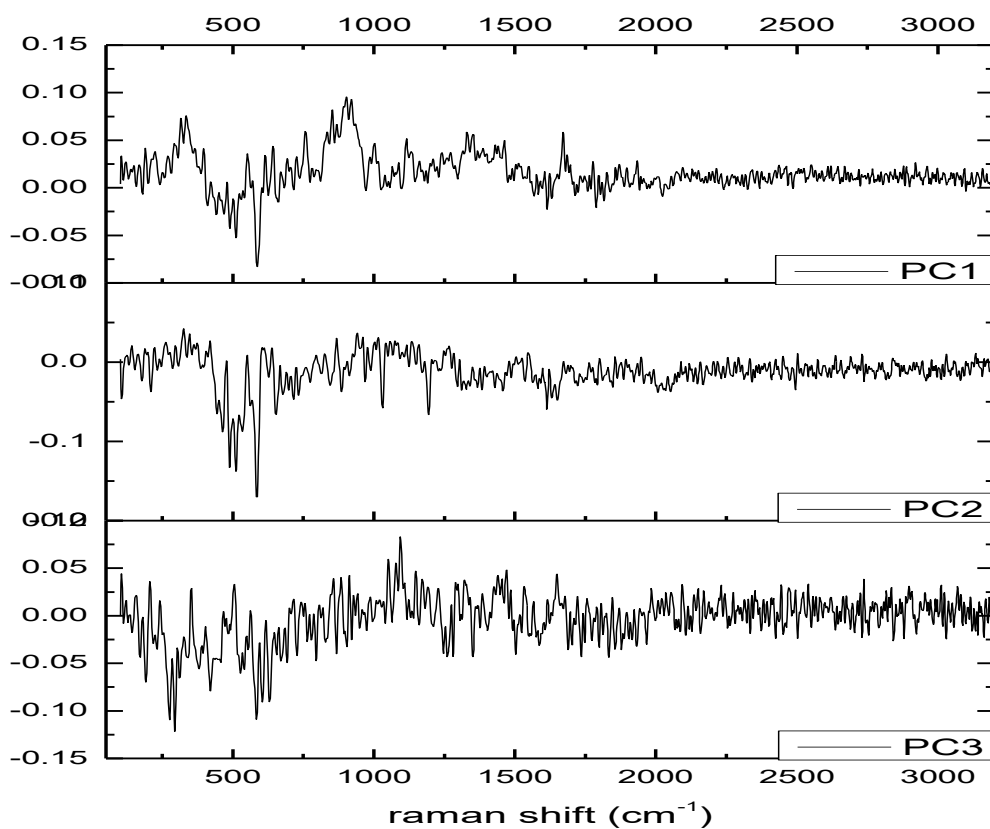


Figura 1-6 - Andamento delle tre componenti principali in funzione dello shift Raman.

La variazione più rilevante tra le due specie di riso sembra essere nella regione tra 800 e 1000 cm^{-1} proprio in corrispondenza delle bande assegnate all'amilosio e all'amilopectina (tabella 1-1).

Banda	Posizione spettrale (cm⁻¹)	Assegnazione tentativa
1	477	Ring torsional vibrations
2	863	amylose
3	910	amylopectin
4	1003	Phenylalanine
5	1033	Praline
6	1080	Cycloexamylose
7	1127	Cycloexamylose
8	1258	amylose
9	1337	CH ₂ twisting
10	1380	amylopectin
11	1398	amylopectin
12	1460	C-H bending
13	1636-1650	amylose + amylopectin
14	2800-3000	C-H vibrations

Tabella 1-1 – Assegnazione delle bande spettrali a composti del Riso

Con lo scopo di osservare eventuali differenze strutturali e/o di metaboliti presenti dalla superficie verso l'interno dei chicco di riso si è anche proceduto alla misura, lungo la sezione trasversale del grano, sia di METROFOOD che dell'Integrale. In *Figura 1-7* sono mostrati i risultati del solo campione METROFOOD.

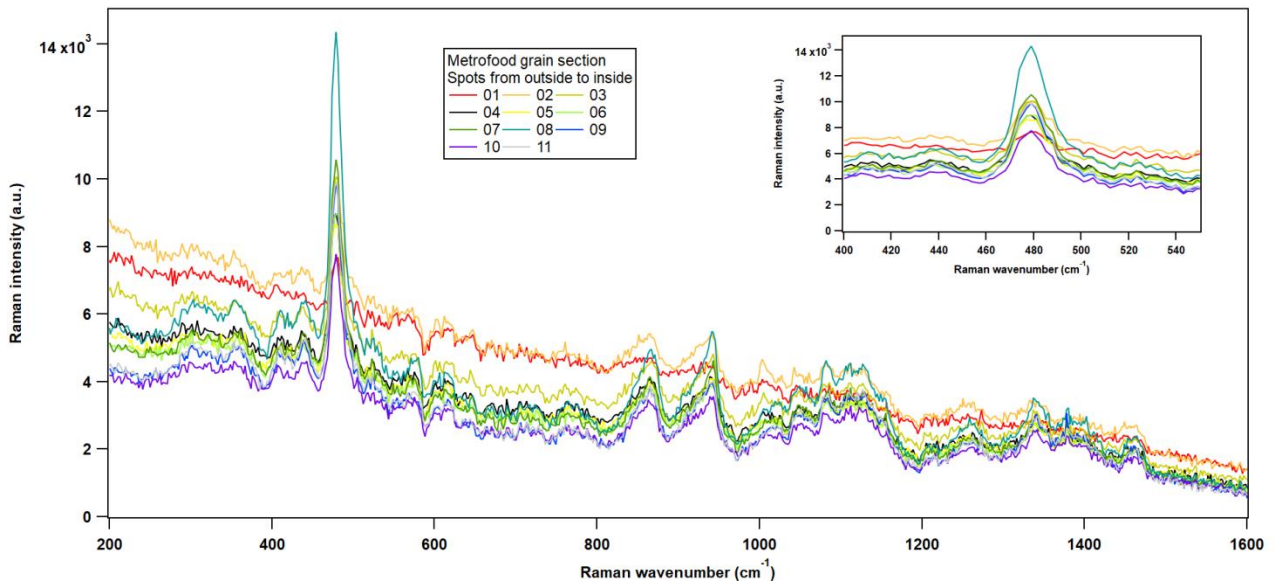


Figura 1-7 Spettro Raman delle sezioni trasversali di grani di METROFOOD. I numeri della legenda stanno a d indicare lo strato del in profondità del grano. L'inserto mette in evidenza le differenze a 480 cm^{-1}

Non ci sono evidenti differenze, se non per intensità, negli spettri delle sezioni più superficiali del grano di METROFOOD in confronto col riso integrale Bio. A parte l'intensa emissione di fluorescenza, già a partire dalla 3° sezione (03 **Figura 1-7** e figura 1.8). Il picco che si osserva a circa 480 cm^{-1} , sia nel riso raffinato che in quello integrale, è corrispondente probabilmente a composti presenti soprattutto nell'embrione, quali grassi e proteine [9; 10] più altri deboli picchi tra 820 e 1200 cm^{-1}

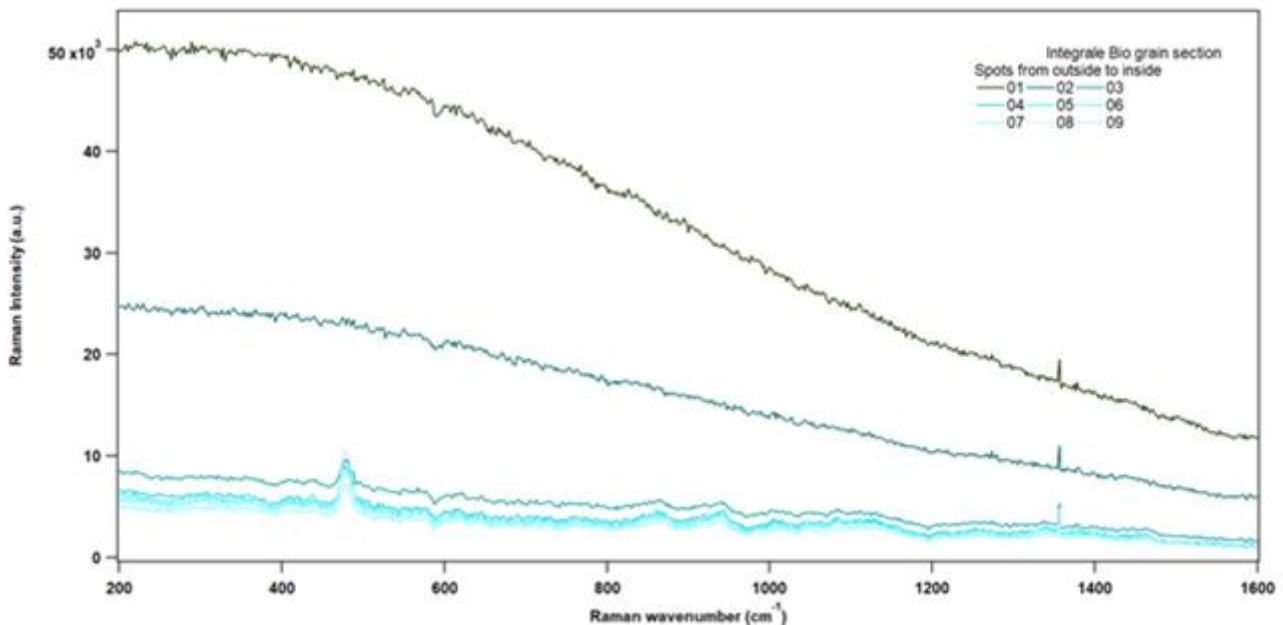


Figura 1-8 Spettro Raman delle sezioni trasversali di grani di riso integrale. I numeri della legenda stanno ad indicare lo strato in profondità del grano.

1.1.1 Farine

Con lo scopo di confrontare il campione METROFOOD fornito già come farina, e farine provenienti dalle stesse varietà analizzate come grani gli stessi sono stati macinati in laboratorio per 5 minuti. Solo i campioni delle varietà di riso raffinato, sono stati confrontati con lo standard NIST essendo proveniente anche questo da riso chiarificato.

In figura 1.9 sono mostrati gli spettri di tutte le varietà, inclusa la farina METROFOOD di cui non si conosce la provenienza, in confronto con lo standard NIST. Lo spettro Raman di tutte le varietà è sovrapponibile con quello della farina METROFOOD. I picchi più significati e comuni a tutti i campioni si trovano a 358, 477, 576, 615, 709, 757, 861, 933, 1040, 1084, 1260, 1333, 1380 e 1458 cm^{-1} alcuni dei quali sono già stati assegnati come da tabella 1-1. Le differenze sono meno evidente rispetto a quelle osservata nei grani (figura 1.1 e figura 1.5) probabilmente perché con la macinatura i composti biochimici che si trovano sulla superficie del grano, vengono mescolati con quelli presenti nelle strutture interne (embrione ed endosperma).

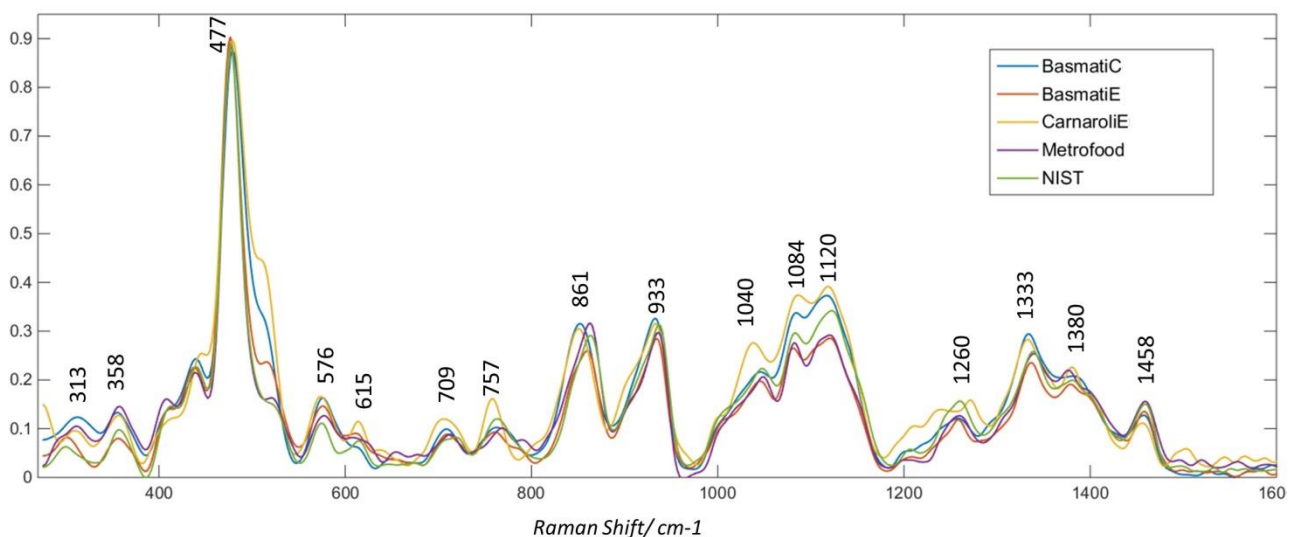


Figura 1-9 Spettro Raman completo delle farine di tutte le varietà misurate

1.2 Ostrica

Sul campione di ostrica liofilizzato in confronto con lo standard di cozza ERM CE 278 K, a causa della intensa emissione di fluorescenza i risultati (figura 1.10) non hanno evidenziato picchi Raman che permettano di indentificare il campione. Invece lo standard di liofilizzato di tessuto di cozza, nonostante il background di fluorescenza, ha evidenziato due picchi a Raman a 1082 e 1470 cm^{-1} .

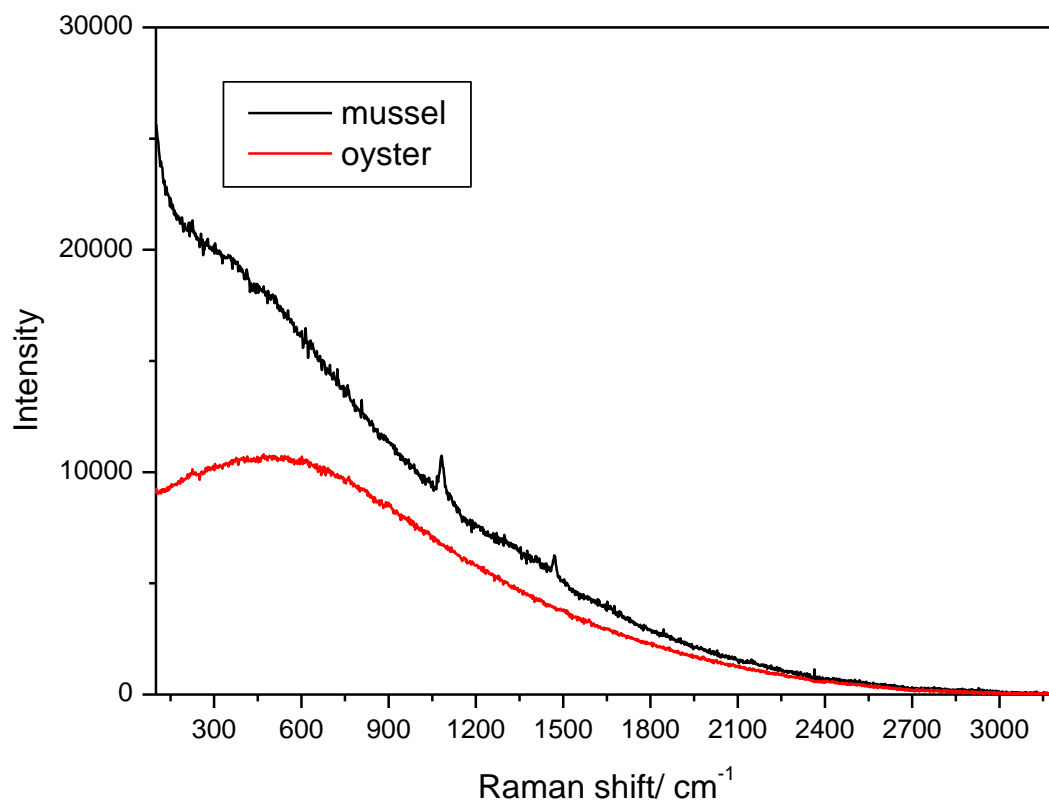


Figura 1-10- Spettro Raman su tessuto liofilizzato di cozza (nero) e ostrica (rosso). Si osservi la forte emissione di fluorescenza

Annex 2 Misure FT-IR

2.1 Riso

Con lo scopo di individuare e classificare i picchi Raman ottenuti, sugli stessi campioni misurati sia come grani che come farina, è stata utilizzata la Spettroscopia Infrarosso a Trasformata di Fourier (FT-IR).

In figura 2.1 sono riportati i risultati ottenuti sulle varietà Basmati C, Basmati E, Carnaroli E ed Integrale C, in confronto con il campione METROFOOD.

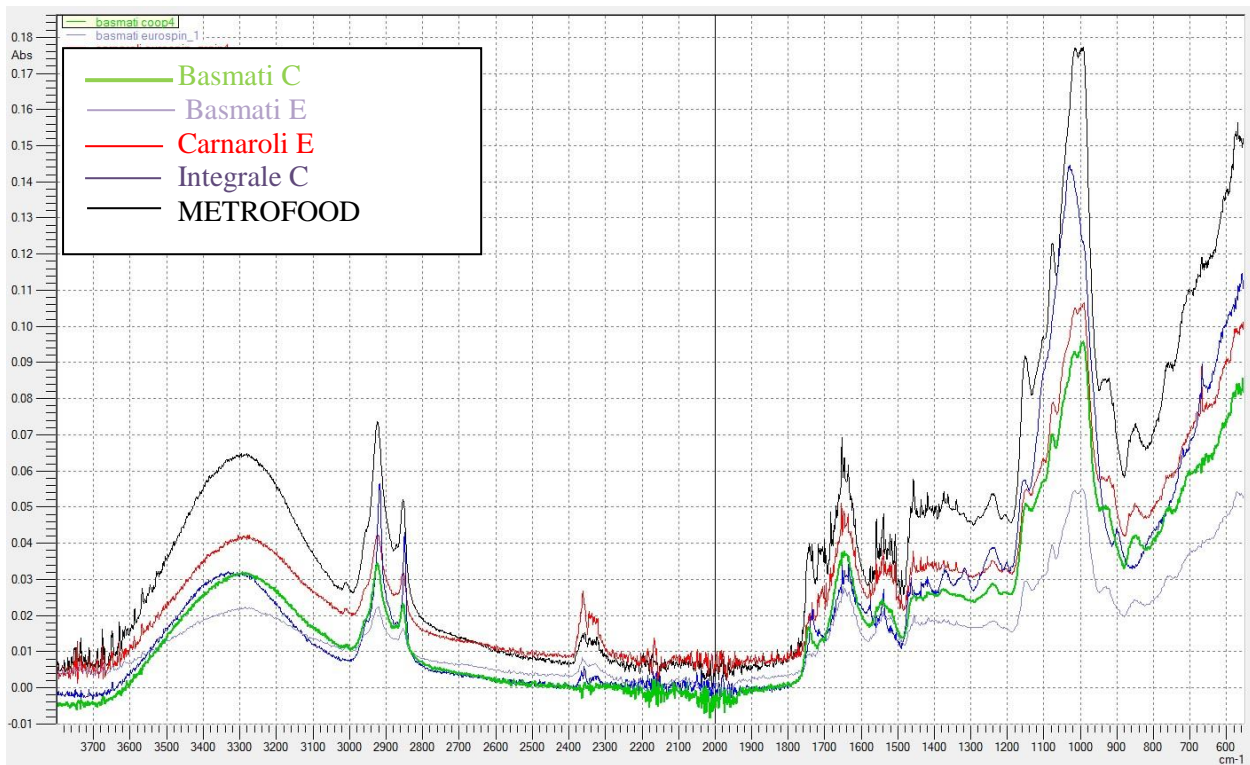


Figura 2.1 Spettri FT-IR di grani di Riso a confronto

I picchi più significativi sono comuni a tutti campioni, anche se con intensità diverse. Si possono riferire ai principali componenti dei grani di riso (figura 2.2):

*Lipidi

*Amido e zuccheri semplici

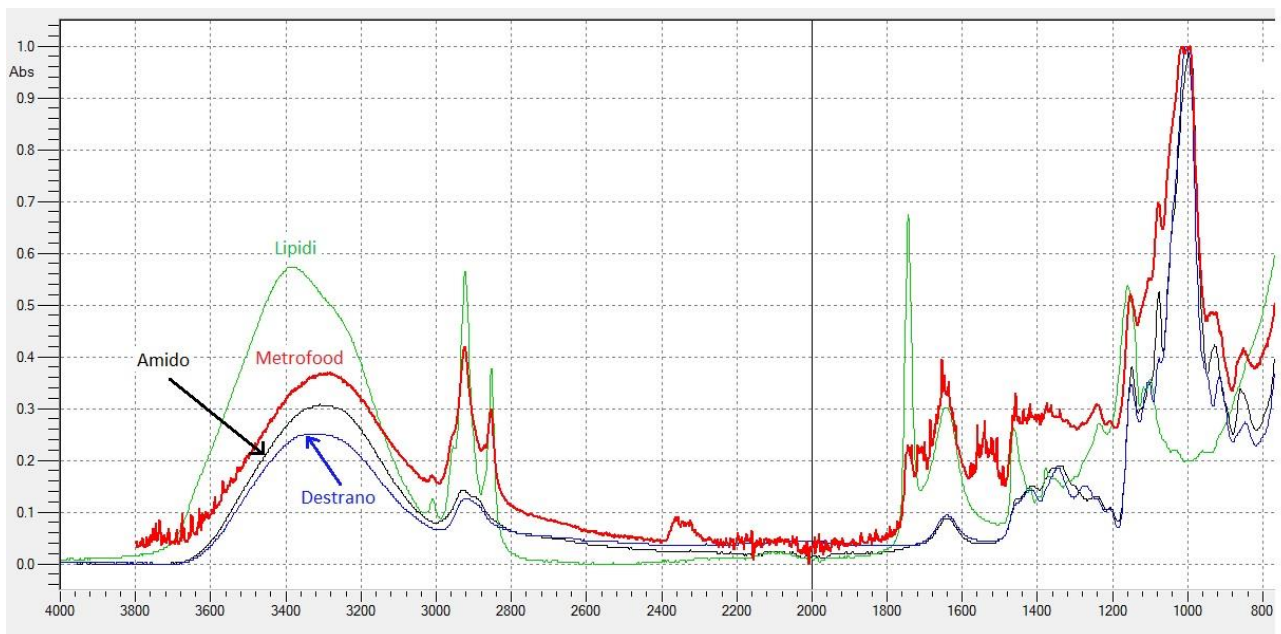


Figura 2.2- Confronto tra standard interni dei singoli componenti e grani di riso METROFOOD

2.1.1 Farine

Anche per le farine si è proceduto ad effettuare misure con FT-IR (figura 2.3)

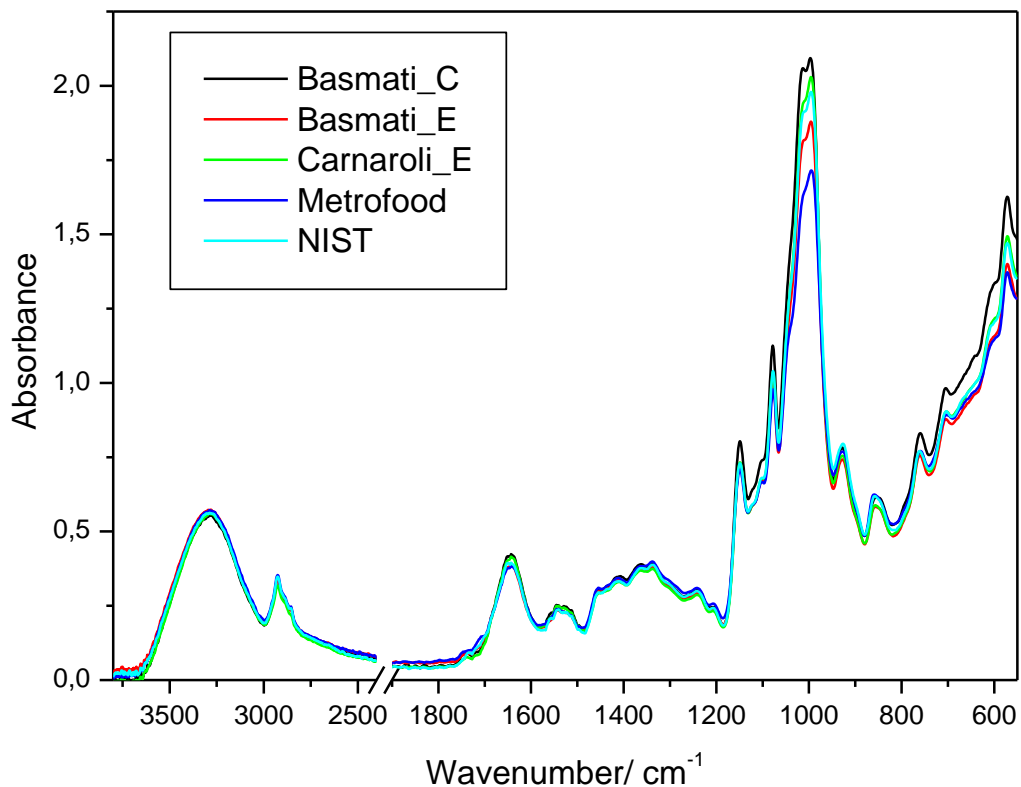


Figura 2.3- Spettro FT-IR dei diversi campioni di farine in confronto con lo standard NIST

Come si osserva nella figura 2.4 i picchi più rappresentativi sono centrati a 573, 603, 705, 762, 955, 1014, 1078, 1148 cm⁻¹.

Le importanti differenze in intensità che si osservano tra 995 e 1014 cm⁻¹ (figura 2.4) sono dovute alle diverse concentrazioni degli zuccheri complessi, come amido e amilosio e amilopectina presenti in misura variabile nelle diverse varietà.

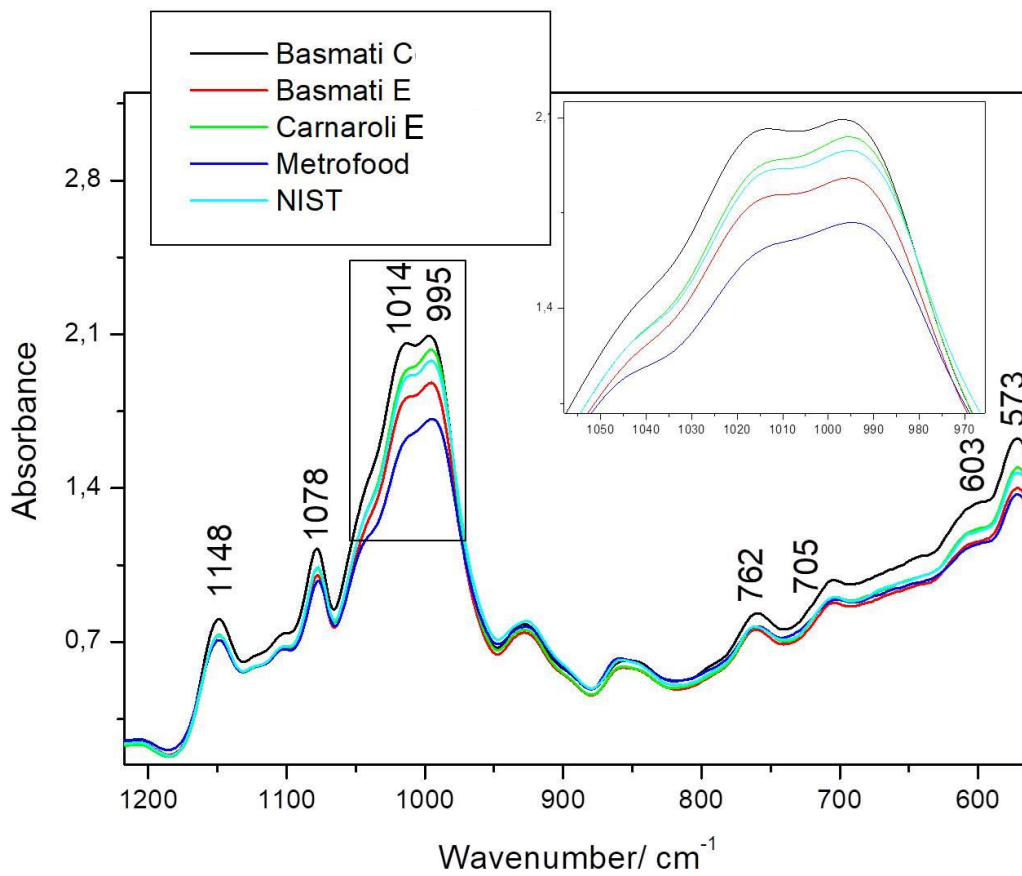


Figura 2.4 Spettro FT-IR dei diversi campioni di farine in confronto con lo standard NIST, nel range spettrale definito fingerprint molecolare.

2.2 Ostrica

Il confronto tra il campione di Ostrica (METROFOOD) e lo standard ERM CE 278 K di liofilizzato di cozze mostra differenze nei picchi (figura 2.4) dovute principalmente ai contenuti proteici

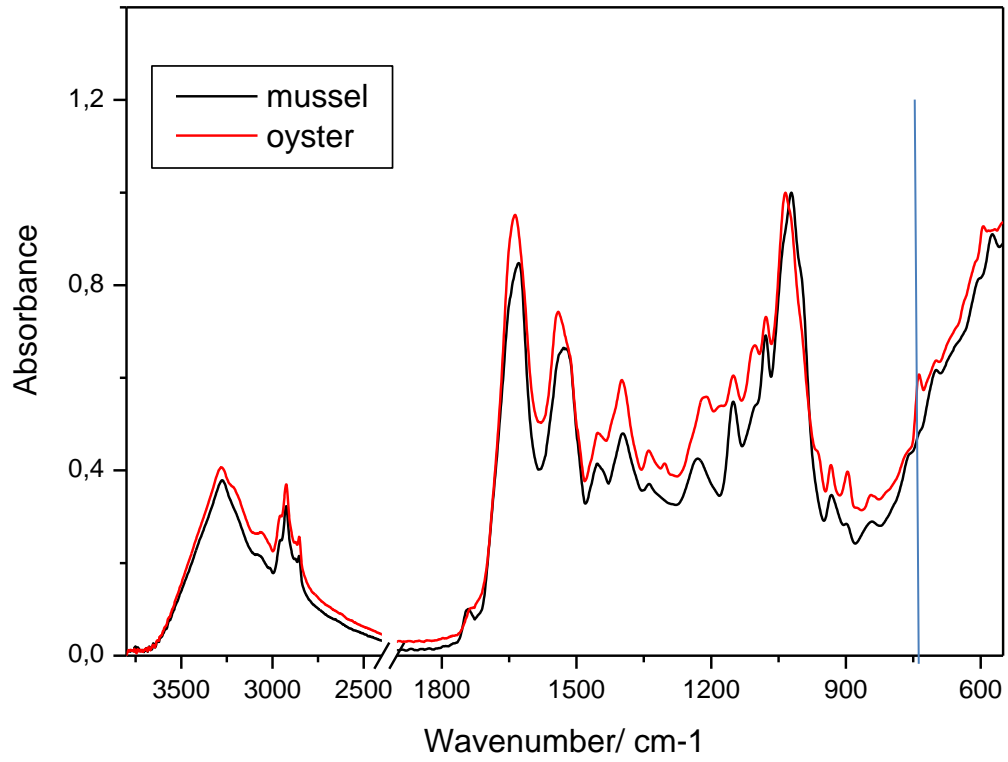


Figura 2.4- Spettro FT-IR di campioni di polvere di ostrica e cozze a confronto

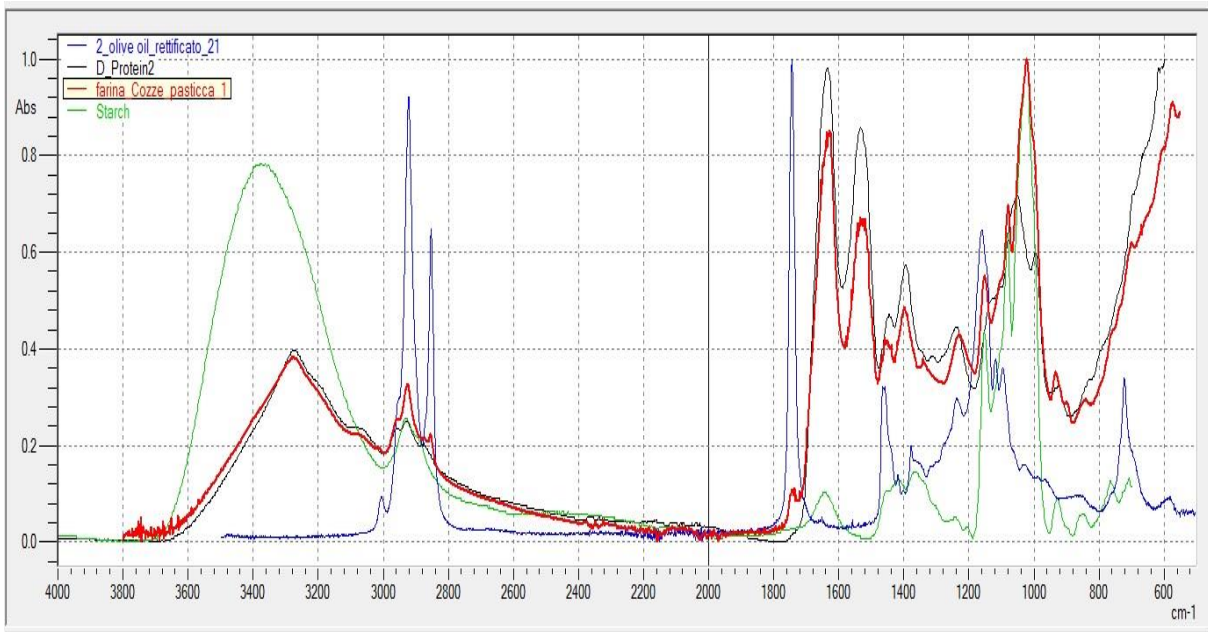


Figura 2.5- Confronto tra spettro FT-IR del campione di farina di Cozza e standard interni dei singoli componenti

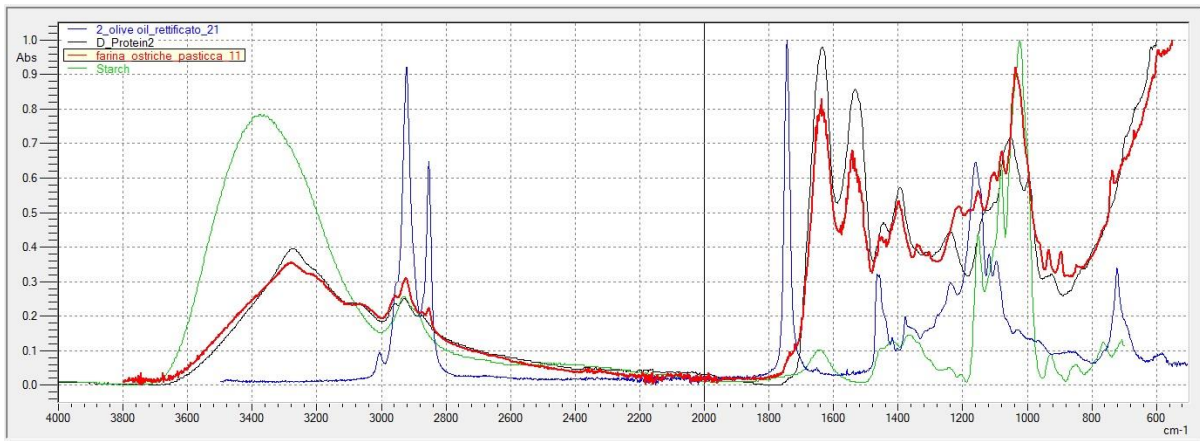


Figura 2.6 – Confronto tra spettro FT-IR del campione di farina di ostrica e standard interni dei singoli componenti

2. Annex 3-Misure LPAS

3.1 Riso

3.1.1 Grani

La tecnica di spettroscopia laser per effetto fotoacustico (LPAS) permette di effettuare misure di assorbimento nell'infrarosso (IR). In particolare le misure sono state effettuate con un sistema realizzato nei laboratori DIM dell'ENEA, che utilizza una sorgente laser a CO₂. L'intervallo spettrale di emissione laser è compreso tra 9 e 10.8 μm, dove le molecole organiche presentano un intenso assorbimento. Il sistema, oltre che dalla sorgente, è composto da una cella di misura e da componenti sia ottici che elettronici.

Le misure, riportate in figura 3.1 sono state effettuate su campioni di riso commerciali quali Basmati E, Carnaroli E, Integrale C in confronto con il campione METROFOOD.

Le differenze osservate tra i vari spettri (figura 3.1) sono messe meglio in evidenza dall'analisi PCA riportata in figura 3.2

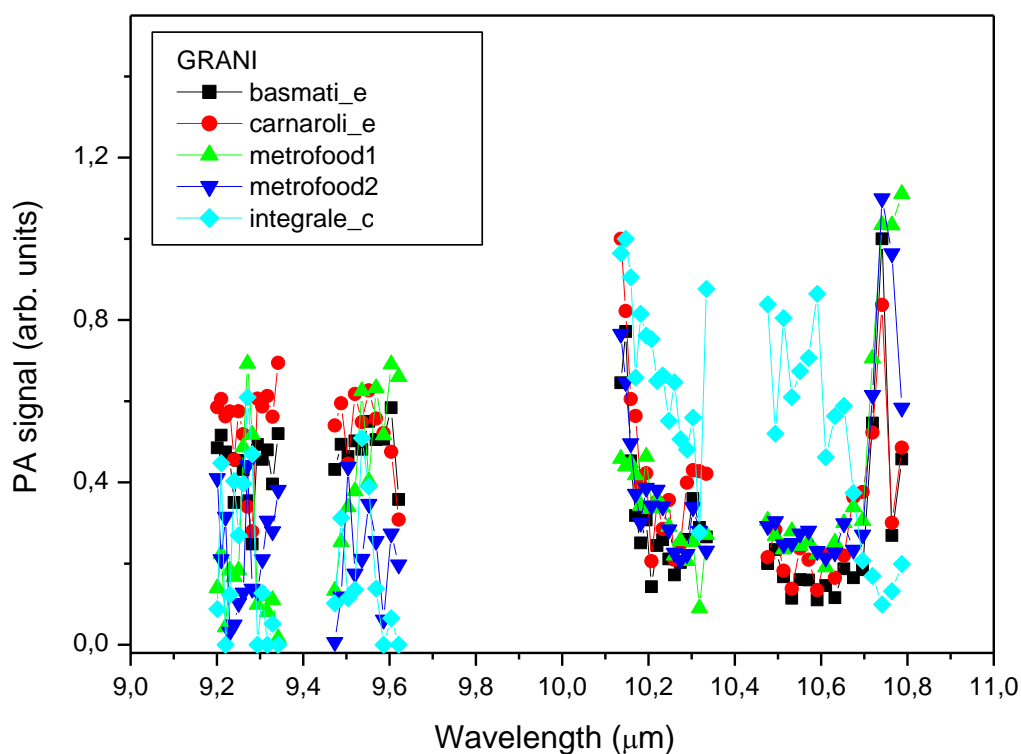


Figura 3.1 - Spettri normalizzati di differenti varietà di riso (grani).

Infatti i campioni sono ben identificati e raggruppati per varietà, nello spazio definito dalle prime due componenti (PC1 vs PC2). In particolare, sia il campione METROFOOD, che l'integrale C, si trovano separati rispetto alle varietà Basmati E e Carnaroli E, in aree ciascuna differente rispetto alle altre (figura 3.2). Mentre l'integrale è morfologicamente diverso rispetto agli altri, per cui il risultato è aspettato, per il campione METROFOOD possiamo dedurre che presumibilmente ha un contenuto metabolico differente dalle altre due varietà.

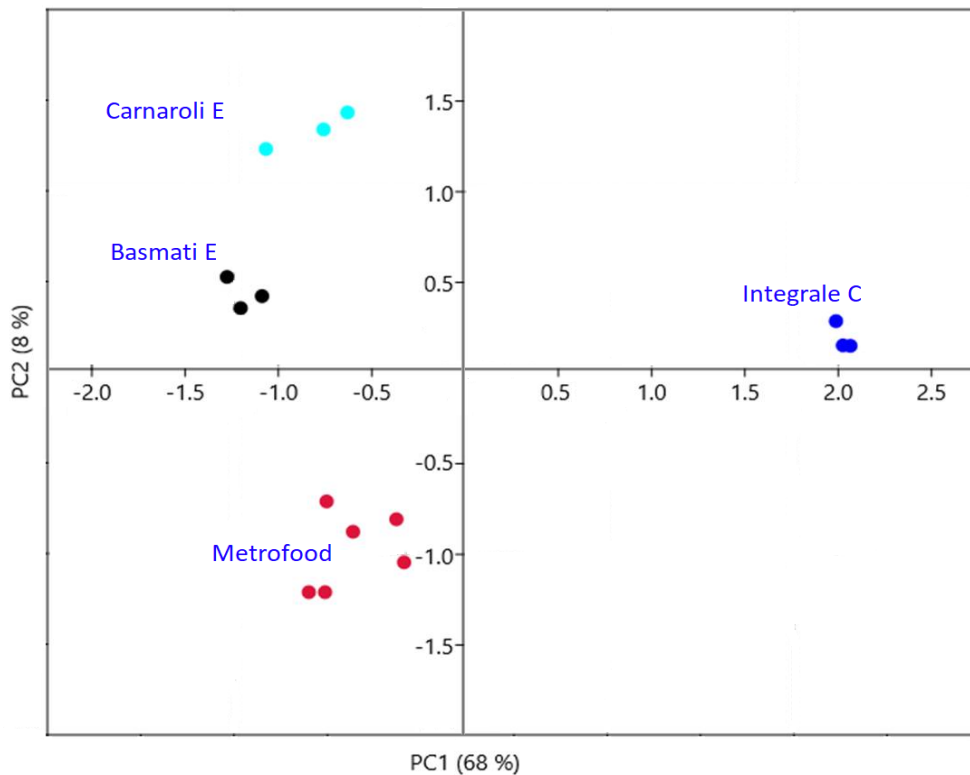


Figura 3.2- PCA di differenti varietà di riso (grani).

3.1.2 Farine

Nel caso delle farine, le misure LPAS sono state effettuate con una sorgente di eccitazione laser a cascata quantica con emissione nel range spettrale da 8.3 fino a 11.1 μm . In figura 3.3 si osservano piccole differenze in intensità di emissione per ogni campione esaminato. In tabella 3.1 sono mostrate le possibili assegnazioni dei picchi più evidenti degli spettri dei campioni analizzati. Tra circa 9 e 10 μm sono assegnati i carboidrati mentre proteine e i gruppi chimici ad essi associati si trovano all'incirca a 8.7 e oltre 10.6 μm .

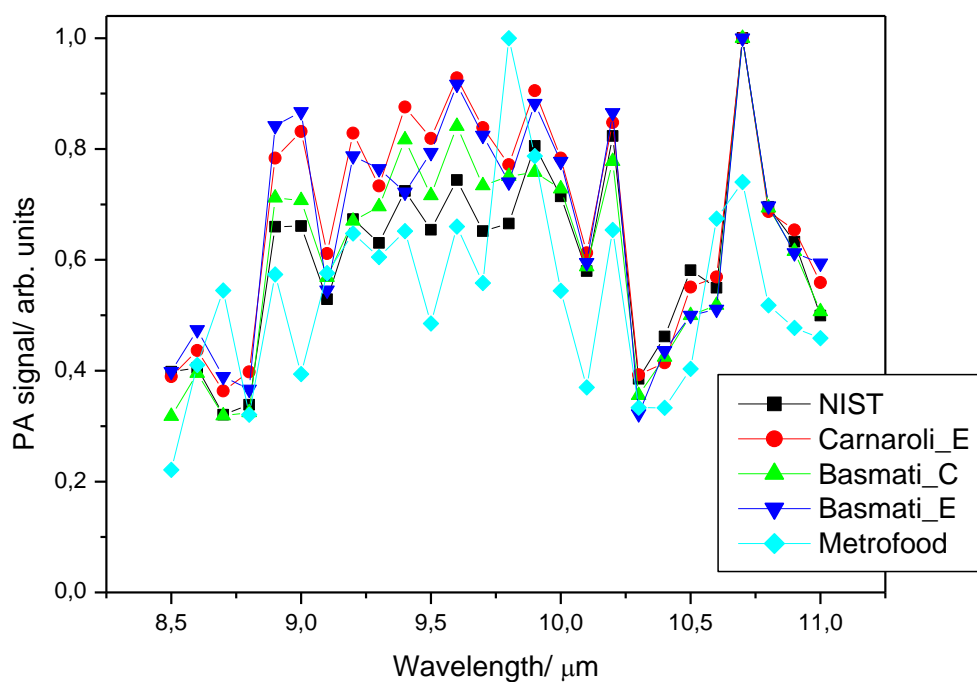


Figura 3.3 – Spettri normalizzati di differenti varietà di riso (farine).

Posizione banda (μm)	Possibile assegnazione
8.6-8.7	S=O, C-O (in albumin, globulin and glutelin),
9 - 10.6 μm	carbohydrates fingerprint region
10.65 - 10.9 μm	C-C (in albumin, globulin and glutelin)

Tabella 3.1 – Ipotetica assegnazione delle bande osservate in LPAS¹⁸

L'analisi PCA mostrata in figura 3.4 mette meglio in evidenza le piccole differenze osservate in precedenza nella figura 3.3. Anche qui, il campione METROFOOD, si separa distintamente sia dai campioni Carnaroli E e Basmati E, come osservato nei grani, che dallo standard NIST, facendo supporre una differente distribuzione e concentrazione chimica dei metaboliti.

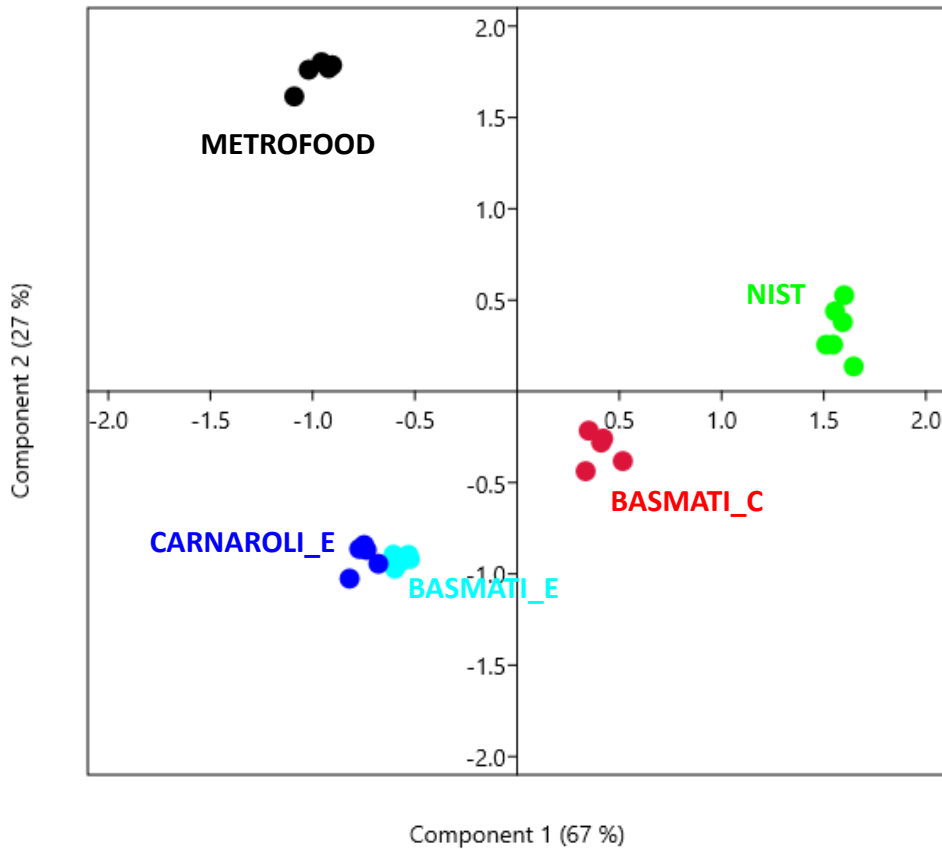


Figura 3.4- PCA di differenti varietà di riso (farine).

3.2 Ostrica

Anche per quello che riguarda i tessuti liofilizzati di ostrica e standard ERM CE 278 K di liofilizzato di cozze sono stati osservate piccole differenze, aspettate, nell'intervallo spettrale 8.3-11 μm (figura 3.5), così come è stato osservato anche nelle analisi allo FT-IR (figura 2.4 annex 2).

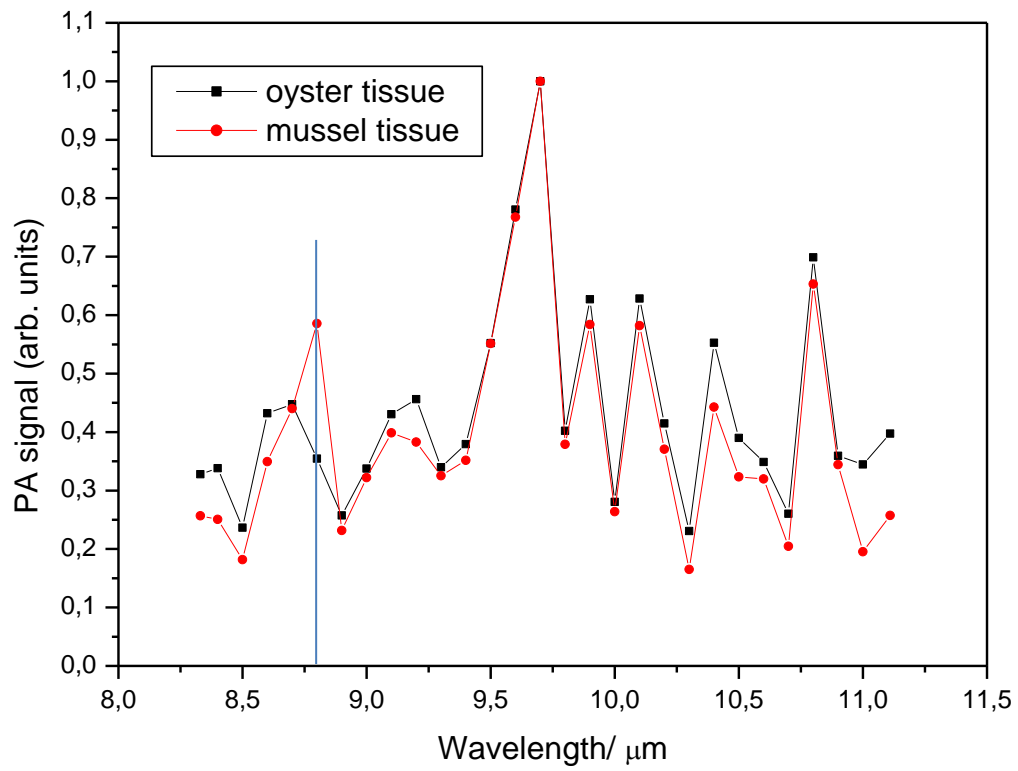


Figura 3.5- Spettri normalizzati di ostrica e cozza.

3. Annex 4 Misure LIBS

Lo strumento LIBS, il cui schema è mostrato in Fig. 4.1, si basa su un laser Nd:YAG a lunghezza d'onda 1064 nm, con durata dell'impulso circa di 7 ns. Il laser è focalizzato su uno spot di diametro di circa 0.42 mm e l'energia applicata sul campione è di circa 135 mJ. Se non specificato diversamente, il laser ha operato a frequenza di ripetizione di 2 Hz.

L'emissione del plasma è raccolta da un sistema ottico e un fascio di tre fibre che portano il segnale ottico a tre spettrometri compatti che coprono l'intervallo spettrale 237-785 nm con la risoluzione di 0.09 nm nell'UV e 0.14 nm nell'IR. L'acquisizione del segnale è ritardato di 1.26 μ s dall'impulso laser e il tempo d'integrazione è di 1.05 ms.

Il campione da analizzare è montato su una slitta micrometrica X-Y, regolabile anche in altezza. Grazie a una video-camera montata sopra il supporto campione, è possibile effettuare la messa a fuoco (anche in altezza) con una grande precisione.

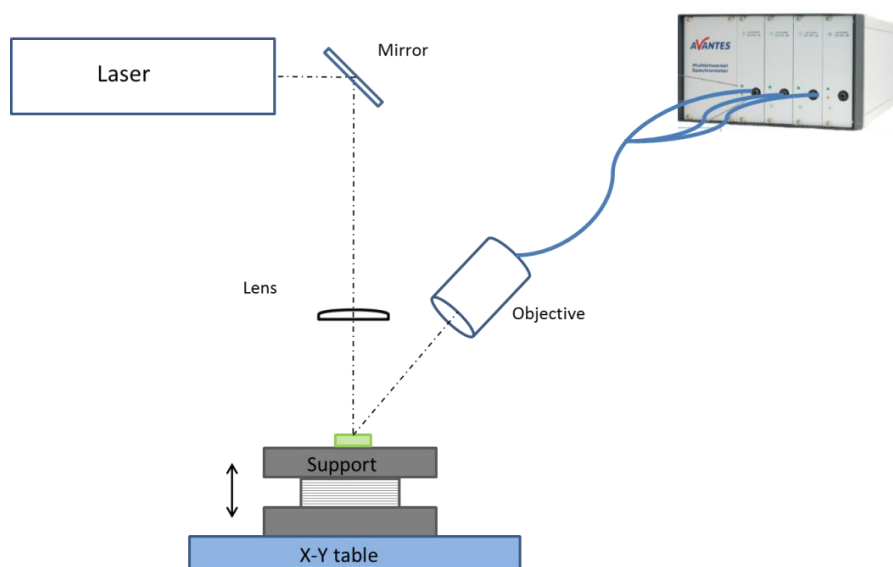


Figura 4.1 – Set up dello strumento

4.1 Riso

4.1.1 Grani

Le misure LIBS sono state eseguite sui grani di riso delle diverse varietà :

- Basmati E
- Carnaroli E,
- Integrale C
- Venere C

in confronto col campione

- METROFOOD

Come per tutte le altre misure i grani sono stati analizzati sul campione tal quale. Su ogni singolo grano sono stati acquisiti cinque spettri nello stesso punto. In figura 4.2 sono riportati gli spettri medi di ciascun campione, dove si osservano alcune differenze evidenti nelle intensità relative del segnale.

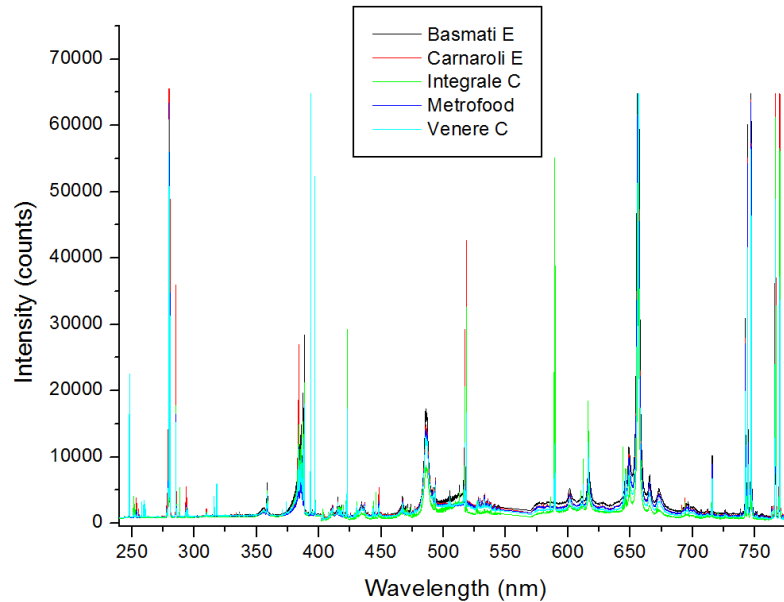


Figura 4.2: Spettri LIBS ottenuti sui grani di riso, mediati su cinque impulsi laser

In Fig. 4.3 sono mostrati alcuni esempi di varie porzioni spettrali, con l'assegnazione delle righe di emissione

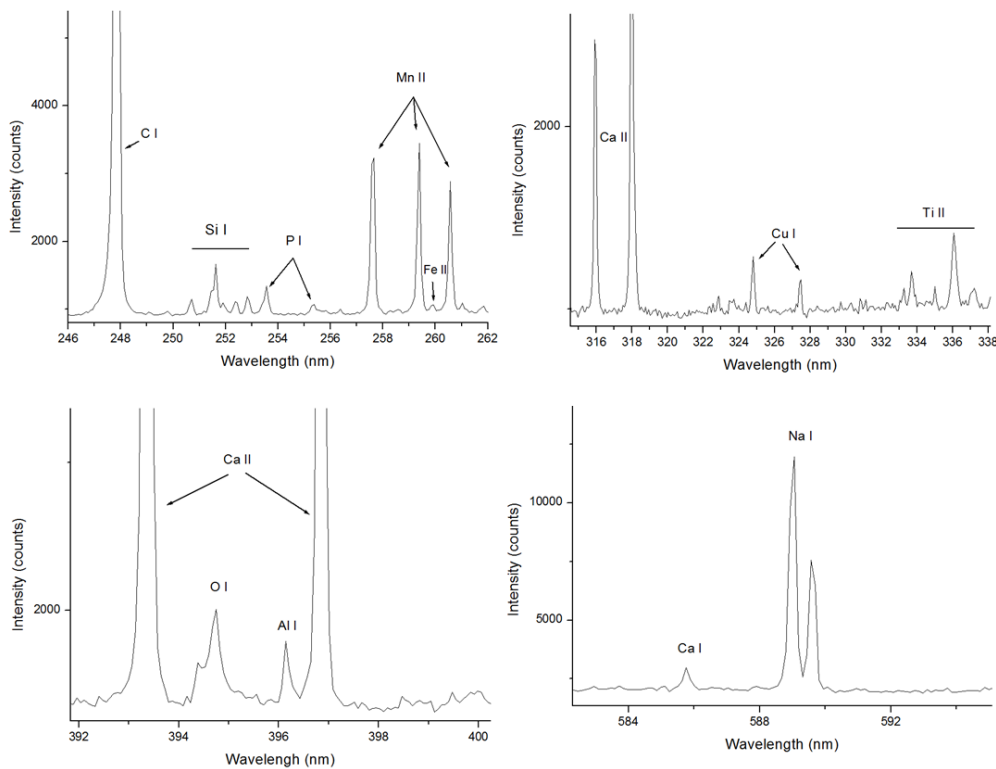


Figura 4.3: Porzioni spettrali usate per identificare alcuni elementi nel riso

Per ogni spettro acquisito sono state calcolate le intensità dei picchi delle righe analitiche, elencate nella Tabella 4.1, e i rapporti delle stesse nello spettro mediato su cinque acquisizioni rispetto al picco di carbonio, usato come lo standard interno. Non è stato tenuto conto dell'emissione di H, O e N in quanto presenti anche nell'aria. La loro quantificazione richiederebbe la copertura dei campioni con un gas inerte, come per esempio, Argon.

Grazie all'ablazione laser e il rilevamento dello spettro dopo ogni impulso, è possibile anche ricostruire la distribuzione di vari elementi in profondità. Nella tabella 4.1 è indicato (frecce) per ogni elemento, se il suo rapporto con il picco di C I (247.86 nm) sale o scende in profondità del grano.

Elemento	Riga (nm)	Rapporto d'intensità rispetto al picco di C I nello spettro mediato				
		Basmati	Carnaroli	Integrale C	Venere	METROFOOD
Al I	396.15	0.025 ↓	0.0087 →	0.044 →	0.015 ↓	0.0097 ↓
Ba II	455.40	0.028 ↓	0.015 →	0.034 →	0.015 ↓	0.017 →
Ca I	422.67	0.27 ↓	0.34 ↓	1.58 →	0.80 →	0.42 →
Cu I	324.75	0.0062 ↓	0.011 →	0.019 →	0.035 ↑	0.010 →
Fe II	259.94	0.0085 ↓	0.0084 ↓	0.012 ↓	0.0084 →	0.010 →
K I	769.90	1.41 ↓	3.88 ↑	3.28 →	1.78 ↑	2.14 →
Li I	670.77	0.036 ↓	0.044 ↑	0.051 →	0.020 ↑	0.045 ↑
Mg I	285.21	0.74 ↓	2.10 ↑	0.93 ↑	0.70 →	1.16 →
Mn II	257.61	0.011 ↓	0.028 →	0.13 ↓	0.10 ↓	0.023 →
Na	595.59	0.18 ↓	1.04 ↓	2.12 →	0.25 ↓	0.30 ↓
P I	253.56	0.028 ↓	0.18 ↑	0.075 ↑	0.023 ↑	0.087 →
Si I	288.16	0.026 ↓	0.024 ↓	0.25 →	0.038 ↓	0.023 ↓
Sr II	407.77	0.013 →	0.015 →	0.060 →	0.029 ↓	0.016 ↑
Ti II	336.12	0.029 ↓	0.030 →	0.025 →	0.020 →	0.033 →

Tabella 4.1: Intensità di emissione dei picchi delle righe analitiche ottenute dai grani di riso. Le frecce poste al lato indicano se il suo rapporto con il picco di C I (247.86 nm) sale o scende in profondità

Tra i cinque campioni di riso esaminati, Basmati ha il più basso contenuto di potassio, magnesio, sodio e calcio. Partendo dalla sua superficie tutti gli elementi, tranne lo stronzio, si riducono fortemente già dopo il primo sparo laser, di qui l'ablazione stimata di circa 1 µm.

I campioni di riso integrale (C e Venere) hanno il contenuto di manganese 3-4 volte superiore rispetto agli altri chicchi. Inoltre, il riso integrale C è caratterizzato dalla presenza di silicio circa 10 volte maggiore rispetto ad altri campioni, e dal più alto contenuto di sodio. Invece, il riso Carnaroli E ha la più alta presenza di magnesio, potassio e fosforo. Alcuni esempi di variazione di elementi con la profondità del campione, ovvero, con il numero degli impulsi laser, sono mostrati in Figura 4.4. Qui si osservano differenze in contenuto elementare, dalla superficie agli strati più profondi. In particolare per il riso Basmati si osserva una forte presenza alluminio sulla superficie che diminuisce drasticamente già al secondo impulso laser (figura 4.4a).

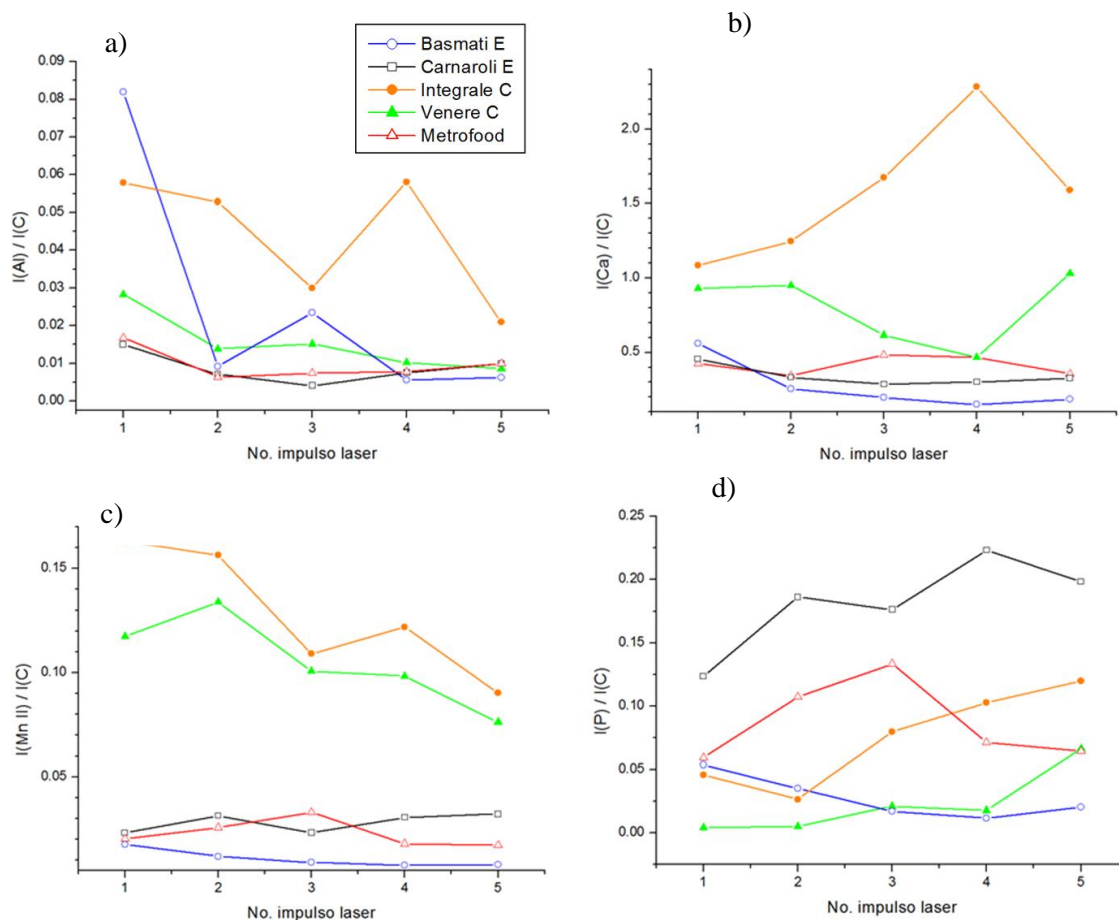


Figura 4.4: Variazione dei rapporti di alcune righe analitiche e la riga di carbonio con il numero di impulsi laser applicati

Vista la differenza evidente nella composizione nelle cinque varietà di riso, sui rapporti delle righe analitiche (Tabella 4.1) e per ciascun spettro acquisito sui campioni i risultati sono stati elaborati con la PCA. In Figura 4.5 si osserva che i campioni sono ben separati sul piano PC2 vs PC1 ma un punto corrispondente alla varietà Basmati e uno alla varietà Venere sono fuori dai raggruppamenti. Questo risultato potrebbe essere dovuto alla variazione della distribuzione elementare in profondità. Inserendo tra i parametri precedenti anche i rapporti elementari dopo il primo e l'ultimo impulso laser, si ottiene una netta differenziazione tra le cinque varietà di riso, come mostrato in Figura 4.6.

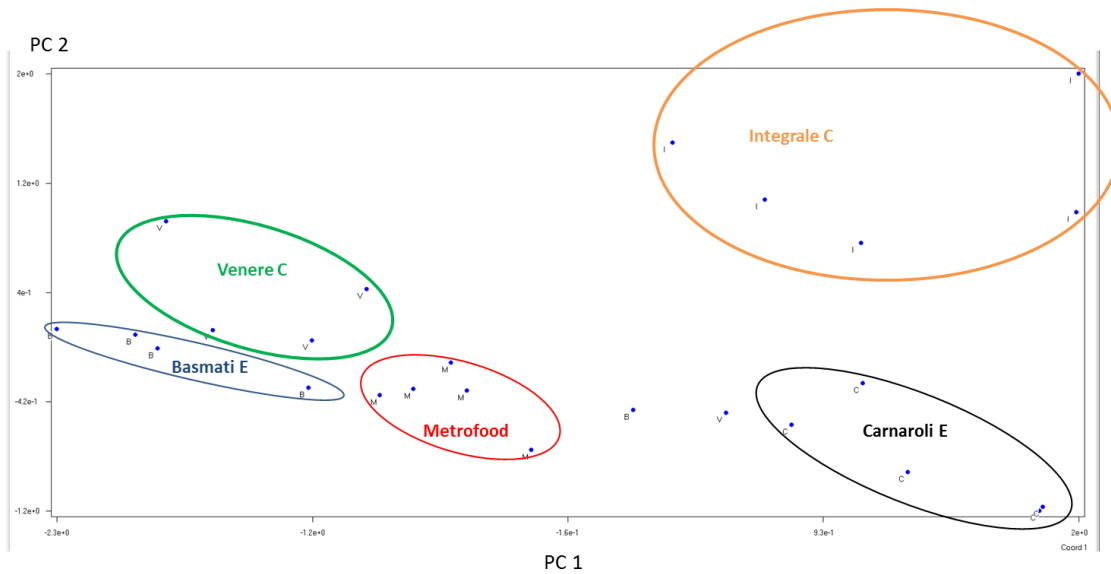


Figura 4.5 : PCA applicato sulle righe analitiche normalizzate sul carbonio

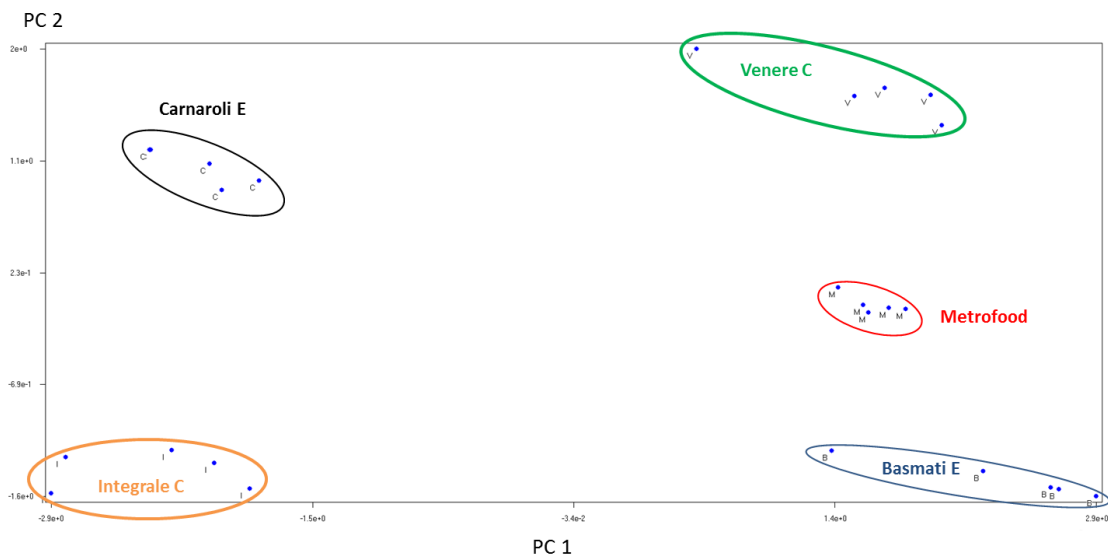


Figura 4.6: PCA applicato sulle righe analitiche normalizzate sul carbonio aggiungendo il rapporto tra gli stessi dati dopo il primo e l'ultimo impulso laser

La tecnica LIBS e la profilometria associata, determinando sia la composizione che la distribuzione elementare dalla superficie agli strati più profondi del grano, potrebbe fornire informazioni sulla sua origine, importante per la classificazione, e sulle lavorazioni successive alla raccolta.

4.1.2 Farina

Con la tecnica LIBS è stato misurato lo Standard NIST. La polvere è stata prima pressata in una pastiglia. L'analisi è stata effettuata applicando 10 impulsi laser per punto e in due punti diversi. Gli spettri mediati su 10 punti sono stati analizzati in seguito. Nella Tabella 2 sono riportate le concentrazioni certificate dello standard, in verde quelli rilevati con la tecnica LIBS. Nella tabella sono riportati anche elementi osservati con al tecnica LIBS ma non certificati nel campione. Non sono stati considerati elementi quali idrogeno,

ossigeno e azoto, presenti anche in aria, e il carbonio, principale costituente di materiali organici. Nella tabella è anche specificato il rapporto segnale-rumore (S/N). Il limite di rilevamento (LOD) corrisponde a $S/N \approx 3$, mentre quello stimato per la maggior parte degli elementi è inferiore a 1 mg/Kg. In particolare, per quelli alcalini è in ordine di 10 $\mu\text{g/Kg}$ o meno.

Element	Mass Fraction (mg/kg)	Analytical line (nm)	S/N
Aluminum	4.21 \pm 0.34	396.15	462
Arsenic	0.285 \pm 0.014	-	-
Barium	Unknown	455.40	NC
Bromine	8.31 \pm 0.61	-	-
Cadmium	0.0224 \pm 0.0013	-	-
Calcium	118.4 \pm 3.1	422.67	758
Chlorine	301.1 \pm 3.8	-	-
Cobalt	0.0177 \pm 0.0005 2.6	-	-
Copper	2.35 \pm 0.16	324.75	16
Iron	7.42 \pm 0.44	259.94*	26
Lead	0.008 \pm 0.003 2.6	-	-
Magnesium	559 \pm 10	285.21	418
Manganese	19.2 \pm 1.8	257.61*	8
Mercury	0.00591 \pm 0.00036	-	-
Molybdenum	1.451 \pm 0.048	-	-
Phosphorus	1530 \pm 40	253.56	55
Potassium	1282 \pm 11	769.90	810
Rubidium	6.198 \pm 0.026	780.01	85
Selenium	0.365 \pm 0.029	-	-
Silicon	Unknown	288.16	-
Sodium	6.74 \pm 0.19	595.59	1630
Strontium	Unknown	407.77*	NC
Sulfur	1200 \pm 10	-	-
Tin	0.005 \pm 0.001	-	-
Titanium	Unknown	336.12*	-
Zinc	19.42 \pm 0.26	-	-

Tabella 4.2: Elementi rilevati con la tecnica LIBS in farina di riso METROFOOD. In verde sono evidenziate le linee spettrali degli elementi trovati sperimentalmente. *Riga ionica ; NC = Non calcolato

4.2 Tessuto di Ostrica METROFOOD liofilizzato:

Le misure LIBS di ostrica liofilizzata fornita da METROFOOD sono state eseguite sulla pastiglia pressata. In questo caso l'impulso laser induceva un profondo e largo cratere, quindi sono stati applicati 10 impulsi spostando il campione dopo ogni sparo laser. In figura 4.7 è riportato lo spettro LIBS completo, mediato su 10 acquisizioni.

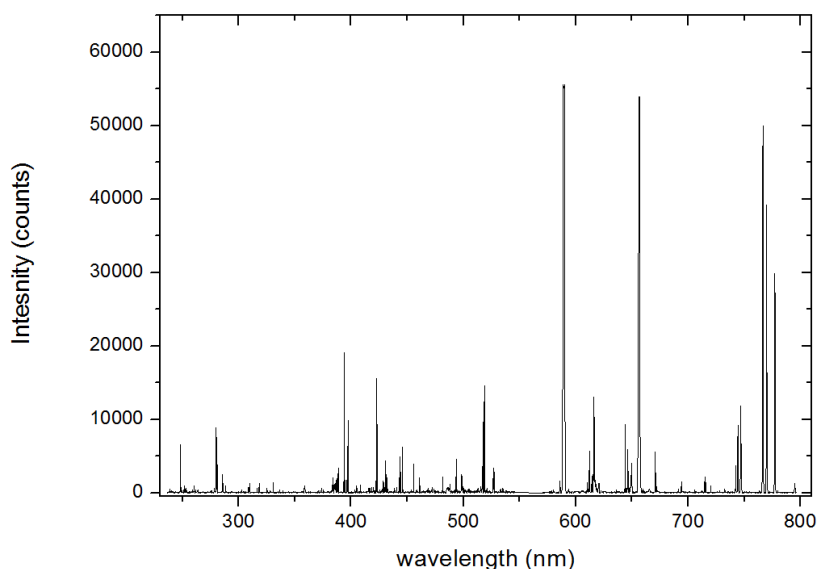


Figura 4.7- Spettro LIBS del campione di ostrica METROFOOD liofilizzata

Nella Tabella 4.3 sono riportate le concentrazioni degli elementi certificati (quelli rilevati col LIBS sono indicati in verde), la riga analitica usata e il rapporto segnale/rumore per gli elementi in traccia. Inoltre, la tabella specifica anche gli altri elementi osservati col LIBS e non certificati nel campione. A che qui sono stati esclusi idrogeno, ossigeno e azoto e carbonio. Tra gli elementi in traccia rilevati, sono inclusi Ag, Ba, B, Cr (non certificato), Cu, Fe, Mn, Sr, Rb e Zn. D'altra parte, tra i costituenti principali certificati dal NIST non è stato rilevato lo zolfo. Tuttavia, questo elemento in concentrazioni superiori a 0.3% circa potrebbero essere rilevati in futuro applicando il doppio impulso laser (disponibile nel lab) e/o utilizzando un altro spettrometro.

Element	Mass Fraction	Analytical line (nm)	S/N
Aluminum	197.2 ± 6.0 mg/Kg	396.15	318
Antimony	0.011 ± 0.002 mg/Kg	-	-
Arsenic	7.65 ± 0.65 mg/Kg	-	-
Barium	8.6 ± 0.3 mg/Kg	455.40	60
Boron	4.5 ± 1.9 mg/Kg	249.77	7
Cadmium	2.48 ± 0.08 mg/Kg	-	-
Calcium	0.0838 ± 0.0020 %	422.67	NC
Chlorine	0.514 ± 0.010 %	-	-
Chromium	Unknown	425.43	NC
Cobalt	0.371 ± 0.009 mg/Kg	-	-
Copper	71.6 ± 1.6 mg/Kg	324.75	145
Gold	0.0106 ± 0.0028 mg/Kg	-	-
Iron	205.8 ± 6.8 mg/Kg	259.94*	120
Lead	0.308 ± 0.009 mg/Kg	-	-
Magnesium	0.1085 ± 0.0023 %	285.21	NC
Manganese	18.5 ± 0.2 mg/Kg	257.61*	40
Mercury	0.0371 ± 0.0013 mg/Kg	-	-
Nickel	1.04 ± 0.09 mg/Kg	-	-
Phosphorus	Unknown	253.56	NC
Potassium	0.652 ± 0.009	769.90	NC
Rubidium	3.26 ± 0.14 mg/Kg	780.01	64
Selenium	2.06 ± 0.15 mg/Kg	-	-
Silicon	Unknown	288.16	NC
Silver	0.666 ± 0.009 mg/Kg	328.07	6
Sodium	0.3297 ± 0.0053 %	595.59	NC
Strontium	6.8 ± 0.2 mg/Kg	407.77*	130
Sulfur	0.689 ± 0.014	-	-
Thorium	0.0367 ± 0.0043 mg/Kg	-	-
Tin	0.031 ± 0.008 mg/Kg	-	-
Titanium	12.24 ± 0.39 mg/Kg	336.12*	39
Uranium	0.2550 ± 0.0014 mg/Kg	-	-
Vanadium	0.577 ± 0.023 mg/Kg	-	-
Zinc	1424 ± 46 mg/Kg	334.50	145

Tabella 4.3: Elementi rilevati con la tecnica LIBS in tessuto di ostrica liofilizzato METROFOOD, in confronto con quelli certificati dal National Institute of Standards and Technology (NIST) *Riga ionica ; NC = non calcolato

4.3 Tessuto di Cozza standard (ERM-CE278k) liofilizzato

Le misure LIBS sono state fatte su pasticca di tessuto di cozza liofilizzata, standard ERM-CE248k. Sono state effettuate misure con 10 impulsi laser, a frequenza 2 Hz in quattro punti del campione. Gli spettri ottenuti si riferiscono al segnale LIBS mediato sulle quattro misure. In Figura 4.8 è mostrato lo spettro intero acquisito sul campione.

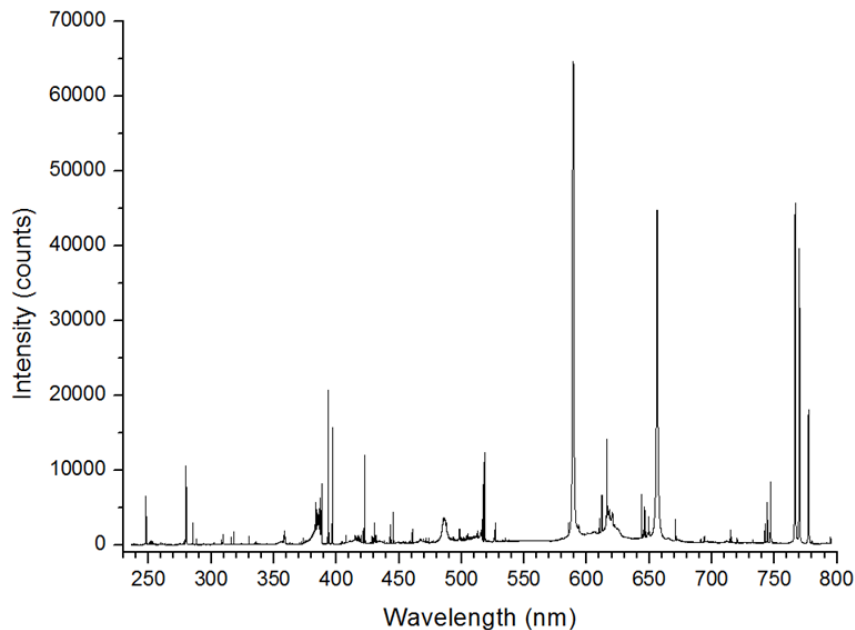


Figura 4.8- Spettro LIBS del campione di cozza liofilizzata

Nella Tabella 4.3 è mostrato l'elenco degli elementi riportati nella certificazione, con le corrispondenti concentrazioni in peso e in confronto con i risultati LIBS. In verde sono evidenziate le linee spettrali degli elementi trovati sperimentalmente. Con la tecnica LIBS è stato possibile identificare 16 elementi (esclusi C, H, N and O) nel campione mentre gli elementi in traccia certificati e non osservati qui sono As, Cd, Hg e Se. In particolare, la riga analitica di Cr (425.4 nm) mostra il rapporto segnale/rumore $SNR \approx 6$, indicando che il limite di rilevamento LOD sia in ordine di 0.1 ppm. Diversamente, la riga analitica di Pb (405.8) qui ha $SNR \approx 4$, cioè vicino al limite di rilevamento, per la concentrazione dell'elemento di circa 2 ppm. Anche la riga di Zn ha $SNR \approx 4$, indicando che questo elemento ha il LOD di circa 50 ppm nelle presenti condizioni sperimentali.

Element	Mass Fraction (mg/kg)	Analytical line (nm)	S/N
Aluminum	Unknown	396.15	NC
Arsenic	6.7 ± 0.4	-	-
Cadmium	0.336 ± 0.025	-	-
Calcium	Unknown	422.67	NC
Chromium	0.73 ± 0.22	425.43	6
Copper	5.98 ± 0.27	324.75	8
Iron	161 ± 8	259.94*	84
Lead	2.18 ± 0.18	405.78	4
Magnesium	Unknown	285.21	NC
Manganese	4.88 ± 0.24	257.61*	14
Mercury	0.071 ± 0.007	-	-
Phosphorus	Unknown	253.56	NC
Potassium	Unknown	769.90	NC
Rubidium	2.46 ± 0.16	780.01	18
Selenium	1.62 ± 0.12	-	-
Silicon	Unknown	288.16	NC
Sodium	Unknown	595.59	NC
Strontium	Unknown	407.77*	NC
Titanium	Unknown	336.12*	NC
Zinc	71 ± 4	334.5	4

Tabella 4.3; Elementi rilevati con la tecnica LIBS in tessuto di cozza liofilizzata, standard ERM-CE248k. In verde sono evidenziate le linee spettrali degli elementi trovati sperimentalmente *Riga ionica ; NC = Non calcolato

4. Annex 5 Misure LIF

5.1 Riso

5.1.1 Grani

I risultati delle misure di Fluorescenza Indotta da Laser (LIF) mostrate in figura 5.1 hanno evidenziato differenze principalmente nelle emissioni a due lunghezze d'onda: a 340 nm, dove tutte le varietà analizzate hanno un picco di emissione, tranne il riso integrale C, e a 450 nm. Tale banda, infatti, per il riso integrale si sposta a @460 nm.

Si osserva inoltre un debole picco a @670 nm, caratteristico della clorofilla, presente probabilmente a causa delle lavorazioni industriali, in tutti le varietà di riso in grani, tranne per il Basmati C e l'Integrale C. Questo risultato, in ogni caso, sottolinea la sensibilità e la selettività della tecnica.

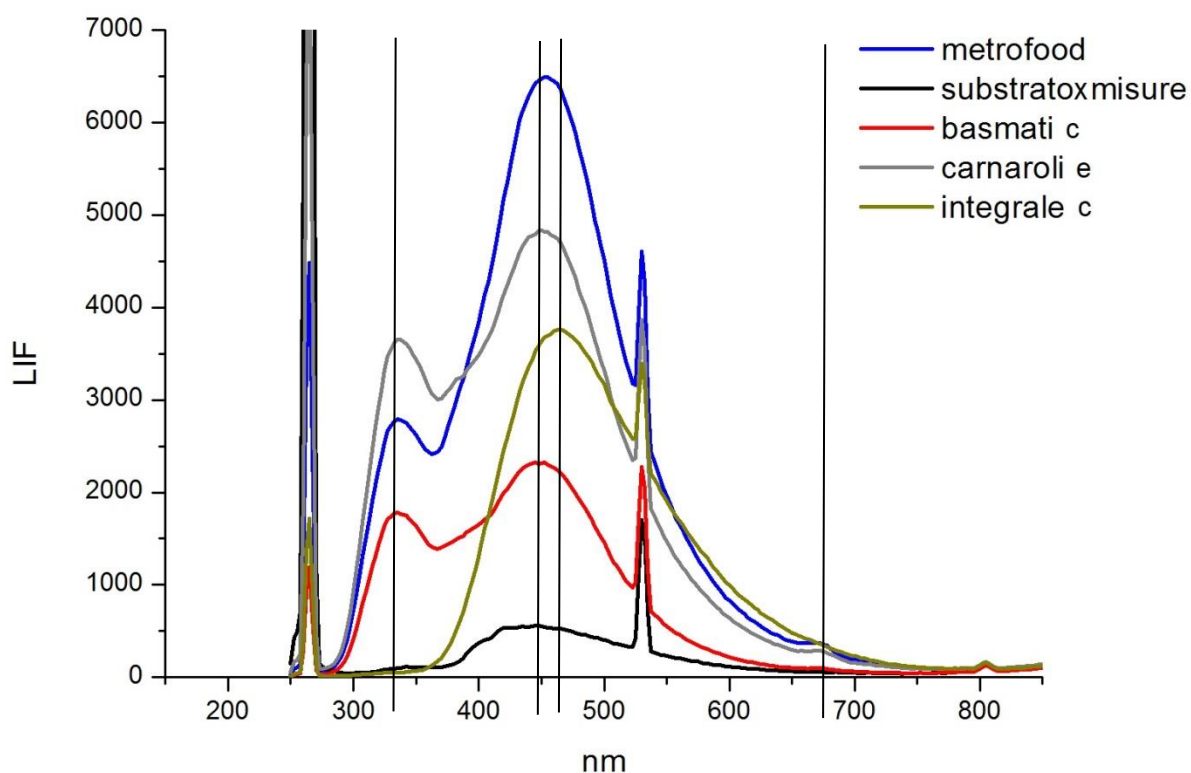


Figura 5.1- Spettri di fluorescenza di grani di riso di diverse cv. (Substratoxmisure si riferisce al portacampione in alluminio)

I risultati ottenuti con la PCA hanno evidenziato la separazione dei 4 gruppi di varietà analizzate ed in particolare la varietà integrale C (figura 5.2)

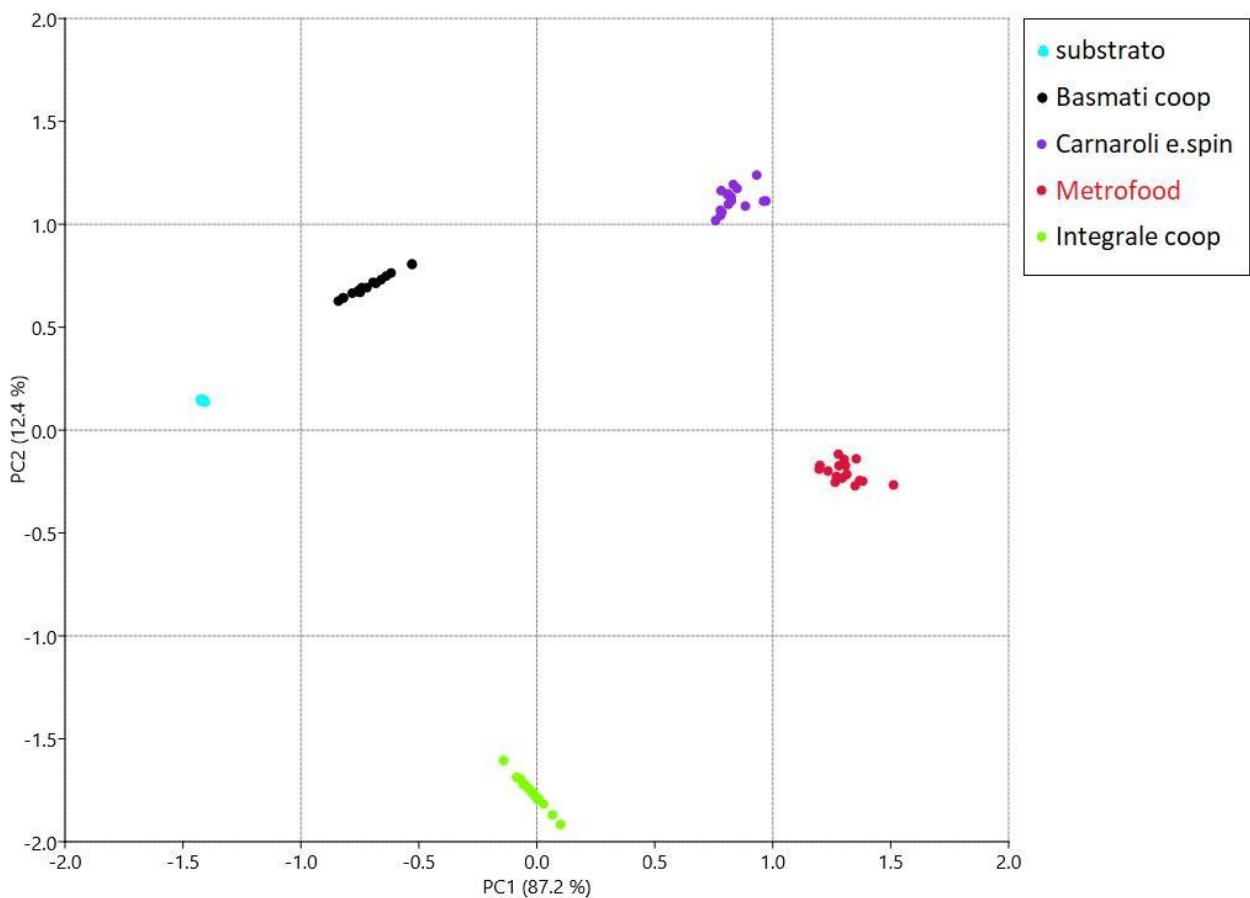


Figura 5.2- PCA delle misure LIF di grani di riso delle diverse cv in confronto con il campione METROFOOD

5.1.2 Farine

I risultati ottenuti sulle farine di riso misurate in pasticche, ottenute in laboratorio pressando 10 g di farina, sono mostrati in figura 5.3. Si osserva una emissione a 340 per tutti i campioni analizzati, anche se con diverse intensità. Il picco della banda a circa 450 nm, non è presente in tutti i campioni. Infatti, è assente sia nell'integrale B che in Carnaroli E, mentre è molto intensa, rispetto alla banda a 340, nella farina integrale. Lo standard NIST, pur avendo un profilo simile, ha una banda larga intorno 470 nm spostata a lunghezza d'onda maggiore rispetto a quelle degli altri campioni di farine studiati.

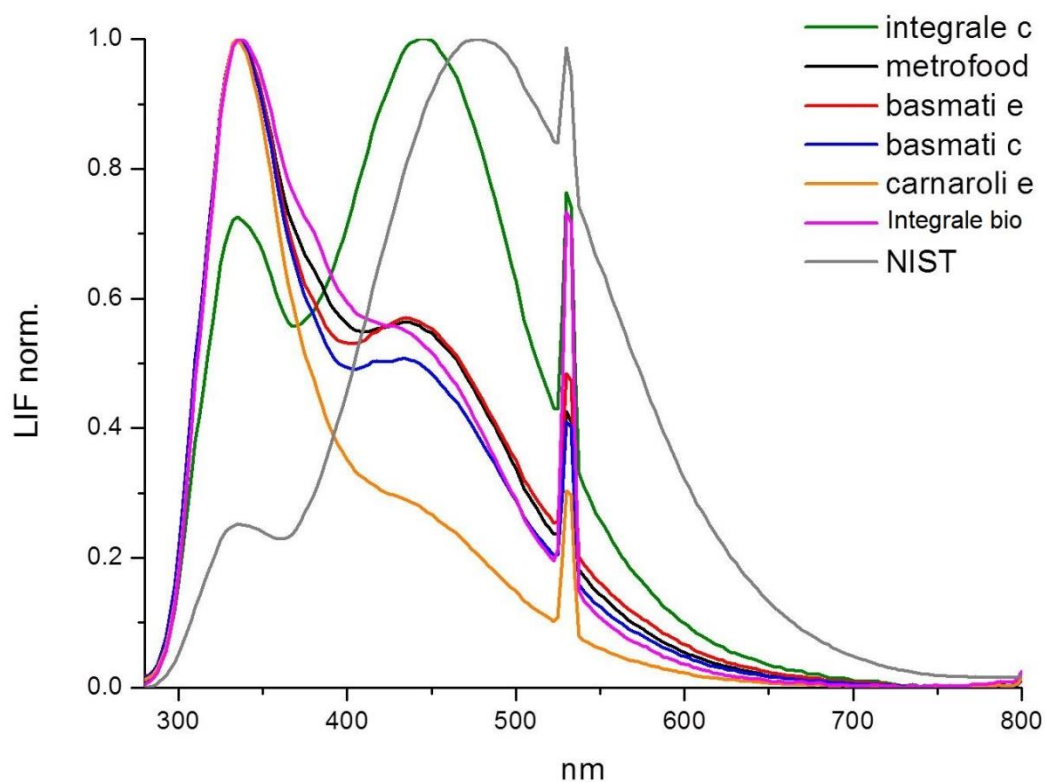


Figura 5.3- Spettri di fluorescenza di farine di riso, in pasticca, di diverse cv in confronto con lo standard NIST

I risultati dell'analisi PCA sono mostrati in figura 5.4 ed evidenziano ancora maggiormente queste differenze. E', infatti, evidente un cluster di 4 campioni, tra cui METROFOOD, completamente distinti dallo standard NIST, l'integrale C e il Carnaroli E.

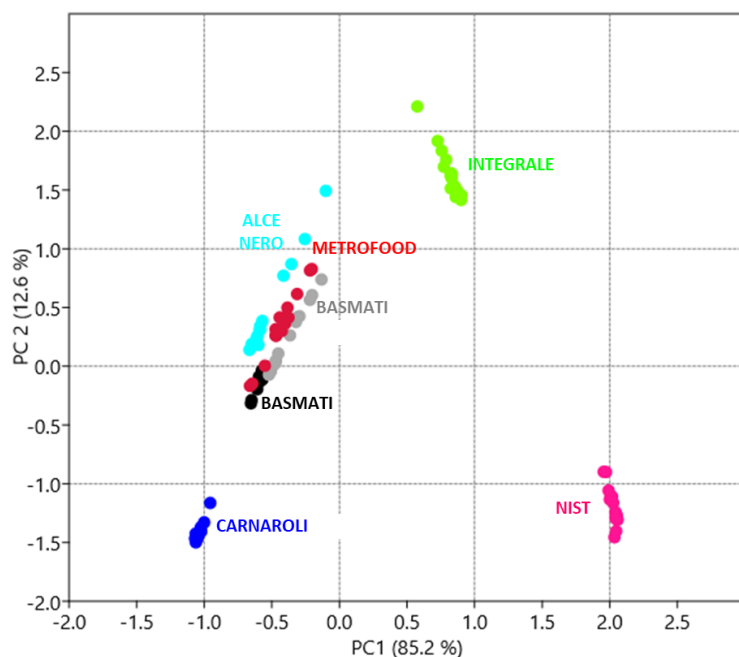


Figura 5.4- PCA delle misure LIF di farina di riso delle diverse cv in confronto con lo standard NIST

Se si confrontano gli spettri dei chicchi e quelli delle farine (figura 5.5) del solo campione METROFOOD si osservano variazioni delle intensità relative delle 2 bande principali presenti. Inoltre il picco a 450 appare spostato verso destra a lunghezza d'onda maggiore negli spettri relativi ai chicchi rispetto a quelli relativi alle farine. Il debolissimo picco che si osserva a 680, indice di presenza di clorofilla, sembrerebbe sparito nelle farine. Questo risultato potrebbe sostenere l'ipotesi che si tratti di contaminazioni delle lavorazioni, considerando che, con la macinatura i composti biochimici del grano vengono mescolati con conseguente "diluizione" di quelli già quantitativamente bassi.

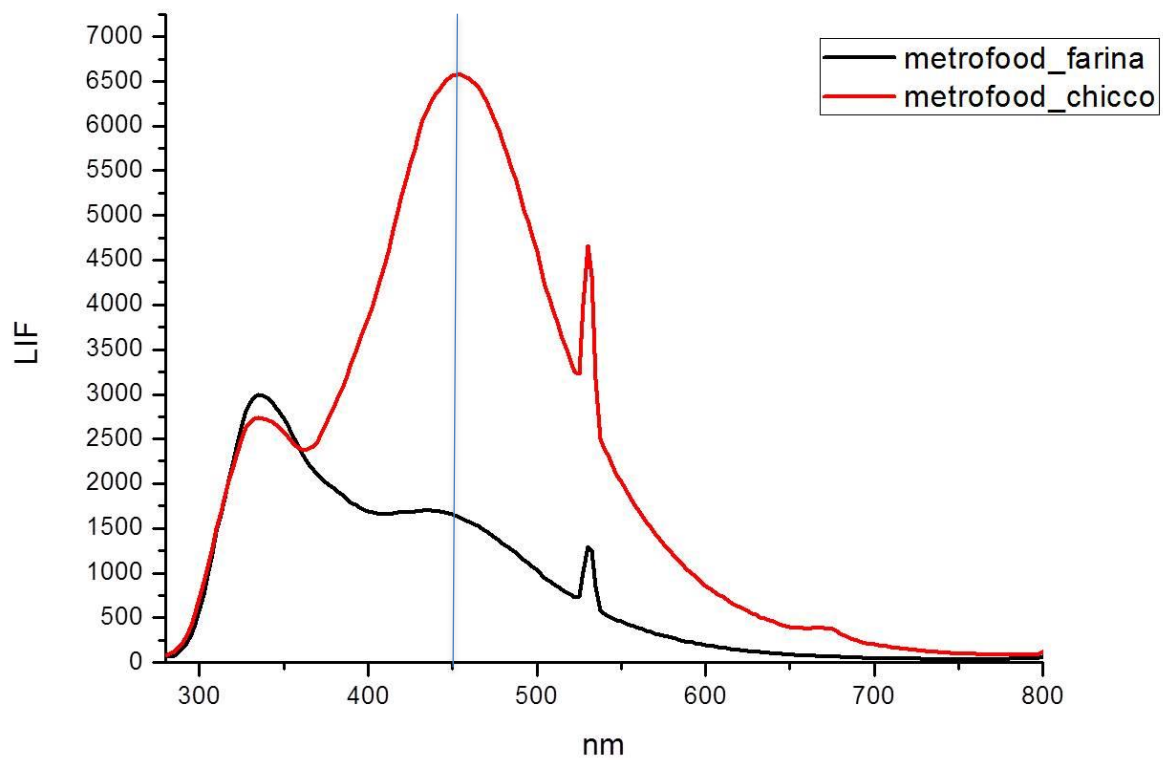


Figura 5.5- Confronto di spettri LIF di farina e grani del campione METROFOOD

5.2 Ostrica e standard ERM-CE278k

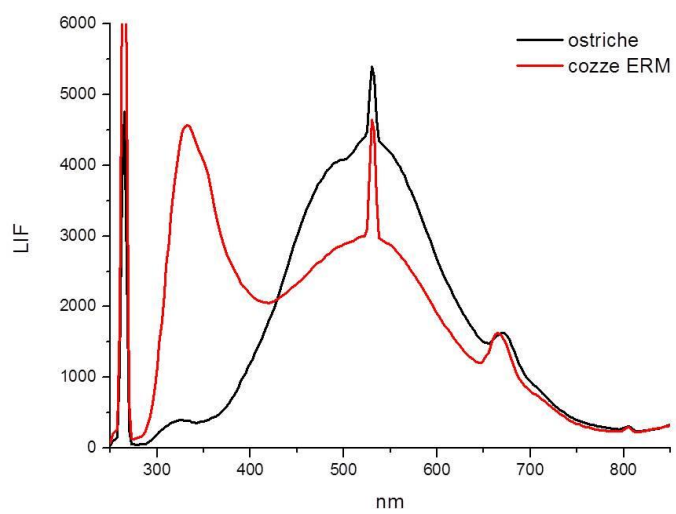


Figura 5.6 - Confronto di spettri LIF di farina di campioni di cozza e ostrica

Dal grafico si osservano delle differenze in corrispondenza @ 350 nm per lo standard di liofilizzato di cozze e @495 per il campione di liofilizzato di ostriche. L'analisi PCA conferma il risultato osservato (figura 5.7)

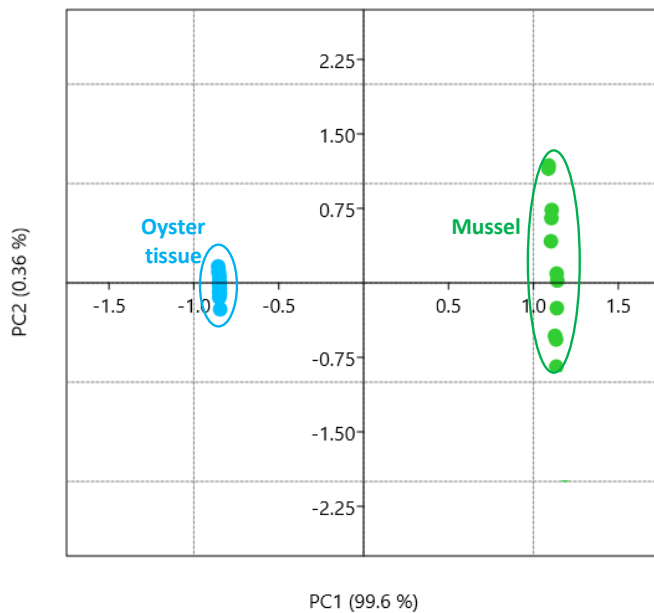


Figura 5.7 - PCA delle misure LIF di farina di cozza e ostrica

4 Ringraziamenti

Si ringrazia il Dipartimento di Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali (SSPT) ed in particolare la Dr.ssa Giovanna Zappa, il Dr. Massimo Iannetta & la Dr.ssa Claudia Zoani.

5 Bibliografia

-
- 1 Lai A., Santangelo E., Soressi G.P., Fantoni R. "Analysis of the main secondary metabolites produced in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) epicarp tissue during fruit ripening using fluorescence techniques" *Postharvest Biology and Technology* 43 (2007) 335–342
 - 2 Sighicelli M., Patsaeva S., Lai A. *Measuring pigments distribution in blood oranges during post-harvest by spectroscopy technique* 29th EARSeL Symposium, MAI Chania, 15-18 June 2009 p 127
 - 3 Lai A. 2017. *Diagnostica precoce e non distruttiva, mediante tecniche spettroscopiche, per la valutazione della qualità dei prodotti ortofrutticoli*. *AIPnD GIORNALE* 04/17 51-57
 - 4 M. Sighicelli, F.Colao, S.Patsaeva and A. Lai. 2008 *Monitoring Post-Harvest Orange Fruit Disease By Fluorescence And Reflectance Hyperspectral Imaging* *Acta Horticulturae* N.817, 277-284
 - 5 Puiu A., Giubileo G., Lai A. "Investigation of plant-Pathogen interaction by laser-based photoacoustic spectroscopy" *Int. J. Thermophys.* (2014) 15: 2237-2245
 - 6 Giubileo G., Lai A., Piccinelli D., Puiu A. 2010. Laser diagnostic technology for early detection of pathogen infestation in orange fruits *Nucl. Instr. and Meth. A*, doi:10.1016/j.nima.2010.02.265

-
- 7 Giovenzana V., Beghi R., Civelli R., Guidetti R., 2015- "Optical techniques for rapid quality monitoring along minimally processed fruit and vegetable chain" *Trends in Food Science & Tecnology* 46 331-338
 - 8 Costa G., Bonora E., Fiori G., & Noferini M., 2011. "Innovative non-destructive device for fruit quality assessments" *Acta Horticulturae* 913: 575-581.
 - 9 McKeivith B. 2004 Nutritional aspects of cereals *Nutr. Bull.* 29 : 111–142
 - 10 Zhou Z., Robards K., Helliwell S., Blanchard C., 2002. Composition and functional properties of rice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37 849–868
 - 11 Feng X., Zhang Q., Cong P., Zhu Z., 2013 "Preliminary study on classification of rice and detection of paraffin in the adulterated samples by Raman spectroscopy combined with multivariate analysis", *Talanta* 115 548–555
 - 12 Lee Phillips D., Xing J., Liu H., Pan D.-H., Corke H., 1999 "Potential Use of Raman Spectroscopy for Determination of Amylose Content in Maize Starch" *Cereal. Chem.* 76(5):821–823
 - 13 <https://www.medicalnewstoday.com/articles/319797.php>
 - 14 Guo Y., Cai W., Tu K., Tu S., Wang S., Zhu X., and Zhang W., 2012 "Infrared and Raman Spectroscopic Characterization of Structural Changes in Albumin, Globulin, Glutelin, and Prolamin during Rice Aging" *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 185–192
 - 15 Gibaek K., Jihyun K., Jeunghwan C., and Kihong P. 2012 "Detection of Nutrient Elements and Contamination by Pesticides in Spinach and Rice Samples Using Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS)" *J. Agric. Food Chem.*, 60, 718–724
 - 16 González A., Armenta S., de la Guardia M., 2011. "Geographical traceability of "Arròs de Valencia" rice grain based on mineral element composition" *Food Chemistry* 126: 1254–1260
 - 17 Hwang J., Kang S., Lee K., Chung H.. 2012. "Enhanced Raman spectroscopic discrimination of the geographical origins of rice samples via transmission spectral collection through packed grains" *Talanta* 101 : 488–494
 - 18 Y. Guo, W. Cai, K. Tu, S. Tu, S. Wang, X. Zhu and W. Zhang, "Infrared and Raman spectroscopic characterization of structural changes in albumin, globulin, glutelin, and prolamin during rice aging", *J Agric Food Chem.* 2013, 61(1):185-92. doi: 10.1021/jf303345r

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
gennaio 2019