

## METODI BASATI SULLA RISONANZA DI SPIN ELETTRONICO

Emanuela Bortolin, Maria Cristina Quattrini, Sara Della Monaca  
 Servizio Grandi Strumentazioni e Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Nelle matrici alimentari la radiazione ionizzante produce radicali liberi che possono essere rivelati attraverso la tecnica della risonanza di spin elettronico (*Electron Spin Resonance*, ESR) e utilizzati come marcatori per l'identificazione degli alimenti irradiati. 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 di acqua presente negli alimenti. Nelle matrici cristalline quali osso, lische di pesce, frutta secca o parti legnose, tuttavia, i radicali prodotti rimangono sufficientemente stabili rendendo possibile l'identificazione dell'irraggiamento.

I metodi basati sull'utilizzo della tecnica della risonanza di spin elettronico, approvati a livello europeo dal CEN (*Comité Européen de Normalisation*) e recepiti dall'Ente Nazionale Italiano di Unificazione, UNI, indicati per l'identificazione dell'irraggiamento nelle matrici del "Piano nazionale di controllo ufficiale sugli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti", sono i seguenti:

- EN 1786:1997 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti ossa. Metodo per spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR);
- EN 1787:2000 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti cellulosa mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR);
- EN 13708:2002 Ricerca di alimenti irraggiati contenenti zucchero cristallino mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR).

### Risonanza di spin elettronico

La tecnica della risonanza di spin elettronico o tecnica ESR è in grado di rivelare specie chimiche con elettroni non accoppiati (es. radicali liberi) immerse in un campo magnetico. In Figura 1 è riportata una descrizione schematica della tecnica.

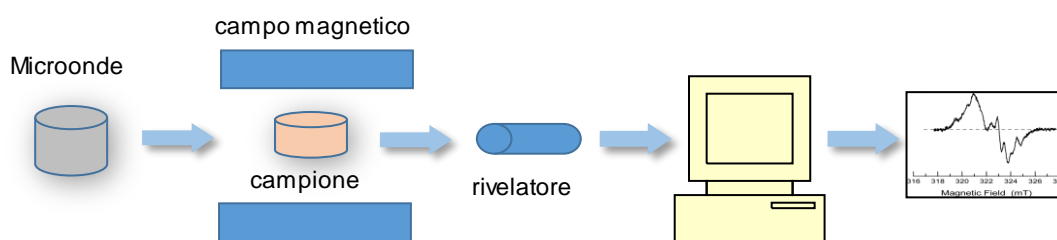


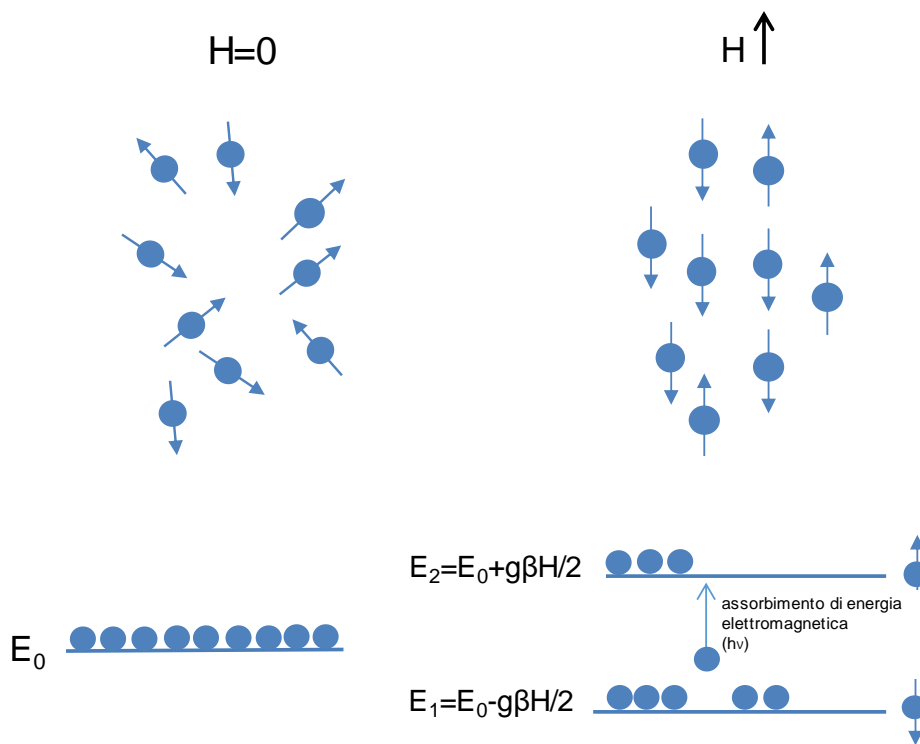
Figura 1. Rappresentazione schematica di un esperimento di risonanza di spin elettronico

Gli elettroni non accoppiati, presenti nel campione posto all'interno del campo magnetico, assorbono energia elettromagnetica da una radiazione incidente (microonde) producendo uno spettro di assorbimento caratteristico della specie chimica esaminata. Il fenomeno è rappresentato in modo semplificato in Figura 2, dove gli elettroni non accoppiati sono considerati, per maggiore chiarezza, liberi da interazioni reciproche e con i nuclei: in queste condizioni ad essi sono associati solo momenti magnetici di spin (rappresentati con frecce nella figura) dovuti alle correnti prodotte dai movimenti di rotazione degli elettroni intorno ai propri assi. In assenza di campo magnetico esterno i momenti magnetici di spin sono orientati in modo casuale e gli elettroni possiedono tutti la stessa energia  $E_0$ .

La presenza di un campo magnetico  $\mathbf{H}$  provoca l'allineamento del momento magnetico nella direzione del campo e un incremento dell'energia dell'elettrone della quantità  $1/2 g\beta H$ , che cresce all'aumentare dell'intensità del campo  $\mathbf{H}$  ed è positiva o negativa a seconda del verso dello spin, concorde o discorde con il campo  $\mathbf{H}$  rispettivamente. In queste condizioni, fornendo al sistema l'energia elettromagnetica necessaria è possibile indurre la transizione di un elettrone dal livello energetico  $E_1$  al livello energetico  $E_2$ . La transizione avviene quando l'energia elettromagnetica di eccitazione,  $h\nu$ , è pari alla differenza in energia,  $g\beta H$ , tra i due livelli, ossia quando si realizza quella che viene definita la "condizione di risonanza":

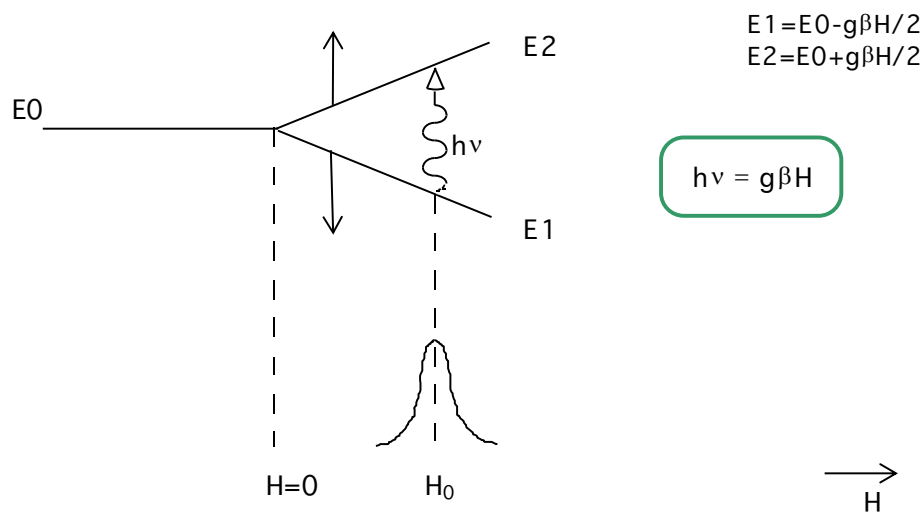
$$h\nu = g\beta H$$

dove  $g$  è il fattore di Landè dell'elettrone libero (2,0023),  $\beta$  è il magnetone di Bohr,  $h$  è la costante di Planck,  $\nu$  è la frequenza della radiazione elettromagnetica di eccitazione.



**Figura 2. Descrizione schematica del fenomeno fisico alla base della tecnica ESR. L'assorbimento avviene quando l'energia elettromagnetica di eccitazione  $h\nu$  è pari alla differenza in energia,  $g\beta H$ , tra i due livelli ( $E_1$  ed  $E_2$ ), generati dal campo magnetico esterno, ossia quando si realizza quella che viene definita la "condizione di risonanza"  $h\nu = g\beta H$**

Partendo dalla condizione di risonanza si possono immaginare due diversi metodi di misura: si può pensare di fissare il campo magnetico  $H$  e variare la frequenza  $\nu$  o viceversa. Nel primo caso si mantiene costante la separazione fra i livelli energetici e si varia la frequenza della radiazione incidente fino a raggiungere la condizione di risonanza. Nel secondo caso si fissa la frequenza e si modifica la spaziatura fra i livelli variando l'intensità del campo magnetico. Nella maggior parte delle tecniche spettroscopiche si utilizzano campi elettromagnetici a frequenza variabile dato che i livelli energetici, di solito, non possono essere modificati. Nel caso della tecnica ESR, per ragioni pratiche, si preferisce seguire il secondo tipo di approccio. Con la tecnica ESR si espone, quindi, il campione a una radiazione di frequenza opportuna e si esegue una scansione di campo magnetico sino a raggiungere un valore tale da ottenere la condizione di risonanza. Pertanto gli spettri ESR sono riportati in funzione dell'intensità del campo magnetico esterno (Figura 3).

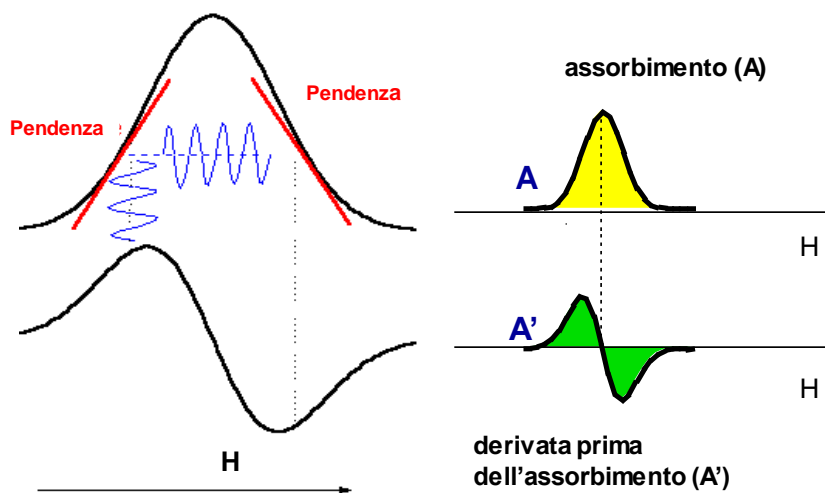


**Figura 3. Assorbimento risonante di energia elettromagnetica (microonde) da parte di elettroni non accoppiati immersi in un campo magnetico**

Sebbene siano possibili, in linea di principio, infinite scelte per la frequenza  $\nu$  e per il campo magnetico  $H$  che soddisfino la condizione di risonanza, in pratica si preferisce lavorare ad alte frequenze (microonde) per avere una maggiore sensibilità; la differenza fra le popolazioni dei due livelli energetici, dalla quale dipende il numero delle transizioni indotte dalla radiazione incidente e, quindi, l'assorbimento, cresce, infatti, linearmente (in prima approssimazione) all'aumentare della separazione energetica tra i due livelli e quindi, come conseguenza della condizione di risonanza, della frequenza della radiazione incidente.

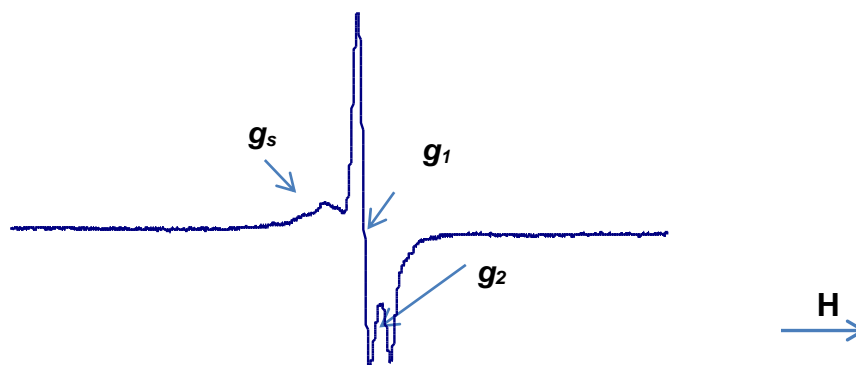
Il segnale ESR che si registra non ha la classica forma dei segnali di assorbimento (gaussiana o lorentziana), ma ne è la derivata prima e ha la forma di una curva bifasica del tipo di quelle mostrate in Figura 4 (in basso). Questa forma è prodotta da un particolare accorgimento tecnico per la rivelazione, detto "a sensibilità di fase", utile a ridurre il livello di rumore elettronico. Infatti, anche a frequenze elevate come quelle delle microonde che si usano normalmente ( $\nu = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ ), la sensibilità del sistema è piuttosto bassa. Allo scopo di aumentare la sensibilità della tecnica, gli spettrometri ESR utilizzano una modulazione con una frequenza dell'ordine dei 100 kHz del campo magnetico statico applicato e una rivelazione a sensibilità di fase che consente di rivelare solo i segnali, con frequenza pari a quella di modulazione, in fase con un opportuno segnale di

riferimento. In questo modo si ottengono segnali di assorbimento caratterizzati da un rapporto segnale-rumore che è ordini di grandezza superiore.



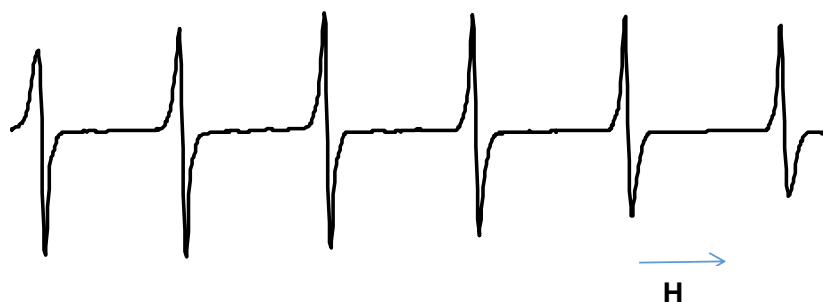
**Figura 4. Modulazione del campo magnetico statico H. Se l'ampiezza della modulazione del campo H è piccola rispetto alla larghezza della curva di assorbimento (A) il valore ottenuto in uscita sarà proporzionale alla pendenza della curva e quindi alla derivata prima (A') rispetto ad H della curva A**

Lo spettro ESR quasi mai è composto da un singolo segnale simmetrico (riga), ma è spesso estremamente complesso. Tale complessità è originata dalla presenza di altri spin (altri elettroni e nuclei a spin non nullo) in vicinanza dell'elettrone non accoppiato che si vuole esaminare, oltre che da possibili anisotropie del materiale. Il segnale ESR può avere per esempio una forma come quella di Figura 5.



**Figura 5. Spettro ESR di polvere di ossa di antra irradiate (3 kGy). Nello spettro sono evidenti tre righe: la riga presente anche nelle ossa non irradiate ( $g_s$ ) e le due righe ( $g_1$  e  $g_2$ ) dovuti al radicale  $CO_2^{\cdot -}$  che si forma per irraggiamento nell'idrossiapatite**

In questo caso, la molecola su cui si trova l'elettrone spaiato ha una simmetria assiale che si riflette nella forma di riga. In altri casi, lo spettro può essere composto da righe equidistanti e di uguale forma (Figura 6) che crescono tutte insieme al crescere della concentrazione dei radicali.



**Figura 6. Spettro ESR dello ione manganese  $Mn^{2+}$ .**  
Le 6 righe sono dovute all'interazione iperfine con il nucleo di spin 5/2

Questo effetto è creato da campi locali permanenti che sono generati dai nuclei vicini con spin nucleare diverso da zero e la cui presenza non dipende dal campo magnetico esterno. La presenza di campi magnetici locali determina il verificarsi della condizione di risonanza in corrispondenza di valori diversi del campo  $H$  esterno. Il fattore  $g$  ( $= h\nu/\beta H$ ), quindi, nei casi reali non è quello dell'elettrone libero, ma dipende dal campo magnetico locale che si aggiunge o si sottrae a quello esterno e può anche essere un tensore anisotropo. È d'uso identificare le risonanze attraverso il loro valore di  $g$  anche se gli spettri sono rappresentati in funzione del campo magnetico  $H$ , poiché  $g$  dipende soltanto dall'ambiente locale all'interno del materiale e non dalle condizioni di misura. Gli altri parametri che caratterizzano il segnale ESR sono: la larghezza di riga  $\Delta H$  e l'ampiezza picco-picco,  $A$ .

Lo spettro che si registra è quindi caratteristico della struttura in cui si trovano gli elettroni non accoppiati (i centri paramagnetici) e può essere utilizzato per l'identificazione di una molecola o di un radicale.

## Apparato strumentale e misura

Le parti essenziali di uno spettrometro ESR sono:

- magnete;
- sorgente a microonde;
- cavità risonante;
- sistema per la rivelazione del segnale.

Il campo magnetico statico è solitamente generato da un elettromagnete alimentato da una corrente che può variare linearmente in modo da ottenere una scansione del campo di ampiezza e velocità opportune. Se si utilizza, come avviene di solito, il metodo di rivelazione a "sensibilità di fase" la corrente di alimentazione deve essere anche modulata ad una frequenza specifica (50-100 kHz).

La sorgente è costituita, nella maggior parte degli apparati, da un diodo gunn che fornisce onde elettromagnetiche con lunghezze d'onda nella regione delle microonde. La potenza del fascio può essere regolata da un attenuatore che, generalmente, consente riduzioni da 0 a 60 dB.

La cavità risonante è essenzialmente, una porzione di guida d'onda, chiusa agli estremi, nella quale si crea un sistema di onde stazionarie. La frequenza di risonanza è determinata dalle dimensioni della cavità stessa.

Il rivelatore è rappresentato da un diodo al silicio collegato ad un amplificatore di basso rumore. Il diodo si comporta come un rettificatore di microonde che trasforma l'onda elettromagnetica incidente in un segnale elettrico di corrente. Poiché il campo magnetico,  $H$ , cui è sottoposto il campione, è modulato, anche il segnale di corrente rivelato risulta periodico con frequenza uguale a quella del campo modulante (50-100 kHz). Il segnale dal diodo, opportunamente filtrato e amplificato viene inviato insieme alla corrente di modulazione all'ingresso di un rivelatore di fase che fornisce in uscita un valore di tensione che dipende dall'ampiezza del segnale di corrente e dalla differenza di fase tra i due ingressi. Il metodo di rivelazione appena descritto, noto come "rivelazione a sensibilità di fase", presenta il vantaggio della riduzione del rumore di fondo che si traduce in una diminuzione della soglia di rivelazione e, di conseguenza, in un aumento della sensibilità. Il rivelatore a sensibilità di fase, infatti, trasferisce soltanto quelle componenti del segnale presente in ingresso che hanno frequenza pari a quella del segnale di riferimento (segnale di modulazione) e che presentano una determinata relazione di fase con tale segnale. Le componenti spurie, che possono avere frequenze diverse da quella di riferimento e cambiano molto rapidamente fase, vengono bloccate. L'azione di filtraggio si esplica così a due livelli: a livello della frequenza, perché viene trasmessa solo la frequenza fondamentale, e a livello della fase. Variando la costante di tempo del sistema si possono ottenere bande passanti molto strette che consentono di aumentare notevolmente la precisione di misura.

Esistono in commercio, forniti da varie ditte, diversi tipi di spettrometri con dimensioni, costi e prestazioni diversi. Sono disponibili anche apparati appositamente progettati e configurati per le analisi sugli alimenti irradiati. Si tratta di spettrometri dotati di magneti permanenti e tubi per l'inserimento dei campioni che possono contenere *marcatori standard* certificati specifici per la categoria di matrici da analizzare.

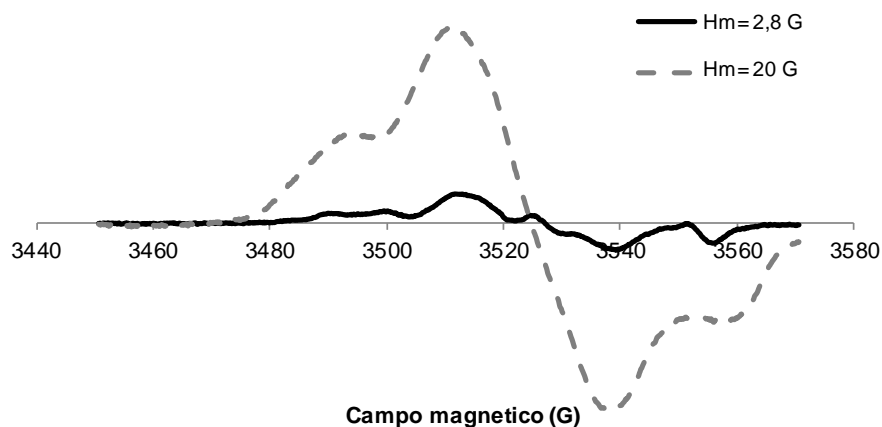
Per eseguire la misura il campione viene introdotto nella cavità risonante all'interno di appositi tubi in vetro o quarzo del diametro di qualche millimetro come quelli mostrati in Figura 7.



**Figura 7. Tubi utilizzati per l'inserimento dei campioni nella cavità risonante**

Gli spettri ESR dipendono fortemente dalle condizioni di misura adottate (ampiezza di modulazione e potenza effettiva del fascio a microonde, per esempio) e dalle caratteristiche del campione (presenza di acqua, tipo di specie paramagnetica, temperatura). Una scelta non opportuna dei parametri di registrazione può determinare distorsioni, anche notevoli, dei segnali esaltando alcune componenti ed escludendone altre. D'altra parte questa possibilità, offerta dalla tecnica ESR, di modificare le caratteristiche dello spettro fissando opportunamente le condizioni di registrazione può tornare utile in alcuni casi: quando ad esempio si studiano segnali parzialmente sovrapposti il fatto di poterne eliminare alcuni permette di discriminarli e di effettuare misure più accurate.

L'ampiezza di modulazione,  $H_m$ , deve essere mantenuta piccola rispetto alla larghezza di riga; soltanto in questo caso, infatti, lo spettro ottenuto corrisponde alla derivata prima della curva di assorbimento. Gli effetti di una sovr modulazione sono illustrati in Figura 8.



**Figura 8. Segnale ESR indotto dalla radiazione ionizzante in un campione di uvetta registrato in diverse condizioni di modulazione del campo magnetico esterno H**

Per piccoli valori dell'ampiezza di modulazione (molto minori dell'ampiezza di riga) la forma della curva rimane costante mentre l'ampiezza picco-picco cresce in maniera proporzionale all'ampiezza di modulazione; quando ci si avvicina all'ampiezza di riga l'ampiezza picco-picco diminuisce mentre aumenta la sua larghezza. Quindi la sovr modulazione determina una distorsione del segnale. In genere è opportuno scegliere il valore massimo dell'ampiezza di modulazione nell'intervallo di proporzionalità.

Per quanto riguarda la scelta della frequenza di modulazione, generalmente sarebbe preferibile lavorare ad alte frequenze. Infatti, sebbene la rivelazione a sensibilità di fase migliori il rapporto segnale-rumore, anche con questo metodo si ha comunque una componente spuria, non trascurabile, del segnale. Lo stesso rivelatore, infatti, genera rumore. Poiché tale contributo è all'incirca inversamente proporzionale alla frequenza di modulazione, l'uso di modulazioni ad alta frequenza ne consente la riduzione. La maggior parte degli spettrometri di piccola dimensione, come quelli utilizzati per la rivelazione degli alimenti irradiati, utilizzano 100 kHz.

Il sistema di rivelazione a sensibilità di fase agisce come un filtro passa-basso, a resistenza e capacità, estremamente sensibile e selettivo la cui larghezza di banda è determinata dalla costante di tempo  $\tau = RC$ . La costante di tempo, o tempo di risposta, è quindi una misura dell'incapacità del rivelatore a banda stretta di amplificare senza distorsione segnali che sono registrati in un tempo piccolo rispetto a  $\tau$ . Affinché il segnale non venga distorto è necessario quindi che il tempo  $\Delta t$  impiegato dal campo di scansione per passare tra i due punti a mezza altezza del segnale sia dell'ordine di  $10 \tau$ . Se questa condizione non è soddisfatta, allora la forma della riga registrata risulterà distorta. Poiché il rumore aumenta all'aumentare della costante di tempo, sperimentalmente è conveniente, per prima cosa, scegliere la costante di tempo in maniera da rendere massimo il rapporto segnale-rumore e in secondo luogo scegliere la velocità di scansione del campo magnetico in modo che la condizione  $\Delta t = 10 \tau$  sia soddisfatta.

La potenza del fascio di microonde incidente sul campione caratterizza il flusso di energia dalla radiazione al sistema di spin. Finché la potenza si mantiene bassa, l'energia fluisce in modo efficiente dal sistema di spin all'ambiente circostante, gli spin si liberano velocemente dell'energia acquisita dal campo elettromagnetico e la differenza tra le popolazioni dei due livelli del sistema rimane pressoché costante. In questo caso, all'aumento della potenza incidente, corrisponde un aumento della potenza assorbita e, quindi, dell'ampiezza del segnale. In questa fase l'ampiezza ESR del segnale aumenta proporzionalmente alla radice quadrata della potenza

incidente. Man mano che la potenza cresce, il sistema non è più in grado di “smaltire” l’energia in eccesso; in queste condizioni gli spin non accoppiati non rispondono più in modo efficiente e tempestivo alle sollecitazioni esterne e il sistema entra in “saturazione”. In questa fase, l’ampiezza ESR del segnale, raggiunto il massimo, decresce e tende a zero per valori elevati della potenza.

È possibile valutare il fattore  $g$  di un segnale inserendo in cavità, insieme al campione, una sostanza (marcatore) caratterizzata da un segnale ESR di cui è noto il valore del fattore  $g$  ( $g_M$ ).

Si utilizza la relazione:

$$g = g_M H_M / H_g$$

$H_M$  è il valore di campo magnetico corrispondente al segnale del marcatore.

$H_g$  è il valore di campo magnetico corrispondente al segnale incognito.

## Metodo UNI EN 1786

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti nelle ossa. I frammenti ossei provenienti da carni irradiate danno luogo, infatti, ad un *segnale anisotropo* complesso, composto da una prima riga stretta (ca. 0,3 mT) con  $g_1 \approx 2,002$  e una seconda riga di larghezza analoga (ca. 0,3 mT) con  $g_2 \approx 1,998$ , attribuito al radicale anione ( $CO_2^-$ ) radioindotto nell’idrossiapatite. I frammenti di ossa provenienti da carni non irradiate, invece, mostrano un debole segnale ESR consistente in una sola riga simmetrica con  $g_s \approx 2,005$ . La riga con  $g_s \approx 2,005$  è molto larga (da 0,8 a 1,0 mT) e la sua intensità può variare sensibilmente con la matrice in esame. Tale riga viene comunemente attribuita a specie radicaliche presenti nei residui organici ed è spesso visibile anche nei campioni di ossa prelevate da carni irradiate. La Figura 9 mostra gli spettri registrati con campioni di ossa prelevate da carni non irradiate e irradiate alla dose di 3 kGy.

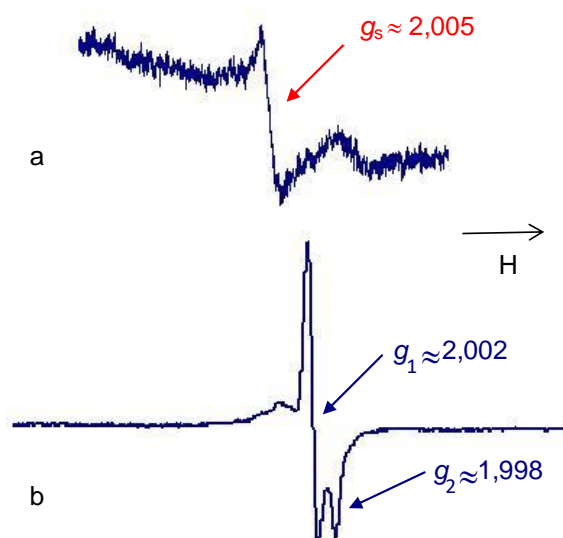


Figura 9. Spettro ESR di polvere di ossa di anatra non irradiata (a) e irradiata alla dose di 3 kGy (b)

Il metodo UNI EN 1786 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per manzo, pollo e trota. Ci sono evidenze sperimentali, tuttavia, che indicano che il metodo può essere applicato anche ad altre matrici di carni e pesci contenenti ossa o lisce. A livello nazionale nell’ambito dei programmi di ricerca finalizzata è stata verificata la possibilità di estendere il metodo



ad altre matrici quali: anatra, coniglio, equino, maiale, ovino e tacchino. L'intensità dei segnali ESR delle ossa irradiate non subisce variazioni significative per diversi mesi e i campioni rimangono identificabili per tutto l'arco dell'ipotetica durata di conservazione dei prodotti. Matrici con scarsa mineralizzazione possono presentare segnali ESR più deboli senza però causare problemi per la loro corretta identificazione qualitativa che è di fatto basata sulla morfologia dei segnali. I risultati della ricerca hanno anche indicato che i segnali ESR non sono significativamente influenzati dal riscaldamento del campione (es. la bollitura in acqua) e dal processo di congelamento.

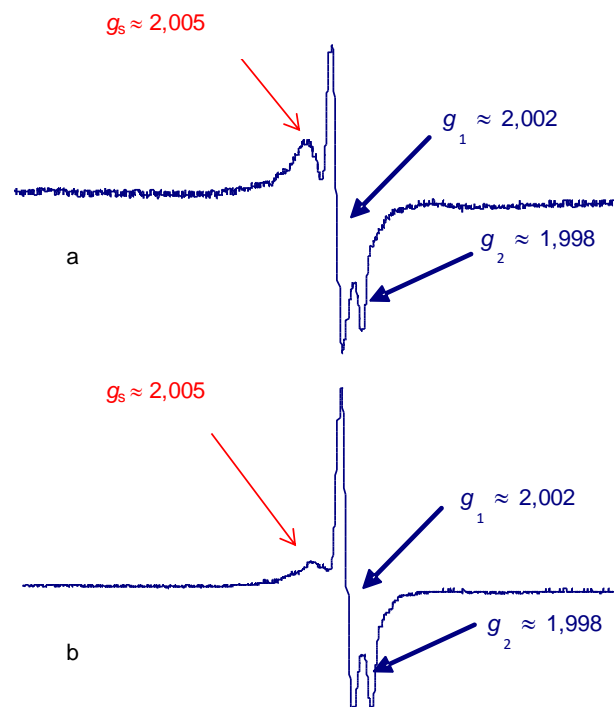
## Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine animale previste dal Piano sono: *seppie con osso, cosce di rana con ossa, pesci con lisca, pollame con ossa*. Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del protocollo a queste matrici.

### Matrici animali

#### Preparazione del campione

Procedere alla rimozione della parte edibile e del midollo osseo servendosi ad esempio di coltelli o bisturi di opportuna dimensione e forma. Frantumare grossolanamente le ossa o le lisce così ripulite (anche con l'uso di morsa e pinze) e in seguito lavarle più volte in acqua sotto vigorosa agitazione fino a che l'acqua di risciacquo resti incolore e sia priva di particolato in sospensione. Nel caso di matrici con una componente lipidica particolarmente elevata, può essere conveniente trattare i frammenti ossei con solventi organici (etanolo) (Figura 10).



**Figura 10. OSSA DI ANATRA IRRADIAE: spettri ESR di polvere non trattata (a) e trattata con etanolo (b); il segnale di origine organica  $g_s=2,005$  appare notevolmente ridotto dopo il trattamento con etanolo**

Essiccare il materiale osseo così trattato mantenendolo ad una temperatura inferiore a 50°C ed eventualmente polverizzarlo prima di inserirlo (circa 100-200 mg) nel tubo di misura.

### Registrazione dello spettro ESR

Si registra lo spettro ESR del campione, per esempio, nelle seguenti condizioni strumentali, utilizzando un marcatore per il calcolo dei valori di  $g$ :

Frequenza	ca. 9,7 GHz (banda X)
Campo centrale	ca. 342 mT
Intervallo di scansione	5-20 mT
Ampiezza di modulazione	0,2-0,4 mT
Potenza microonde	5-12,5 mW
Costante di tempo	50-200 ms
Velocità di scansione	2,5-10 mT/min

### Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni, facendo riferimento alla Figura 9, si utilizza lo schema decisionale della Tabella 1.

**Tabella 1. Metodo UNI EN 1786: schema decisionale applicato alle matrici indicate nel Piano**

Matrice	Segnale simmetrico $g_s=2,005$	Segnale anisotropo $g_1=2,002$ $g_2=1,998$	Risultato	Esito
Seppie con osso, cosce di rana con ossa, pesci con lisca, pollame con ossa	presente	assente	negativo	non irradiato
	assente	presente	positivo	irradiato

**Il metodo UNI EN 1786 applicato alle matrici indicate nel Piano è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido e non richiede conferma.**

## Metodo UNI EN 1787

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti nella cellulosa contenuta negli alimenti di origine vegetale.

In generale, da campioni non irradiati si ottiene un segnale simmetrico. Nei campioni trattati con radiazioni ionizzanti si nota invece un aumento del segnale simmetrico e la comparsa di due righe (picchi laterali o satelliti) di risonanza, alla sinistra e alla destra del segnale principale, distanti fra loro circa 6 mT. La Figura 11 mostra due esempi di spettri registrati con gusci di nocciole non irradiate (in alto) e irradiate (in basso). Il metodo UNI EN 1787 è stato validato, attraverso test ciechi, condotti a livello internazionale, per paprika, fragole e pistacchi. Ci sono evidenze sperimentali, tuttavia, che indicano che il metodo può essere applicato anche ad altre matrici vegetali quali: erbe e spezie in genere, frutti di bosco e frutta a guscio. A livello nazionale nell'ambito dei programmi di ricerca finalizzata finanziati dal Ministero della Salute è stata verificata la possibilità di estendere il metodo anche ad arachidi, mandorle, mirtilli, noci, nocciole e alcuni ingredienti per integratori a base di piante.



Figura 11. Esempi di spettri ESR di nocciole non irradiate (a) e irradiate alla dose di circa 6 kGy (b) (le frecce indicano i picchi satelliti distanti circa 6 mT)

La stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi, la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto.

## Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine non animale previste dal Piano Nazionale che possono essere analizzate con il metodo UNI EN 1787 sono: *erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali), frutta fresca (fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango), frutta a guscio (noci, nocciole, pistacchi, mandorle, arachidi e castagne), funghi essiccati.*

Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del metodo a queste matrici.

### Matrici non animali

#### ***Erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali)***

##### **Preparazione del campione**

*Prodotti in foglie:* ridurre le foglie a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR mediante l'utilizzo di mortaio e pestello.

*Prodotti in bacche:* ridurre le bacche a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR, mediante l'utilizzo di un bisturi.

*Prodotti in semi:* generalmente non è necessario effettuare alcun trattamento, tuttavia in alcuni casi (soia) è necessario asportare la cuticola mediante l'utilizzo di un bisturi.

*Prodotti in frutti:* generalmente non è necessario effettuare alcun trattamento.

In generale, utilizzare circa 100 mg di prodotto o una quantità sufficiente a riempire la regione di sensibilità della cavità di risonanza. Porre in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

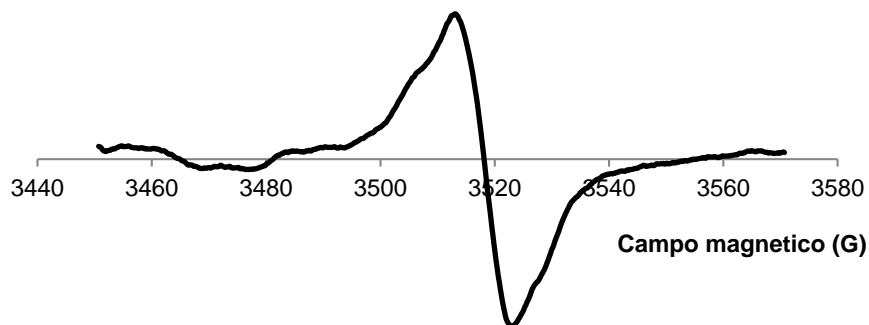
### Registrazione dello spettro ESR

Registrazione lo spettro ESR del campione, per esempio, nelle seguenti condizioni strumentali, senza utilizzare marcatori per la valutazione del fattore g. Di seguito i parametri di registrazione consigliati:

- Frequenza ca. 9,7 GHz (banda X)
- Campo centrale ca. 348 mT
- Intervallo di scansione ca. 20 mT
- Ampiezza di modulazione 0,4-1,0 mT
- Potenza microonde 0,4-0,8 mW
- Costante di tempo 100-200 ms
- Velocità di scansione 5-10 mT/min

### Valutazione dei risultati

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, gli spettri ESR di queste matrici appaiono spesso complessi e di difficile interpretazione, caratterizzati dalla sovrapposizione di segnali dovuti a radicali/centri paramagnetici diversi (Figura 12). Inoltre, la stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi, la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto. Quindi il campione può essere correttamente identificato solo nel caso in cui si possano individuare chiaramente, come nella Figura 11, i picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT e tipici della cellulosa irradiata. In questo caso si parla di *risultato positivo* e il campione risulta *irradiato*.



**Figura 12. GINGKO BILOBA: spettro ESR di un campione di foglie irradiato alla dose di 5 kGy. Nello spettro la presenza di diversi segnali sovrapposti non consente l'individuazione dei picchi laterali del segnale della cellulosa irradiata**

In tutti gli altri casi (picchi satelliti ad una distanza diversa da circa 6 mT, spettro complesso e di difficile interpretazione, assenza di picchi satelliti), il risultato è *negativo* ma non permette di identificare il campione come non irradiato e *l'analisi deve essere ripetuta con un altro dei metodi riportati nel Piano*. Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 2.

Tabella 2. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato a erbe, spezie e ingredienti per integratori

Matrice	Picchi satelliti distanti $\approx 6$ mT	Risultato	Esito	Azioni
Erbe, spezie e ingredienti per integratori (esclusi gli estratti vegetali)	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

**Il metodo UNI EN 1787 applicato a erbe, spezie e ingredienti per integratori è affidabile solo quando il risultato è positivo.**

### **Frutta fresca: fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango**

#### **Preparazione del campione**

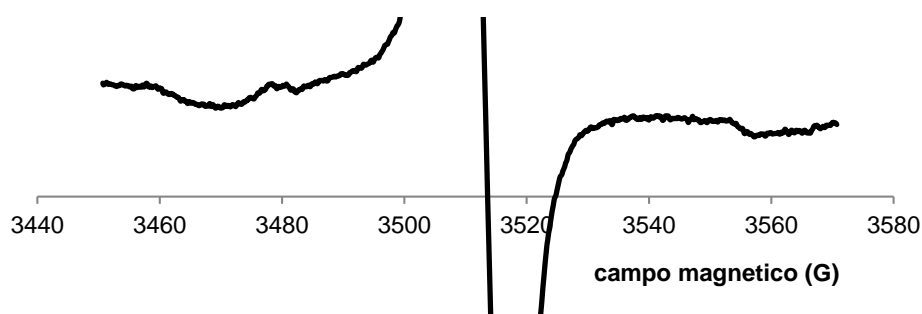
Separare i semi o le parti legnose dalla polpa. Nel caso dei frutti di bosco (fragole, ribes, more e mirtilli) trattare i frutti con un omogeneizzatore a lame e proseguire aggiungendo circa 500 mL di acqua mescolando accuratamente. Lasciare sedimentare i semi o le parti legnose sul fondo ed eliminare l'acqua insieme alla polpa in superficie. Ripetere questa procedura una o più volte in modo da rimuovere tutta la polpa. Filtrare i semi e/o le parti legnose e porli su carta da filtro al fine di eliminare l'acqua. Asciugare in stufa a circa 45°C per un'ora circa. Inserire il campione (circa 100 mg) nel tubo ESR.

#### **Registrazione dello spettro ESR**

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

#### **Valutazione dei risultati**

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, gli spettri ESR di queste matrici appaiono spesso complessi, caratterizzati dalla sovrapposizione di segnali dovuti a radicali/centri paramagnetici diversi e quindi di difficile interpretazione (Figura 13).



**Figura 13. MIRTILLI FRESCHI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 0,15 kGy. I picchi laterali identificabili non presentano la corretta separazione**

Inoltre, la stabilità dei radicali radioindotti dipende molto dalle condizioni (umidità e temperatura) di conservazione e, in alcuni casi la loro sopravvivenza può essere inferiore alla durata di conservazione del prodotto. Sulla base dei dati a disposizione, inclusi quelli ottenuti nell'ambito di progetti di ricerca finalizzata, il segnale radioindotto in mirtilli e fragole, in condizioni normali di conservazione, risulta visibile per periodi di tempo sufficienti a coprire l'intera durata di conservazione del prodotto solo per dosi di trattamento superiori o uguali a 1 kGy. Quindi il campione può essere correttamente identificato solo nel caso in cui si possano individuare chiaramente, come nella Figura 11 i picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT e tipici della cellulosa irradiata. In questo caso si parla di *risultato positivo* e il campione è identificato come *irradiato*. In tutti gli altri casi (picchi satelliti ad una distanza diversa da circa 6 mT, spettro complesso di difficile interpretazione, assenza di picchi satelliti), il risultato è *negativo* ma non permette di identificare il campione come non irradiato e *l'analisi deve essere ripetuta con un altro dei metodi riportati nel Piano*.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 3.

**Tabella 3. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato alla frutta fresca indicata nel Piano**

<b>Matrice</b>	<b>Picchi satelliti distanti <math>\approx</math> 6 mT</b>	<b>Risultato</b>	<b>Esito</b>	<b>Azioni</b>
Fragole, mirtilli, ribes, more, papaya, avocado, mango	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

**Il metodo UNI EN 1787 applicato alla frutta fresca indicata nel Piano è affidabile solo quando il risultato è positivo.**

### ***Frutta a guscio: noci, nocciole, mandorle, arachidi, pistacchi, castagne***

#### **Preparazione del campione**

Ridurre il guscio del campione (circa 50-100 mg) in frammenti di dimensioni opportune per essere inseriti all'interno dei tubi ESR usando per esempio tenaglie o forbici (o un mulino elettrico). Porre in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

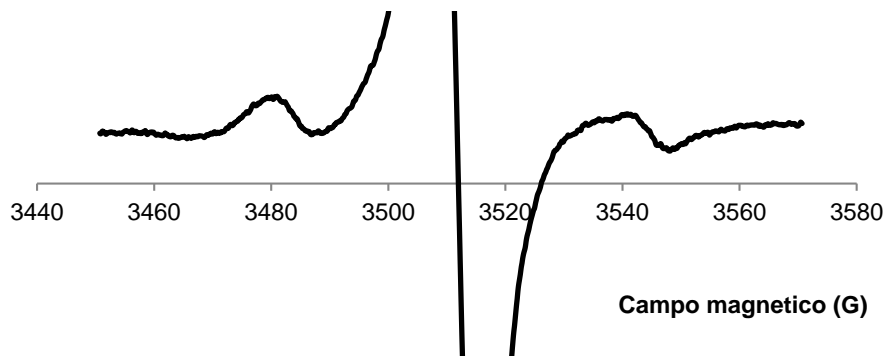
#### **Registrazione dello spettro ESR**

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

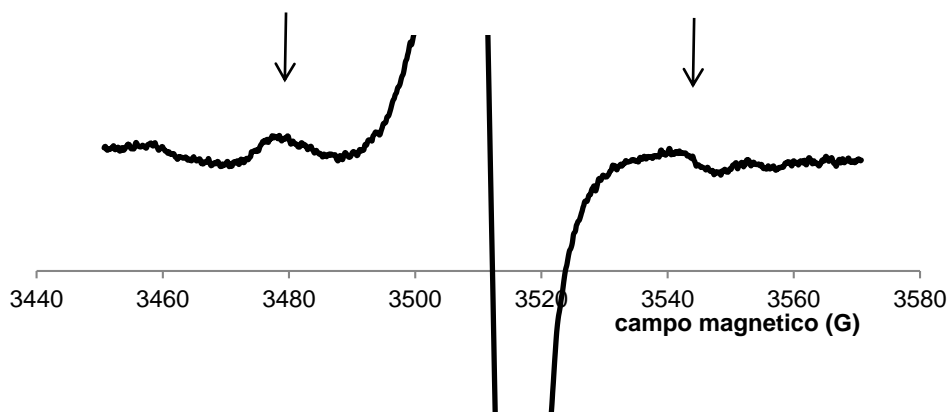
#### **Valutazione dei risultati**

Dall'esame della letteratura e sulla base dei risultati dei test di validazione internazionali e nazionali, il segnale ESR radioindotto (picchi satelliti) tipico della cellulosa irradiata nelle matrici quali noci, nocciole, pistacchi e mandorle, in condizioni normali di conservazione, risulta stabile e riconoscibile per periodi di tempo sufficienti a coprire l'intera durata di conservazione del prodotto (Figure 14 e 15).

Per matrici quali arachidi e castagne vi sono limitazioni dovute alla stabilità del segnale radioindotto non visibile chiaramente per l'intera durata di conservazione.



**Figura 14. NOCI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 5 kGy. I picchi laterali, distanti circa 6 mT e ben visibili, consentono di classificare il campione come irradiato**



**Figura 15. NOCI: spettro ESR di un campione irradiato alla dose di 5 kGy circa due anni prima dell'analisi. Nello spettro i picchi laterali sono ancora ben visibili e consentono di classificare il campione come irradiato**

Sulla base di quanto riportato sopra, il metodo consente, nei limiti sopra specificati, la classificazione di frutta a guscio irradiata (non irradiata) sulla base della presenza (assenza) dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT, tipici della cellulosa irradiata. In presenza dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT il risultato è *positivo* e il campione è identificato come irradiato; in assenza dei picchi il risultato è *negativo* e il campione è identificato come non irradiato.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 4.

**Tabella 4. Metodo UNI EN 1787: schema decisionale applicato alla frutta a guscio indicata nel Piano**

Matrice	Picchi satelliti distanti $\approx$ 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Noci, nocciole, pistacchi e mandorle	assenti	negativo	non irradiato	nessuna
	presenti	positivo	irradiato	nessuna
Arachidi e castagne	assenti	negativo	indeterminato	ripetere l'analisi con un altro dei metodi indicati nel Piano
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

**Il metodo UNI EN 1787 applicato a noci, nocciole, pistacchi e mandorle è affidabile e non richiede ulteriori indagini; il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido.**

**Per arachidi e castagne il metodo è affidabile solo se il risultato è positivo, in caso contrario è richiesta l'applicazione di un altro dei metodi riportati nel Piano.**

## ***Funghi essiccati***

### **Preparazione del campione**

Ridurre i campioni (circa 100 mg) a dimensioni adatte all'inserimento nei tubi ESR. Porre il campione in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

### **Registrazione dello spettro ESR**

Registrare lo spettro ESR del campione nelle condizioni strumentali indicate per erbe, spezie e ingredienti per integratori.

### **Valutazione dei risultati**

Sulla base dei dati riportati in letteratura e dei risultati dei test di validazione intralaboratorio, il segnale radioindotto tipico della cellulosa irradiata in queste matrici, in condizioni normali di conservazione, risulta stabile e riconoscibile per periodi di tempo sufficientemente lunghi (almeno un anno). Pertanto il metodo consente la classificazione di alimenti irradiati (non irradiati) sulla base della presenza (assenza) dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT, tipici della cellulosa irradiata. In presenza dei picchi satelliti alla sinistra e alla destra del picco centrale, distanti circa 6 mT il risultato è *positivo* e il campione è identificato come *irradiato*; in assenza dei picchi il risultato è *negativo* e il campione è identificato come *non irradiato*.

Per la valutazione dei risultati delle analisi e la classificazione dei campioni si utilizza lo schema decisionale della Tabella 5.

**Tabella 5. Schema decisionale relativo al metodo UNI EN 1787 applicato ai funghi essiccati**

Matrice	Picchi satelliti distanti $\approx$ 6 mT	Risultato	Esito	Azioni
Funghi essiccati	assenti	negativo	non irradiato	nessuna
	presenti	positivo	irradiato	nessuna

**Il metodo UNI EN 1787 applicato ai funghi essiccati è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido.**



## Metodo UNI EN 13708

Il metodo si basa sulla rivelazione, con tecnica ESR, dei radicali radioindotti negli zuccheri presenti in forma cristallina nella matrice alimentare.

In generale da campioni non irradiati si ottengono spettri complessi di debole intensità con, generalmente, un segnale simmetrico di intensità maggiore.

I campioni irradiati presentano invece uno spettro multicomponente che può assumere forme e ampiezze diverse (7,4-7,8 mT per campioni di mango e papaya essiccati; 8,7-9,1 mT per fichi secchi e uvetta) a seconda del tipo di zuccheri presenti nella matrice e della loro struttura.

La Figura 16 mostra due esempi di spettri registrati con campioni di uvetta irradiata e non irradiata.

Il metodo UNI EN 13708 è stato validato, attraverso test di validazione internazionali, per uvetta, fichi, mango e papaya essiccati.

La rivelazione di segnali radioindotti nello spettro ESR di un campione di frutta secca dipende dalla quantità di zuccheri presenti in forma cristallina. Per le matrici di fichi secchi e uvetta, in condizioni normali di conservazione, i segnali radioindotti non si modificano in modo significativo nel tempo e risultano stabili e riconoscibili per l'intera durata di conservazione del prodotto. Nel caso di campioni monocristallini lo spettro ESR potrebbe dipendere dall'orientamento del campione in cavità, nella maggior parte dei casi, tuttavia, i microcristalli orientati a caso producono uno spettro del tipo di quello dei campioni in polvere.

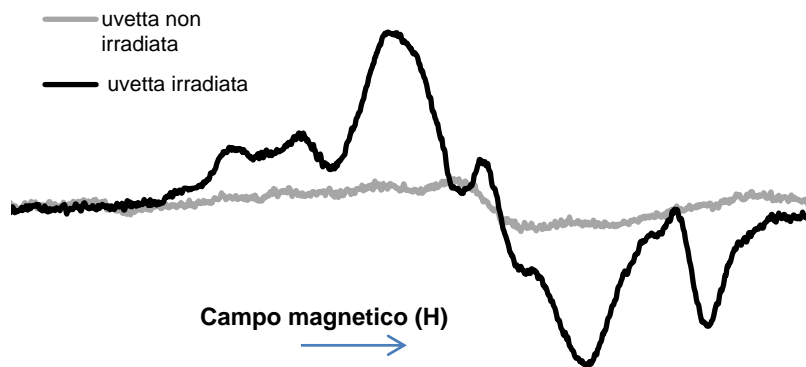


Figura 16. Esempi di spettri ESR di alimenti contenenti zuccheri in forma cristallina: uvetta non irradiata (linea grigia) e irradiata a circa 6 kGy (linea nera)

### Applicazione alle matrici del Piano

Le matrici di origine non animale previste dal Piano sono: *fichi secchi e uvetta*. Nei paragrafi seguenti vengono riportate indicazioni sull'applicazione del protocollo a queste matrici.

#### Matrici non animali

##### Preparazione del campione

Ridurre il campione in piccoli frammenti di dimensioni tali da poter essere inseriti nei tubi. Utilizzare 50-100 mg di prodotto essiccato in stufa a circa 45°C per circa un'ora.

## Registrazione dello spettro ESR

Si registra lo spettro ESR del campione, ad esempio, con le seguenti condizioni strumentali:

- Frequenza ca. 9,7 GHz (banda X)
- Campo centrale ca. 348 mT
- Intervallo di scansione 10-20 mT
- Ampiezza di modulazione 0,15-0,4 mT
- Potenza microonde ca. 5 mW
- Costante di tempo 100-200 ms
- Velocità di scansione 5-10 mT/min

## Valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati è basata sui dati ottenuti nel corso di test di validazione internazionali e nazionali e su dati di letteratura. Per la classificazione dei campioni, facendo riferimento alla Figura 16, si utilizza lo schema decisionale della Tabella 6.

**Tabella 6. Metodo UNI EN 13708: schema decisionale applicato alla frutta secca indicata nel Piano**

Matrice	Segnale simmetrico	Segnale multicomponente ampiezza totale (8,7-9,1 mT)	Risultato	Esito
Fichi secchi, uvetta	presente	assente	negativo	non irradiato
	assente	presente	positivo	irradiato

**Il metodo UNI EN 13708 applicato alla frutta secca indicata nel Piano è affidabile e non richiede ulteriori indagini. Il risultato analitico, positivo o negativo, è sempre valido e non richiede conferma.**

## Bibliografia di riferimento

- Ahn JJ, Akram K, Jo D, Kwon JH. Investigation of different factors affecting the electron spin resonance-based characterization of gamma-irradiated fresh, white and red ginseng. *Journal of Ginseng Research* 2012;36(3):308-12.
- Ahn JJ, Sanyal B, Akram K, Kwon JH. Alcoholic extraction enables EPR analysis to characterize radiation induced cellulosic signals in spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014;62:11089-98.
- Ahn JJ, Shahbaz HM, Akram K, Kwak JY, Kwon JH. Improved electron spin resonance spectroscopy with different sample treatments to identify irradiated sprout seeds. *Food Analytical Methods* 2014;7(9):1874-80.
- Akram K, Ahn JJ, Kim GR, Kwon JH. Applicability of different analytical methods for the identification of  $\gamma$ -irradiated fresh mushrooms during storage. *Food Science and Biotechnology* 2012;21(2):573-9.
- Akram K, Ahn JJ, Kwon JH. Identification and characterization of gamma-irradiated dried lentinus edodes using ESR, SEM, and FTIR analyses. *Journal of Food Science* 2012;77(6):C690-C696.
- Alberti A, Chiaravalle E, Fuochi P, Macciantelli D, Mangiacotti M, Marchesani G, Plescia E. Irradiated bivalve mollusks: use of EPR spectroscopy for identification and dosimetry. *Radiation Physics and Chemistry* 2011;80:1363-70.
- Aleksieva K, Lagunov O, Dimov K, Yordanov ND. EPR study on non- and gamma-irradiated herbal pills. *Radiation Physics and Chemistry* 2011;80:767-77.

- Aleksieva KI, Dimov KG, Yordanov ND. Identification of gamma-irradiated fruit juices by EPR spectroscopy. *Radiation Physics and Chemistry* 2014;103:27-30.
- Aydaş C, Çam ST, Engin B, Polat M. The use of ESR spectroscopy for the identification and dose assessment of irradiated pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from Turkey. *Radiation Effects and Defects in Solids: Incorporating Plasma Science and Plasma Technology* 2015;168 (3):212-23.
- Bercu V, Negut CD, Dului OG. Detection of irradiated frog (*Limnonectes macrodon*) leg bones by multifrequency EPR spectroscopy. *Food Chemistry* 2012; 135: 2313–2319.
- Bercu V, Negut CD, Dului OG. EPR studies of the free radical kinetics in  $\gamma$ -rays irradiated *Pleurotus ostreatus* oyster mushrooms. *Food Research International* 2011;44:1008-11.
- Bortolin E, Bustos Griffin E, Cruz-Zaragoza E, De Coste V, Onori S. Electron paramagnetic resonance detection of Mexican irradiated spices. *International Journal of Food Science and Technology* 2006;41:375-82.
- D'Oca MC, Bartolotta A. Evaluation of the original dose in irradiated dried fruit by EPR spectroscopy. *Radiation measurements* 2011;46:813-5.
- Della Monaca S, Fattibene P, Boniglia C, Gargiulo R, Bortolin E. Identification of irradiated oysters by EPR measurements on shells. *Radiation Measurements* 46 (2011) 816-821.
- Desrosiers MF, Yaczko DM, Basi A, McLaughlin WL. Interlaboratory trials of the EPR method for the detection of irradiated spices, nutshell and eggshell. In: McMurray CH, Stewart EM, Gray R, Pearce J (Ed.). *Detection methods for irradiated foods – Current status*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1996. p. 108-18.
- Dului OG. Electron paramagnetic resonance identification of irradiated cuttlefish (*Sepia Officinalis* L.). *Applied radiation and Isotopes* 2000;52:1385-90.
- Gray R, Stevenson MH, Kilpatrick DJ. The effect of irradiation dose and age of the bird on the ESR signal in irradiated chicken drumstick. *Radiation Physics and Chemistry* 1990;35:284-7.
- Jo Y, Kyung HK, Park HJ, Kwon JH. Irradiated fruits can be identified by detecting radiation-induced markers with luminescence and ESR analyses for different trading fruits. *Applied Biological Chemistry* 2016;59:59-65.
- Kim BK, Ahn JJ, Shahbaz HM, Kim CT, Kwon JH. Effect of Drying Treatment on Physical Identification Characteristics of Irradiated Seasonings. *Food Analytical Methods* 2014;7(2):268-75.
- Kwon JH, Ahn JJ, Akram K, Son IJ, Lee SO. Characterization of radiation-induced luminescence properties and free radicals for the identification of different gamma-irradiated teas. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2013;405:4225-34.
- Lea JS, Dodd NJF and Swallow AJA. Method of testing for irradiation of poultry. *International Journal of Food Science and Technology* 1988;23:625-32.
- MAFF validated methods for the analysis of foodstuffs, No. V28 Detection of meat containing bone. *Journal of the Association of Public Analysts* 1993;29:201-8.
- Maghraby A, Salama E, Sami A, Mansour A, El Sayed M. Identification and dosimetry of irradiated walnuts (*Juglans regia*) using EPR. *Radiation Effects and Defects in Solids: Incorporating Plasma Science and Plasma Technology* 2014;167(3):170-8.
- Mangiacotti M, Marchesani G, Floridi F, Siragusa G, Chiaravalle AE. Official checks by an accredited laboratory on irradiated foods at an Italian market. *Food Control* 2013;33:307-12.
- Marrone M, Carosielli L, Mangiacotti M, Chiaravalle E, Smaldone G, Anastasio A. Monitoring of irradiated food products marketed in Italy and evaluation of electron spin resonance signal sensitivity of experimentally irradiated fish scales. *Italian Journal of Food Safety* 2014;3:1602.
- Pawłowska-Góral K, Ramos P, Pilawa B, Kurzej E. Application of EPR spectroscopy to examination of the effect of sterilization process on free radicals in different herbs. *Food Biophysics* 2013;8:60-8.

- Raffi J, Agnel JP, Ahmed SH. Electron spin resonance identification of irradiated dates. *Food Technology* 1991;3/4:26-30.
- Raffi J, Agnel JP. Electron spin resonance identification of irradiated fruits. *Radiation Physics and Chemistry* 1989;34:891-4.
- Raffi J, Evans JC, Agnel JP, Rowlands CC and Lesgards G. ESR analysis of irradiated frogs' legs and fishes. *Applied radiation and Isotopes* 1989;40:1215-8.
- Raffi J, Stachowic W, Migdal W, Barabassy S, Kalman B, Yordanov N, Andrade E, Prost M and Callens F. Establishment of an eastern network of laboratories for identification of irradiated foodstuffs, final report of Copernicus Concerted Action CIPA-CT94-0134, CCE, March 1998.
- Raffi J, Stevenson MH, Kent M, Thiery JM, and Belliardo JJ. European inter-comparison on electron spin resonance identification of irradiated foodstuffs. *International Journal of Food Science and Technology* 1992;27:111-24.
- Raffi J. *Electron spin resonance intercomparison studies on irradiated foodstuffs*. BCR-Information. Luxembourg: Commission of the European Communities; 1992. (Report EUR/13630/en)
- Sanyal B, Ahn JJ, Maeng JH, Kyung HK, Lim HK, Sharma A and Kwon JH. An improved approach to identify irradiated spices using electronic nose, FTIR, and EPR spectroscopy. *Journal of Food Science* 2014;79(9):C1656-1664.
- Schreiber GA, Helle N, Schulzki G, Linke B, Spielberg A, Mager M, Bogl KW. Interlaboratory tests to identify irradiation treatment of various foodstuffs 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.
- Schreiber GA, Helle N, Schulzki G, Spielberg A, Linke B, Wagner U, Bogl KW. Intercomparisons to evaluate the suitability of gas chromatographic, electron spin resonance spectrometric and thermoluminescence methods to detect irradiated foods in routine control. *Radiation Physics and Chemistry* 1993;42:391-6.
- Scotter SL, Holley P, Wood R. Cooperative trial of methods of analysis to determine irradiation treatment of chicken sample: Initial trial. *International Journal of Food Science and Technology* 1990;25:512-8.
- Shahbaz HM, Akram K, Ahn J, Kwon J. Investigation of radiation-induced free radicals and luminescence properties in fresh pomegranate fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2013;61:4019-25.
- Stevenson MH, Gray R. An investigation into the effect of sample preparation methods on the resulting ESR signal from irradiated chicken bone. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1989;48:261-7.
- Stevenson MH, Gray R. Effect of irradiation dose, storage time and temperature on the ESR signal in irradiated chicken bone. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1989;48:269-74.
- Swartz HM, Bolton JR, Borg DC. *Biological applications of electron spin resonance*. New York London, Sidney, Toronto: JOHN Wiley & Sons; 1972.
- UNI EN 13708. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti zucchero cristallino mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN 1786. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti ossa. Metodo per spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1997.
- UNI EN 1787. *Ricerca di alimenti irraggiati contenenti cellulosa mediante spettroscopia di risonanza elettronica di spin (ESR)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
- Yamaoki R, Kimura S, Ohta M. Evaluation of absorbed dose in irradiated sugar-containing plant material (peony roots) by an ESR method. *Radiation Physics and Chemistry* 2015;117:41-7.
- Yordanov, ND, Lagunov, O, Dimov, K. EPR spectra induced by gamma-irradiation of some dry medical herbs. *Radiation Physics and Chemistry* 2009;78:277-80.