



Progetto TECHEA - Technologies for Health

WorkPackage WP1 “SafeFood”

Rapporto tecnico su requisiti operativi e specifiche tecniche del prototipo per linea di produzione e del prototipo per analisi speditive

DELIVERABLE D1.1 & D1.2

Autori

*Luca Fiorani**

*Antonia Lai**

*Simone Mannori**

*Adriana Puiu**

*Florinda Artuso**

*Flavio Cicconi***

*Giulia Clai**

*Gianfranco Giubileo****

*Ivano Menicucci**

*Marcello Nuvoli**

*Antonio Palucci**

*Alessandra Pasquo**

*Fabio Pollastrone**

*Wasan Saleh***

* Laboratorio Diagnostiche e Metrologia (FSN-TECFIS-DIM) dell'ENEA

** Guest

*** Retired

INDICE

| | |
|---|----------|
| WORKPACKAGE WP1 “SAFEFOOD” | 1 |
| INDICE | 2 |
| INTRODUZIONE | 4 |
| ATTIVITÀ DEL PRIMO ANNO | 5 |
| APPENDICE 1 - STUDIO DELL’APPLICAZIONE DELLA LPAS ALLE PROBLEMATICHE SPECIFICHE | 14 |
| Spettroscopia laser fotoacustica | 17 |
| Discriminazione di zuccheri/dolcificanti | 18 |
| Rivelazione di melammina nel latte | 19 |
| Rivelazione di istamina nel pesce | 20 |
| APPENDICE 2 - ACQUISIZIONE DEL MATERIALE | 22 |
| APPENDICE 3 - SVILUPPO ELETTRONICA INNOVATIVA COMPATTA (LOCK-IN FPGA) | 23 |
| CARRELLO | 23 |
| VALIGETTA | 24 |
| PANNELLO OPERATORE | 24 |
| MICROFONI | 24 |
| HMI DEL PRIMO BANCO DI PROVA | 25 |
| HMI DEL CARRELLO | 26 |
| HMI della VALIGETTA | 26 |

| | |
|---|-----------|
| RED SCORPION LOCK-IN AMPLIFIER..... | 27 |
| Schema a blocchi..... | 28 |
| Alimentatore interno | 29 |
| Schemi elettrici | 29 |
| | |
| APPENDICE 4 - REALIZZAZIONE CELLA CON INSERIMENTO DEL CAMPIONE | 31 |
| | |
| APPENDICE 5 - SPERIMENTAZIONE IN LABORATORIO..... | 32 |
| Discriminazione tra spezie e adulteranti | 32 |
| Rivelazione di fitofarmaci in miele/polline..... | 33 |
| Discriminazione di risi..... | 34 |
| | |
| APPENDICE 6 - REALIZZAZIONE DEI PROTOTIPI | 36 |
| | |
| APPENDICE 7 - PROGETTAZIONE DEI PROTOTIPI INGEGNERIZZATI | 38 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | 40 |

Introduzione

Questo rapporto tecnico sintetizza il lavoro svolto e i risultati ottenuti nel Workpackage 1 “SafeFood” del progetto “TechHea”, volto alla realizzazione di un prototipo per linea di produzione e di un prototipo per analisi speditive, basati sulla spettroscopia laser fotoacustica (LPAS) e applicati al campo della sicurezza alimentare. Il testo contiene l’**individuazione dei requisiti operativi** e la **definizione delle specifiche tecniche** dei due sistemi, costituendo così entrambi i deliverable previsti nel progetto esecutivo¹.

In apposite appendici è fornita la descrizione dettagliata delle altre fasi di lavoro del primo anno di attività:

- studio dell’applicazione della LPAS alle problematiche specifiche,
- acquisizione del materiale,
- sviluppo elettronica innovativa compatta (lock-in FPGA),
- realizzazione cella con inserimento del campione²,
- sperimentazione in laboratorio,
- realizzazione dei prototipi.

Inoltre, è stata aggiunta un’ulteriore appendice in cui è anticipata parte della progettazione dei prototipi ingegnerizzati, prevista nel secondo anno. Il documento si conclude con la bibliografia.

¹ Vista la grande sovrapposizione delle attività per la realizzazione dei due prototipi, non avrebbe avuto senso sdoppiarne la trattazione in due documenti.

² Inizialmente era previsto l’inserimento automatico del campione. Tenendo conto che qualsiasi sistema meccanico in movimento avrebbe aumentato la probabilità di degradare la tenuta della cella – aspetto cruciale per l’applicazione della spettroscopia laser fotoacustica – si è deciso, per il momento, di inserire il campione nella cella con un semplice cassetto – in cui la tenuta è garantita da un doppio o-ring – e di rimandare tale sviluppo al secondo anno di attività.

Attività del primo anno

Il primo anno di attività si è aperto con lo studio dell'applicazione della LPAS alle problematiche specifiche. In particolare, sono state svolte:

una ricerca bibliografica aggiornata sul problema della sicurezza alimentare,

un'analisi critica dei risultati ottenuti dal Laboratorio Diagnostiche e Metrologia nelle ricerche svolte negli anni precedenti.

Lo schema di un tipico sistema LPAS è riportato in Fig. 1. Il cuore dell'apparato – controllato da un PC – è un laser, in questo caso un laser a cascata quantica con emissione continua (QCL-cw) il cui fascio è modulato a frequenza acustica con un chopper. Una piccola percentuale della potenza ottica è riflessa da un *beam splitter* in un *power meter* – per monitorarne il livello – mentre la maggior parte è inviata da uno specchio (*mirror*) nella cella fotoacustica (*PA cell*) dove interagisce con il campione generando un'onda sonora che è captata dal microfono (*M*) il cui segnale è amplificato da un *lock-in amplifier* sincronizzato con il chopper mediante un opportuno *trigger*.

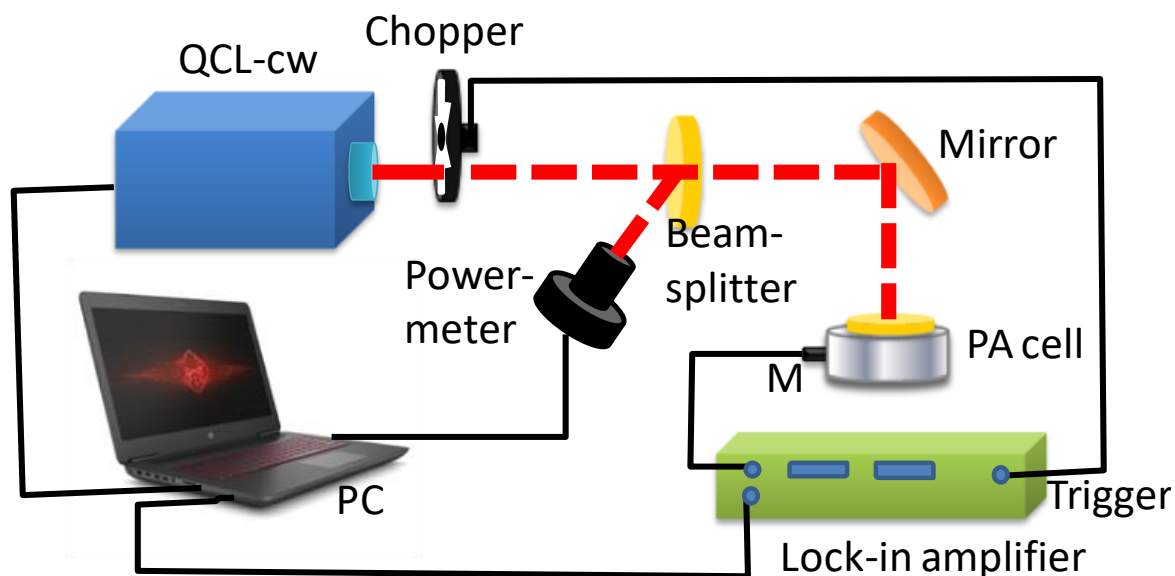


Figura 1 - Schema di un tipico sistema LPAS.

I **requisiti operativi** dei prototipi (Tabella 1) sono stati individuati con lo scopo di fornire le soluzioni oggi realizzabili che meglio soddisfino le esigenze di aziende alimentari e autorità ispettive. A questo proposito, è stato importante sia svolgere un'indagine sulla tecnologia esistente, sia ascoltare il

parere di esperti del settore e imprese specializzate nel controllo della qualità di cibi e bevande: sono state avviate almeno 13 collaborazioni informali che, tra l'altro, hanno permesso di presentare una proposta PROOF OF CONCEPT ENEA – 2020 (valutata positivamente) congiuntamente a ditte del calibro di Mérieux NutriSciences Corporation, Orsell SpA e Tecnoalimenti SCpA.

Tabella 1. Requisiti operativi dei prototipi.

| Requisito | Prototipo per linea di produzione | Prototipo per analisi speditive |
|---------------------------|--|--|
| Rapidità | Esecuzione della misura in pochi minuti | |
| Specificità | Emissione laser corrispondente alle righe di assorbimento* di alcune importanti frodi alimentari | Emissione laser corrispondente alle righe di assorbimento* di un'importante frode alimentare |
| Sensibilità | Migliore dei limiti di legge per alcune importanti frodi alimentari | Dell'ordine dei limiti di legge per un'importante frode alimentare |
| Semplicità | Assenza sia di pretrattamento del campione, sia di uso di reagenti chimici | |
| Ripetibilità | Misura ripetibile alcune volte (trattandosi di una tecnica ottica, basta limitare la potenza del laser per non danneggiare il campione) | |
| Portabilità | Sistema trasportabile sul campo con un'utilitaria (carrello). | Sistema trasportabile sul campo da una persona (valigia). |
| Misura in situ | Sistema sufficientemente robusto da poter essere dispiegabile in un luogo di produzione, trasformazione, trattamento, conservazione e distribuzione degli alimenti senza subire danni e disallineamenti ottici | |
| Facilità di campionamento | Semplice prelievo di un piccolo frammento | |
| Facilità d'uso | Utilizzabile da personale non particolarmente esperto (corso di alcuni giorni) | Utilizzabile da personale non particolarmente esperto (corso di pochi giorni) |

Successivamente, sono state definite le **specifiche tecniche** (Tabella 2). Questa definizione è frutto dell'attività progettuale che ha come punto di partenza i requisiti operativi. Le specifiche qui

* "Impronta digitale" del composto da rivelare.

descritte, quindi, vanno viste come la naturale trasposizione dei requisiti dei prototipi nell'ambiente concreto della progettazione di tutte le loro parti e, conseguentemente, costituiscono la precisazione – sotto forma delle caratteristiche dei singoli sottosistemi – delle aspettative dei fruitori finali, in vista dell'ingegnerizzazione dei prototipi nel secondo anno di attività.

Tabella 2. Specifiche tecniche dei prototipi.

| Sottosistema | Prototipo per linea di produzione | Prototipo per analisi speditive |
|---------------|--|---|
| PC | Touch screen LCD (10.1", 1280 × 800, color) Intel® Pentium® N4200, 8 GB RAM, 128 GB SSD Porte USB ed Ethernet Power supply DC 12 – 24 V | |
| Laser | Accordabilità di 3 μm tra 7 e 11 μm Larghezza di riga 0.1 cm^{-1} Potenza (picco) 250 mW Raffreddato ad acqua Power supply AC 220 V Emissione continua | Accordabilità di 1 μm tra 8 e 10 μm Larghezza di riga 0.5 cm^{-1} Potenza (picco) 100 mW Raffreddato ad aria Power supply DC 12 – 24 V Modulazione TTL 0 – 20 kHz |
| Chopper | 10 Hz – 3 kHz Stabilità 500 ppm / °C Regolazione manuale Uscita digitale per sincronizzazione lock-in | Non necessario (l'elettronica del prototipo include il modulatore del laser) |
| Beam splitter | ZnSe Diametro 1" Spessore 5 mm 40-20 scratch-dig | |
| Power meter | 0.01 – 1000 mW Porta USB Protocollo di comunicazione seriale ASCII Driver aperti LabVIEW | |

| | | |
|--------------------|---|---|
| Specchio | Protected Au Diametro 1" Spessore 6 mm 40-20 scratch-dig | |
| Cella fotoacustica | Corpo Al nero anodizzato Finestra ZnSe Alloggiamento per 3 microfoni Cassetto portacampione ermetico | Corpo Al nero anodizzato Finestra ZnSe Alloggiamento per 1 microfono Cassetto portacampione ermetico |
| Microfono | Sensibilità -53 dB Omnidirezionale Frequenza di picco 3 – 6 kHz Power supply DC 1 – 2 V | |
| Lock-in amplifier | DC – 500 kHz 16 bit Porta USB Protocolli di comunicazione LabVIEW | DC – 100 kHz 14 bit Porta USB Protocolli di comunicazione LabVIEW |

Una volta specificati i prototipi, è stata avviata la fase di **acquisizione del materiale**, tenendo conto del quadro applicativo dei sistemi che richiede versatilità, robustezza e semplicità d'uso. Ad esempio:

- sono stati acquisiti cinque tipi diversi di microfono (di cui uno calibrato e l'altro a fibra ottica) per adattare gli apparati a differenti scenari,
- sono stati preferiti supporti optomeccanici ad alta stabilità di allineamento (Thorlabs Polaris®) e panel PC con grado di protezione IP65,
- il laser del prototipo per analisi speditive è stato dotato di un fascio ausiliare rosso per facilitarne l'allineamento.

Contemporaneamente, è stata progettata l'**elettronica innovativa compatta**. Siccome non esiste sul mercato un lock-in compatto con le prestazioni richieste, è necessario sviluppare un lock-in

digitale per la nostra applicazione, con il vantaggio di poter integrare nel sottosistema elettronico il modulatore del laser. Essendo il carico computazionale necessario per implementare in real time un lock-in digitale al limite delle prestazioni dei migliori DSP (Digital Signal Processor) commercialmente disponibili, è stata adottata l'architettura FPGA (Field Programmable Gate Array) che ben si adatta al flusso di calcolo fortemente parallelo generato dal sistema LPAS. Il cuore del sottosistema elettronico è la scheda di sviluppo Red Pitaya (Fig. **Error! Bookmark not defined.** sinistra). I codici sono stati scritti in LabVIEW. I circuiti stampati sono in produzione (Fig. **Error! Bookmark not defined.** destra).

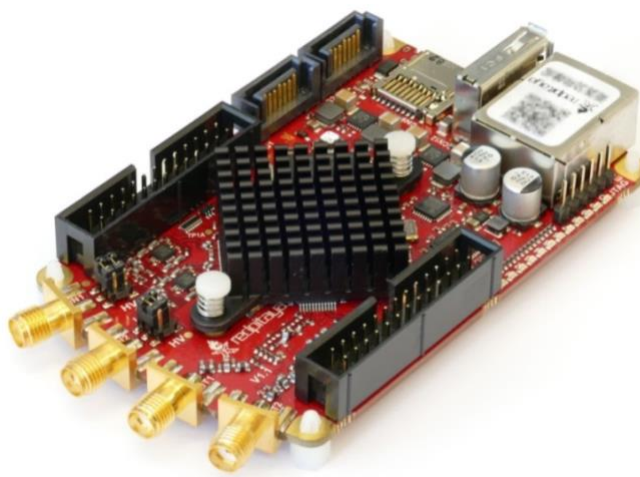


Figura 2 Scheda di sviluppo Red Pitaya (sinistra) e principale circuito stampato (destra) dell'elettronica innovativa compatta.

La **cella con inserimento del campione** è stata realizzata in due versioni:

- standard, minimizzando gli ingombri,
- esagonale, consentendo l'inserimento simultaneo di tre microfoni per le opportune comparazioni prestazionali e calibrazioni di sensibilità.

In entrambi i casi, il campione è inserito nella cella mediante un cassetto a tenuta (doppio o-ring) e la cella è isolata dalle vibrazioni ambientali da tre silentblock.

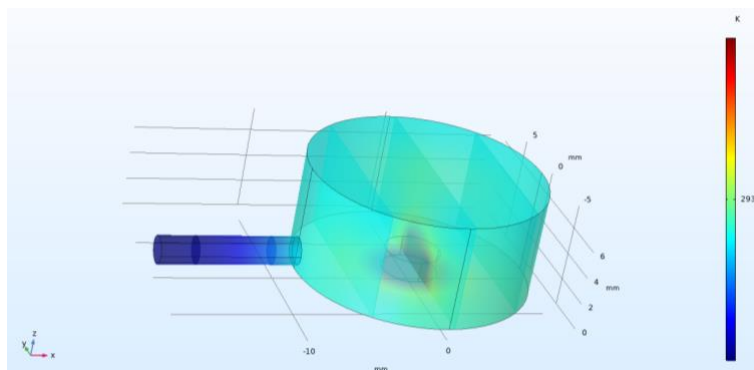


Figura 3 - Simulazione della cella standard con COMSOL Multiphysics®.

È stata anche avviata una simulazione delle celle con COMSOL Multiphysics®, per ottimizzarne le caratteristiche geometriche (Fig. 3). L'indagine modellistica, stabilito il modello geometrico, ha evidenziato la necessità di suddividere lo studio nei problemi termico e acustico. I passi consolidati allo stato attuale della modellazione sono:

- la creazione di una geometria d'impostazione delle mesh più opportune per ottenere una soluzione convergente,
- lo studio dei problemi termici dipendente dal tempo e stazionario.

Si sta inoltre affrontando la fase di postprocessing del modello, punto cruciale della modellazione. Per rispettare la tempistica progettuale, è stato necessario eseguire la **realizzazione dei prototipi** in laboratorio anche con materiale già acquisito nei precedenti progetti (Fig. 4). Si noti la riduzione degli ingombri del prototipo per analisi speditive che, tra l'altro, non necessita di chiller (box grigio chiaro in basso a destra del prototipo per linea di produzione).

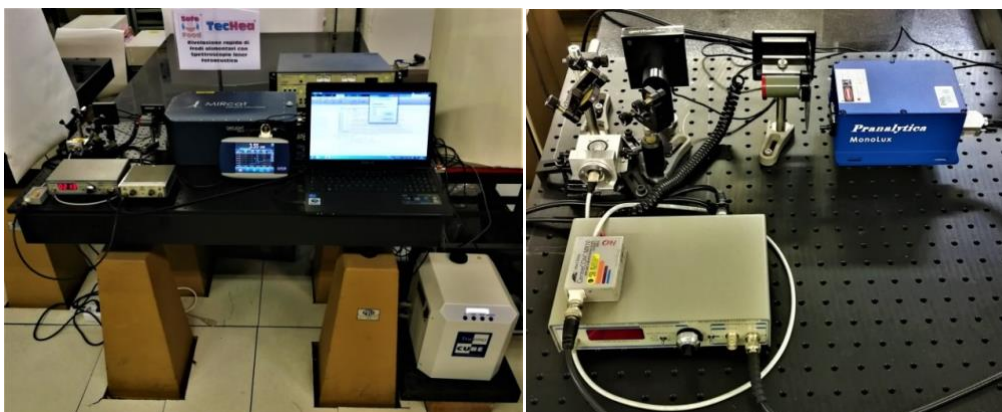


Figura 4 - Realizzazione in laboratorio del prototipo per linea di produzione (sinistra) e del prototipo per analisi speditive (destra).

Finalmente, ogni prototipo è stato utilizzato per la **sperimentazione in laboratorio**, partendo dal controllo sia della potenza dei laser (Fig. 5), sia della funzionalità dei sottosistemi (Fig. 6). I risultati relativi a cinque casi di studio nel campo della rivelazione di contaminazioni e/o frodi agroalimentari sono riportati nell'appendice 5.

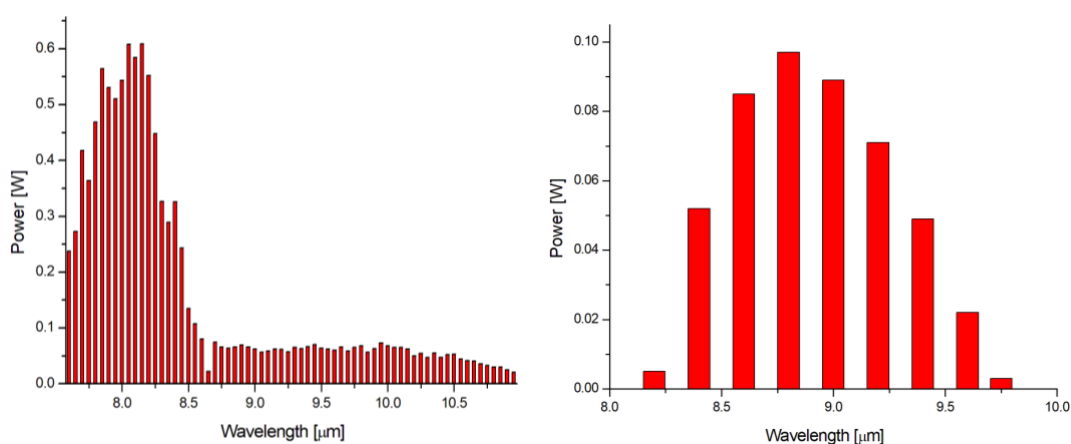


Figura 5 - Potenza del laser del prototipo per linea di produzione (sinistra) e del laser del prototipo per analisi speditive (destra) in funzione della lunghezza d'onda.

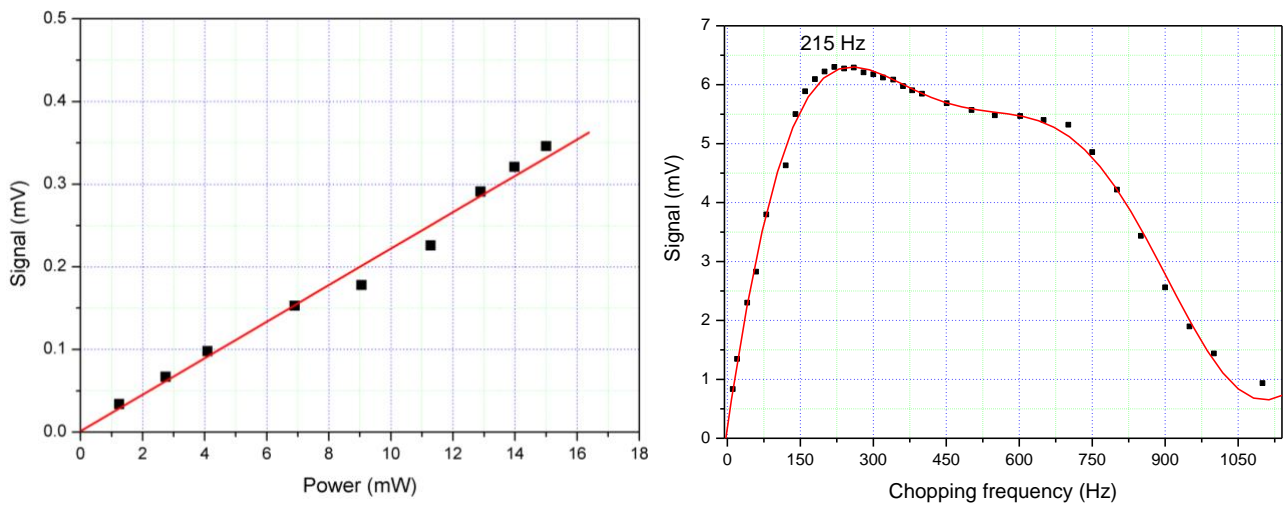


Figura 6 - Risposta in frequenza della cella standard (sinistra) e linearità del microfono (destra).

Nel frattempo, vista la disponibilità di un disegnatore meccanico, sono state anticipate:

- la progettazione dettagliata del prototipo ingegnerizzato per linea di produzione
- la progettazione di massima del prototipo ingegnerizzato per analisi speditive, previste nel secondo anno di attività.

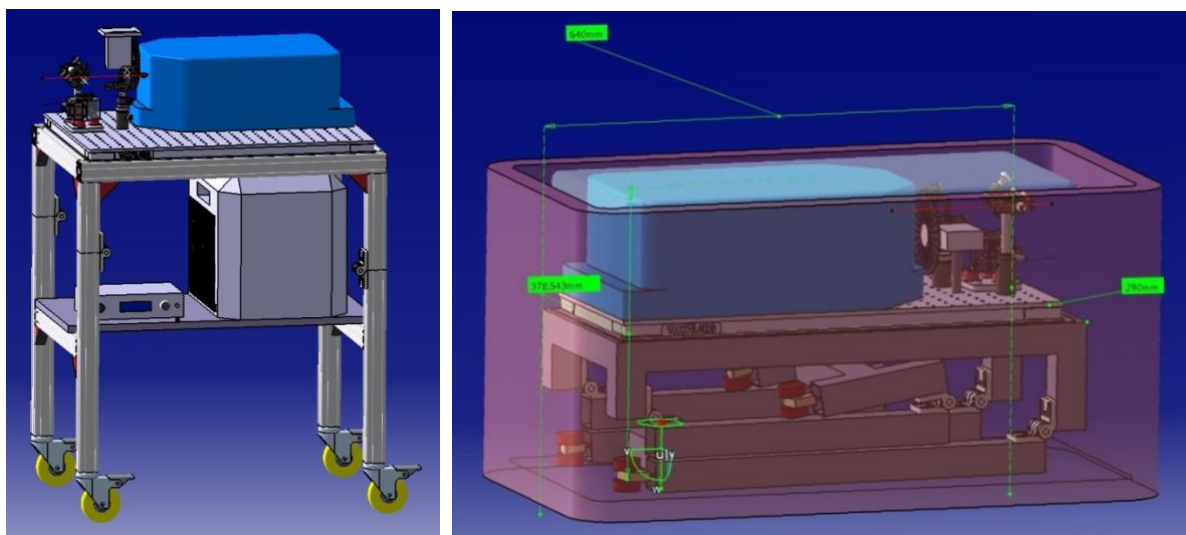


Figura 7- Prototipo ingegnerizzato per linea di produzione dispiegato sul campo (sinistra) e riposto in valigia (destra). Il laser è il box azzurro.

Il primo sistema sarà montato su un carrello (Fig. 7 sinistra) con zampe ripiegabili e sarà trasportabile in due valigie, una per il sistema elettroottico (Fig. **Error! Bookmark not defined.**

destra) e l'altra per il chiller del laser (non mostrato in figura). Il secondo sarà assemblato su un piccolo tavolo ottico contenuto in una valigetta (Fig. 8). Per questo, nelle appendici, talvolta è stata usata la seguente corrispondenza nella nomenclatura:

- prototipo ingegnerizzato per linea di produzione – carrello,
- prototipo ingegnerizzato per analisi speditive – valigetta.

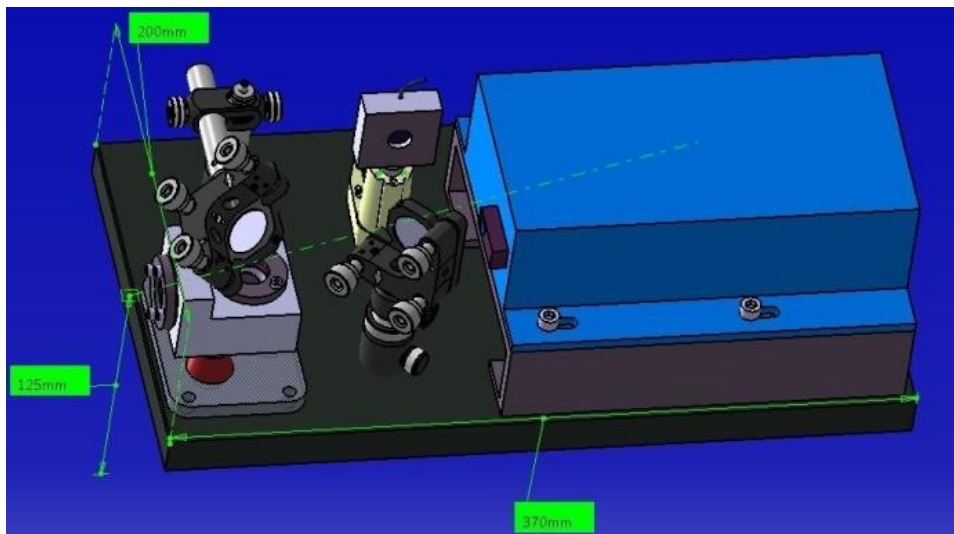


Figura 8 - Prototipo ingegnerizzato per analisi speditive. Il laser è il box azzurro

Appendice 1 - Studio dell'applicazione della LPAS alle problematiche specifiche

La sicurezza alimentare è un problema emergente di ampiezza globale. Alla fine del 2017 si stimava che il commercio globale di generi alimentari ammontasse a quasi 300 miliardi di \$, di cui il 15% on line (INTERPOL & EUROPOL 2018), tipo di vendita in cui è più facile ingannare un cliente.

Spink e Moyer (2011) definiscono la frode alimentare come “un termine collettivo usato per includere la deliberata e intenzionale sostituzione, aggiunta, manomissione o falsificazione di cibo, ingredienti alimentari o confezioni alimentari oppure dichiarazioni false o fuorvianti rese su un prodotto, per guadagno economico” e identificano sette differenti tipi di frode alimentare (Tabella 3).

Tabella 3. Tipi di frode alimentare.

| Tipo di frode alimentare | Definizione | Esempio |
|---------------------------------|--|---|
| Adulterazione | Un componente del prodotto è fraudolento | Melamina aggiunta al latte |
| Manomissione | Prodotti e imballaggi legittimi utilizzati in modo fraudolento | Data di scadenza modificata |
| Sovraproduzione | Prodotti legittimi realizzati in eccesso rispetto agli accordi di produzione | Rapporto di produzione con numeri ridotti |
| Furto | Prodotti legittimi rubati e spacciati come procurati legittimamente | Prodotti rubati mescolati con prodotti legittimi |
| Diversione | Vendita o distribuzione di prodotti legittimi al di fuori dei mercati previsti | Aiuti alimentari reindirizzati verso mercati in cui non sono necessari |
| Simulazione | Prodotti illegittimi progettati per essere simili ma non identici al prodotto legittimo | Imitazioni di cibi popolari non prodotti con le stesse garanzie di sicurezza alimentare |
| Contraffazione | Violazione dei diritti di proprietà intellettuale che potrebbe includere tutti gli aspetti del prodotto e dell'imballaggio fraudolenti completamente replicati | Copie di cibi popolari non prodotte con le stesse garanzie di sicurezza alimentare |

I quindici ingredienti più comuni nelle EMA (adulterazioni motivate economicamente), secondo uno studio che ha riassunto circa 550 articoli pubblicati tra il 1980 e il 2010 (Moore 2011), sono mostrati in Fig. 9.

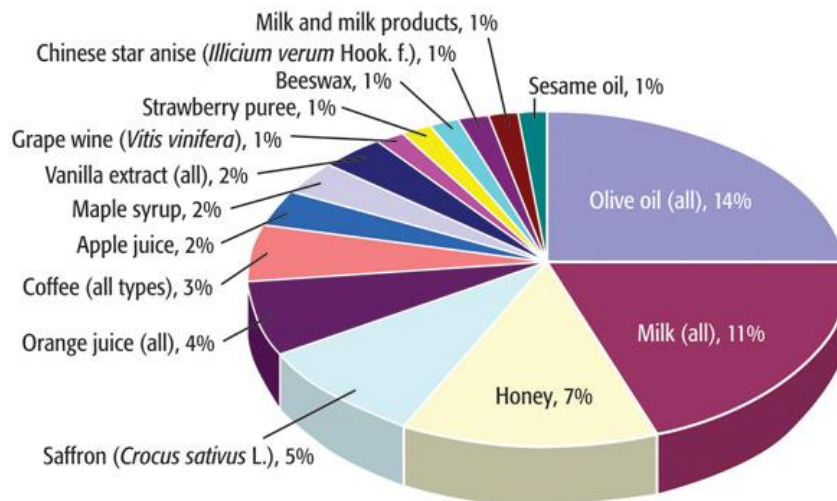


Figura 9 - I quindici ingredienti più comuni nelle EMA (adulterazioni motivate economicamente).

Secondo Moore (2011), le EMA più importanti sono:

- latte diluito con acqua,
- latte mescolato con melamina,
- grano mescolato con urea,
- curcuma mescolata con cromato di piombo,
- olio d'oliva diluito con olio di nocciola.

In effetti, anche la contraffazione del riso, l'adulterazione dello zucchero e la contaminazione del pescato sono questioni critiche. Vemireddy *et al.* (2015) affermano che: "risi di alta qualità vengono adulterati con risi di bassa qualità e basso prezzo da parte dei commercianti". Lo zucchero è solitamente adulterato con carbonato di sodio o altri prodotti insolubili come la polvere di gesso (HATTON 2019). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO 2015) "il pesce può essere contaminato da patogeni ... dovuti all'attività umana o scarse igiene e fognature durante produzione e lavorazione del cibo". L'avvelenamento da istamina è uno dei casi più comuni di tossicità legati all'ingestione di pesce (quasi il 40% di tutti i disturbi connessi con il consumo di pesce, secondo i

Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie degli Stati Uniti). L'avvelenamento da istamina, causato da pesce conservato inadeguatamente e refrigerato impropriamente, si presenta come una reazione allergica, pur essendo causata dalla degradazione dei tessuti ad opera dei batteri (Birkun *et al.* 2018).

INTERPOL ed EUROPOL organizzano da anni un'operazione internazionale per contrastare le frodi alimentari. L'ultima per cui sia stato pubblicato un rapporto è OPSON VI (INTERPOL & EUOPOL 2018), condotta dal dicembre 2016 al marzo 2017 e caratterizzata dai dati seguenti:

- 65 paesi e 20 partner privati,
- oltre 13 mila tonnellate, 26 milioni di litri e 11 milioni di pezzi sequestrati, equivalenti in totale a quasi 240 milioni di €,
- oltre 50 mila ispezioni, portando a quasi 14 mila indagati o arresti e a oltre 6 mila casi amministrativi o criminali,
- il prodotto più sequestrato è l'alcol anche se il numero massimo di sequestri (39%) riguarda il pesce,
- le violazioni più frequenti riguardano: inganno del consumatore (27%), sicurezza alimentare (22%) e infrazione fiscale (19%).

La dimensione del fenomeno "frode agroalimentare" in Italia, può essere apprezzata consultando la banca dati IPERICO (Intellectual Property – Elaborated Report of the Investigation on COunterfeiting), sviluppata sotto la guida del Ministero dello Sviluppo Economico, Direzione Generale per la Lotta alla Contraffazione – Ufficio Italiano Brevetti e Marchi (Riccio *et al.* 2014).

Tabella 4. Sequestri del 2012 per aggregato merceologico.

| Aggregato merceologico | Sequestri del 2012 (pezzi equivalenti) |
|-----------------------------------|--|
| Bevande alcoliche | 1,454,012 |
| Altro e prodotti non classificati | 243,006 |
| Cereali e legumi | 242,260 |
| Carni e insaccati | 187,246 |

| | |
|-------------------------------------|---------|
| Olii e grassi vegetali e animali | 132,888 |
| Pesce | 43,646 |
| Salse, preparati, conserve e pelati | 22,000 |

Tabella 5. Sequestri del 2012 per ente di controllo.

| Ente di controllo* | Sequestri del 2012 (pezzi equivalenti) |
|--------------------|--|
| NAC | 2,175,634 |
| NAS | 143,885 |
| Finanza | 12,984 |
| Dogane/altri | 5,136 |
| ICQRF | 1,679 |

Nel triennio 2010-2012, sono stati sequestrati oltre 56 milioni di pezzi equivalenti per frode agroalimentare (un pezzo equivalente è uguale a un chilogrammo o a un litro), poco più della metà dei pezzi equivalenti presenti in IPERICO per tutti i tipi di frode, con un incremento di quasi il 50% dal 2010 al 2012. I sette aggregati merceologici più sequestrati nel 2012 sono elencati in Tabella 4 (tutti i sequestri degli altri sei aggregati sono meno di 15,000). I sequestri del 2012 per ente di controllo sono riassunti in Tabella 5.

Spettroscopia laser fotoacustica

Il Laboratorio Diagnostiche e Metrologia (Palucci *ed.* 2018) dell'ENEA applica la spettroscopia laser, in generale, e la spettroscopia fotoacustica, in particolare, al vasto campo del controllo di qualità della catena agroalimentare (Lai *et al.* 2019), focalizzandosi principalmente nella rivelazione rapida

* NAC e NAS: Nuclei antifrodi e Nuclei antisofisticazioni e sanità dei Carabinieri (Ministero della Difesa), Finanza: Guardia di finanza (Ministero dell'Economia e delle Finanze), Dogane: Agenzia delle dogane (Ministero dell'Economia e delle Finanze), ICQRF: Ispettorato centrale della tutela della qualità e della repressione frodi dei prodotti agroalimentari (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari, Forestali e del Turismo).

di frodi alimentari con la tecnica LPAS, basata su sorgenti CO₂ (Fiorani *et al.* 2017) e QCL (Fiorani *et al.* 2019).

I primi risultati in questo campo sono stati raggiunti nel quadro del progetto SAL@CQO, finanziato dal Ministero dello Sviluppo Economico (Programma “Industria 2015”), che ha portato alla realizzazione del prototipo in Fig. 10. In particolare, sono stati discriminati zuccheri/dolcificanti (Giubileo 2015) e sono state rivelate melammina nel latte (Giubileo 2016) e istamina nel pesce (La Vecchia 2019).

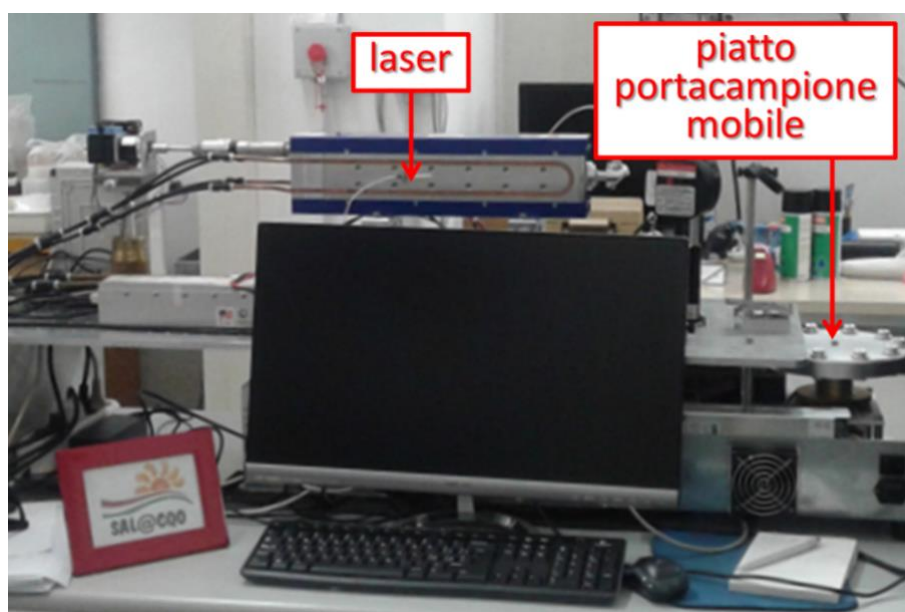


Figura 10 - Prototipo LPAS sviluppato nel quadro del progetto SAL@CQO

Discriminazione di zuccheri/dolcificanti

Il prototipo per SAL@CQO ha discriminato i seguenti cinque standard di zuccheri/dolcificanti:

1. fruttosio (Merk),
2. glucosio (Merk),
3. maltosio (Sigma),
4. saccarosio (Baker),
5. aspartame (Fluka),

come si evince dall'analisi delle componenti principali (PCA) (Mardia 1979) degli spettri LPAS mostrata in Fig. 11. Ogni standard è stato misurato quattro volte (ciò spiega perché nel grafico appaiono altrettanti punti per ogni campione).

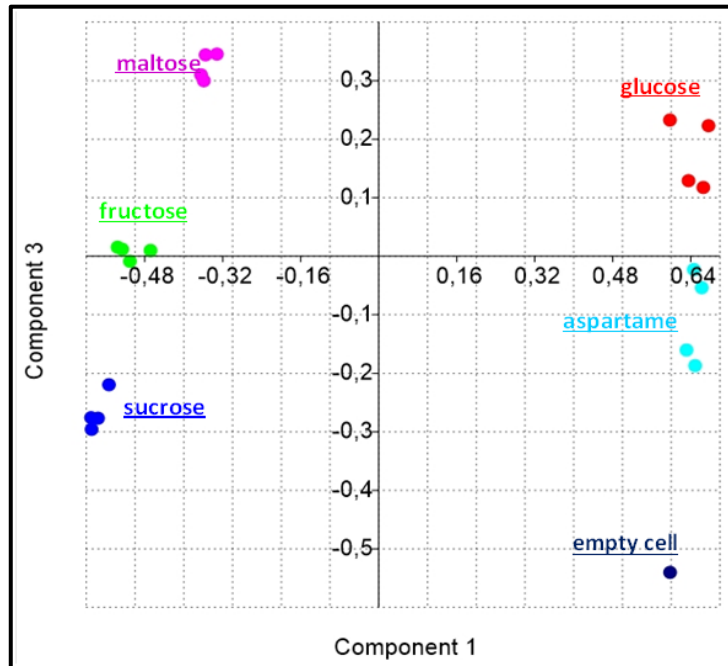


Figura 11 - PCA degli spettri LPAS di cinque standard di zuccheri/dolcificanti.

Rivelazione di melammina nel latte

Sono stati preparati tre campioni:

1. latte in polvere acquistato in un supermarket Carrefour,
2. melammina (Aldrich),
3. miscela al 50% di latte in polvere e al 50% melammina,

e – anche in questo caso – la PCA degli spettri LPAS discrimina i campioni (Fig. 12).

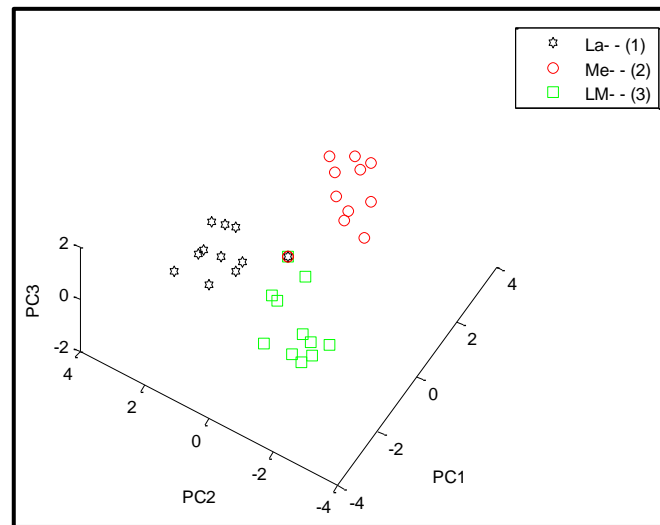


Figura 12 - PCA degli spettri LPAS di latte in polvere (La), melamina (Me) e miscela di latte in polvere e melamina (LM).

Rivelazione di istamina nel pesce

Il prototipo per SAL@CQO ha discriminato i seguenti quattro campioni (Fig. 13):

1. tonno,
2. tonno con istamina (Fapas),
3. istamina,
4. istamina in soluzione.

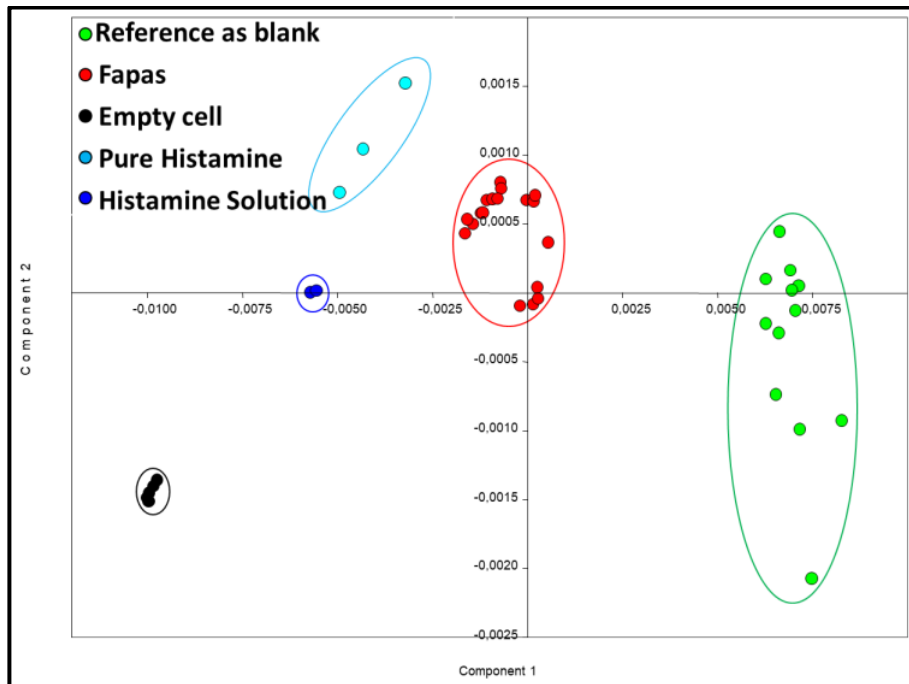


Figura 13 - PCA degli spettri LPAS di tonno (reference), tonno con istamina (Fapas), istamina e istamina in soluzione.

Appendice 2 - Acquisizione del materiale

Gli acquisti chiave del progetto sono riassunti nella Tabella 6.

Tabella 6. Marca e modello dei principali sottosistemi.

| Sottosistema | Prototipo per linea di produzione | Prototipo per analisi speditive |
|--------------------|---|---|
| PC | Marca: AAEON Modello: ACP-1106 | |
| Laser | Marca: DRS Daylight Solutions Modello: MirCat | Marca: Pranalytica Modello: MonoLux-90 |
| Chopper | Marca: Stanford Modello: SR540 | Non necessario |
| Beam splitter | Marca: Thorlabs Modello: WG71050 | |
| Power meter | Marca: Gentec-EO Modello: MAESTRO | Marca: Gentec-EO Modello: INTEGRA |
| Specchio | Marca: Thorlabs Modello: PF10-03-M01 | |
| Cella fotoacustica | Esagonale (realizzata appositamente) | Standard (realizzata appositamente) |
| Microfono | Marca: Knowles Modello: EK-23024 Marca: PCB Piezotronic Modello: 130F22 Marca: Optoacoustics Modello: 4110FA | Marca: Knowles Modello: EK-23024 |
| Lock-in amplifier | Marca: Zurich Instruments Modello: MFLI | Realizzato appositamente |

Appendice 3 - Sviluppo elettronica innovativa compatta (lock-in FPGA)

Lo sviluppo di un'elettronica di misura compatta – oltre allo sviluppo ex novo di un lock-in amplifier completamente digitale, basato su FPGA – richiede un impegno non indifferente per la progettazione/integrazione di sistema e lo sviluppo del relativo software di acquisizione, memorizzazione, filtraggio, identificazione e rappresentazione dei dati. I sistemi di misura LPAS sono costituiti da componenti particolari, corredati da interfacce hardware/software proprietarie ed eterogenee che rendono l'integrazione di sistema un'attività assolutamente non banale, specialmente quando si vogliono realizzare delle interfacce uomo-macchina o HMI (Human Machine Interface) funzionali ma – allo stesso tempo – intuitive e facili da usare. Per rendere evidente queste problematiche, si riassumono le componenti delle due configurazioni di riferimento sviluppate all'interno di SafeFood.

CARRELLO

- Sorgente laser: MirCat, DRS Daylight Solution, divergenza fascio minore di 1 mrad, 7-11 μm sintonia continua, 350 mW di potenza massima, interfaccia USB (protocollo proprietario, driver proprietari per LabVIEW disponibili).
- Modulatore: modulatore chopper meccanico Stanford SR540 (frequenza di modulazione regolabile da 4 Hz a 3.7 KHz, regolazione manuale, uscita digitale per sincronizzazione lock-in).
- Misuratore di potenza ottica: Gentec-EO MAESTRO, testa di misura intercambiabile, pannello LCD VGA da 5.6", campo di misura dai μW fino a 3 W, interfaccia USB, protocollo di comunicazione seriale ASCII, driver aperti per LabVIEW disponibili.
- Lock-in amplifier: Zurich Instruments MFLI, un canale DC-500 kHz, alta precisione (16 bit), interfaccia USB proprietaria, protocolli di comunicazione per LabVIEW disponibili, porta Ethernet disponibile.

VALIGETTA

- Sorgente laser: Pranalytica MonoLux-90, sintonia continua da 8 a 10 μm , potenza massima 100 mW, modulazione TTL 0-40 kHz, divergenza del fascio 4 mrad.
- Modulatore: modulatore elettronico integrato nella sorgente laser.
- Misuratore di potenza ottica: Gentec-EO INTEGRA, interfaccia USB miniaturizzata, testa di misura intercambiabile, campo di misura dai μW fino a 3 W, protocollo di comunicazione seriale ASCII, driver aperti per LabVIEW disponibili.
- Lock-in amplifier: Red Scorpion V3, lock-in amplifier progettato per questa applicazione specifica intorno alla scheda Red Pitaya, due canali indipendenti DC-1 MHz, alta precisione (14 bit nativa, 16 bit con valori mediati), preamplificatore a basso rumore ed alimentatore per microfoni attivi integrato, interfaccia USB con protocollo aperto, porta Ethernet disponibile, protocolli di comunicazione per LabVIEW disponibili e sviluppati internamente: dispositivo coperto dal brevetto ENEA N. 859 del 10/11/2017 “Dispositivo per il Controllo del Campo Dinamico di un Segnale ed Amplificatori ad Alta Dinamica con Demodulazione Coerente e Cifra di Rumore Negativa”.

PANNELLO OPERATORE

Il pannello operatore è lo stesso per entrambe le configurazioni. Il programma è un eseguibile LabVIEW stand alone che parte automaticamente all'accensione. Pannello AAEON ACP-1106, LCD tattile a colori 10.1" WXGA (1280 × 800 pixel), Intel® Pentium® N4200, 8 G RAM, 128 GB SSD M2, sistema ermetico IP65 senza ventole (per la massima affidabilità), quattro porte USB (due USB-2, due USB-3), due porte Ethernet Gigabit, sistema operativo Windows 10 Embedded 64 bit, alimentazione in corrente continua 12-30 Volt.

MICROFONI

Sono disponibili tre diversi tipi di microfono, con prestazioni e profili d'utilizzo diversi a seconda del modello:

- Microfono FET Knowles EK-23024, banda passante da 100 Hz a 10 kHz, basso rumore, necessita di preamplificatore (+20 dB) e di alimentazione 1.3-1.5 Volt ausiliaria.
- Microfono piezoelettrico calibrato PCB Piezotronics 130F22, banda passante da 20 Hz a 20 kHz, sensibilità 44 mV/Pa, necessita di una alimentazione ICP standard.
- Microfono interferometrico a fibra ottica Optoacoustics 4110FA, usabile tra 300 Hz e 2 kHz, elevatissima sensibilità di 20V/Pa, rumore interno -4 dBA (due volte l'orecchio umano), campo lineare di 84 dB SPL, convertitore ottico/elettrico e preamplificatore integrato.

HMI DEL PRIMO BANCO DI PROVA

Per il primo banco di prova si è scelta la configurazione CARRELLO con un lock-in preesistente (all'epoca il lock-in Zurich non era ancora stato acquistato), il lock-in amplifier analogico Stanford Research SR 530, da 10 Hz a 100 kHz, interfaccia seriale RS-232 con convertitore USB, protocollo ASCII aperto. Per il primo banco di prova, è stato sviluppato un programma di acquisizione dati che integra sorgente laser, misuratore di potenza ottica e lock-in amplifier. La parte più difficile è stata l'integrazione della sorgente laser MirCat, particolarmente complicata da gestire per gli evidenti problemi di sicurezza. Tutti gli strumenti impiegano una interfaccia USB e sono connessi ad un HUB-USB che – a sua volta – è connesso con un computer portatile. Il programma ha una interfaccia operatore grafica o GUI (Graphic User Interface) molto semplice da utilizzare. Il nome dei file di uscita è generato automaticamente in modo da rendere impossibile la sovrascrittura accidentale di misure precedenti. I file di uscita usano un formato ASCII (testo) standard, facilmente leggibile ed importabile in Excel o altri programmi usati per la post-elaborazione dei dati.



Figura 14- Interfaccia operatore del programma di acquisizione dati per il CARRELLO.

HMI DEL CARRELLO

Il CARRELLO usa la stessa configurazione di base del precedente banco di prova, salvo il fatto che il lock-in amplifier è stato sostituito da un moderno Zurich Instruments MFLI, un modello completamente digitale ad alte prestazioni. L'interfaccia di comunicazione resta sempre l'USB, stavolta con un protocollo proprietario. Per rendere l'interfaccia operatore ancora più completa e facile da usare, si è passati a una GUI LabVIEW (un esempio di GUI è fornito in Fig. 14).

La versione definitiva integrerà anche il software di post-elaborazione ed analisi dei dati. Abbiamo infatti previsto di migrare tutto il software (acquisizione dati, filtraggio, post-elaborazione, identificazione) in LabVIEW al fine di ridurre i costi delle licenze software.

HMI della VALIGETTA

Questa configurazione utilizzerà la stessa piattaforma ed interfaccia software del CARRELLO. All'interno, il programma di acquisizione dati sarà leggermente diverso: differenti strumenti richiedono differenti driver. Per fortuna l'architettura modulare di LabVIEW semplifica molto la gestione di queste situazioni.

RED SCORPION LOCK-IN AMPLIFIER

L'elemento più specifico della configurazione VALIGETTA è il lock-in amplifier progettato specificatamente per essere compatto, robusto e con un basso consumo di corrente elettrica. In linea di principio, il sistema LPAS potrebbe essere alimentato da una singola batteria da 12-24 Volt (vedi sezione alimentatore). Per adesso, il lock-in condivide l'alimentatore del pannello operatore (HMI).

Le applicazioni LPAS richiedono un lock-in amplifier in grado di lavorare fino a frequenze dell'ordine delle centinaia di kHz. Fissando un valore nominale di 100 kHz, questo significa che la frequenza di campionamento deve essere (almeno) di qualche Msps. Con queste frequenze di campionamento, il carico computazionale necessario per implementare in real time un lock-in digitale è al limite delle prestazioni dei migliori DSP ad alte prestazioni commercialmente disponibili. Il lock-in amplifier fully-digital consiste in una serie di generatori sintetici di segnali sinusoidali, prodotti di segnali complessi e banchi di filtri digitali, il tutto con segnali ad alto numero di bit con throughput alto e continuo. Questo flusso di calcolo è fortemente parallelo e ben si presta ad essere implementato su architetture parallele programmabili come le FPGA. Inoltre, le nuove versioni di FPGA contengono al loro interno anche dei microprocessori – tecnologia SoC (System on Chip) che semplificano la comunicazione dei risultati delle elaborazioni ad alta velocità con i sistemi di visualizzazione e storage dei dati.

Oggi sono disponibili dispositivi FPGA a basso costo (poche decine di Euro) in grado di processare segnali campionati fino a frequenze dell'ordine delle centinaia di MHz. Per questa realizzazione è stata scelta la scheda di sviluppo Red Pitaya, un dispositivo dal costo relativamente basso (500 Euro) progettato intorno al dispositivo SoC Xilinx ZYNQ 7010. Tale chip, oltre ad una FPGA Spartan di medie dimensioni (comunque in grado di ospitare fino a due canali lock-in indipendenti) racchiude un processore ARM "dual core" ad alte prestazioni (grosso modo analoghe a quelle di uno smartphone di fascia alta). Sul processore ARM gira un sistema operativo Linux completo. La presenza di Linux semplifica molto lo sviluppo dei programmi applicativi che devono gestire le funzioni ausiliarie come la comunicazione dati (USB, Ethernet e WiFi). Oltre al SoC, sulla scheda sono

presenti due canali d'ingresso e due canali d'uscita analogici ± 1 V (risoluzione nativa di 14 bit, 16 bit con medie e filtri vari).

Il segnale d'ingresso proviene invariabilmente da un microfono (con o senza preamplificatore interno, con o senza necessità di alimentazione esterna), per cui il campo di aggiustamento del guadagno risulta notevolmente ridotto.

Al fine di ridurre al massimo la presenza di componenti esterni, all'interno del lock-in sono stati previsti:

- due preamplificatori a basso rumore completi di alimentatore ausiliario per microfono a FET,
- Uscite con modulazione analogica (± 1 V) o digitale (TTL 5V compatibile) per il modulatore del laser esterno.

Schema a blocchi

Lo schema a blocchi della versione V3.

I due ingressi analogici (± 1 V) e le uscite analogiche (± 1 V) della Red Pitaya sono collegati con altrettante schede di adattamento di segnale (LNA, AUXIN, EXTMOD, AUXOUT). Le porte di comunicazione USB e Ethernet della Red Pitaya sono rese accessibili direttamente sul pannello.

Opzionalmente, si prevede un piccolo display LCD (testuale, per informazioni diagnostiche) e quattro LED, montati rispettivamente sui 4 connettori (BNC o SMA) sul pannello frontale.

Le schede di adattamento di segnale sono di tipo modulare in modo da potersi adattare al tipo di segnale d'ingresso. Questo permette una notevole riduzione dei costi e degli ingombri: piuttosto di un unico amplificatore universale che si adatti a una molteplicità di sorgenti, ci sarà un amplificatore per ogni microfono. In alcuni casi (es. microfono a fibra ottica), tale amplificatore non sarà nemmeno necessario. Quando richiesto, l'amplificatore d'ingresso a basso rumore (LNA) potrà integrare un filtro passa banda ottimizzato allo scopo di massimizzare il rapporto segnale/rumore.

Le schede di adattamento di segnale saranno installate su connettori (passo 2.54 mm) appoggiati ad una scheda madre (motherboard): in questo modo sarà possibile realizzare anche amplificatori "custom" improvvisati su schede sperimentali.

LCD e LED saranno pilotati dai segnali digitali presenti sul connettore E1 della Red Pitaya (per adesso questa caratteristica opzionale non è presente nel layout meccanico).

Alimentatore interno

Vista la presenza di un panel PC (HMI) alimentato in corrente continua (12-24 V DC), l'alimentatore interno del lock-in è stato progettato con lo stesso campo operativo di tensioni d'ingresso. La sorgente permetterà l'alimentazione a batteria (con un ampio campo di tensione d'ingresso). In caso di alimentazione di rete (100-240 V AC), il lock-in condividerà lo stesso alimentatore usato dal panel PC.

Schemi elettrici

Il lock-in amplifier (Red Scorpion) è costituito da tre macro-sezioni:

- la scheda madre/alimentatore,
- le schede preamplificatore d'ingresso,
- la scheda Red Pitaya (non rappresentata negli schemi seguenti).

Il lock-in è progettato per essere alimentato da una sorgente in corrente continua con tensioni d'ingresso comprese tra 12 e 18 Volt (tipicamente, si utilizza la stessa sorgente di alimentazione del pannello operatore). Per ottenere la massima efficienza energetica (e la minima dissipazione termica) si utilizzano moduli di alimentazione a commutazione, uno per le tensioni analogiche e uno per parte digitale.

I preamplificatori d'ingresso richiedono tensioni di alimentazione a basso rumore, per cui le alimentazioni vengono ulteriormente filtrate con dei regolatori di tensione lineari. Nello schema è inoltre presente un alimentatore regolabile a bassissimo rumore necessario per i microfoni Knowles. Alcuni laser richiedono un segnale di modulazione TTL, per cui sono stati introdotti due stadi squadratori. Il blocco JP9 permette la sezione tra uscita di modulazione analogica +/- 1V oppure TTL 0-5 V.

Il preamplificatore a basso rumore è costituito da due stadi:

- un primo stadio "ultra-low-noise" con NE5534,
- un secondo stadio con LF356.

I valori dei component nello schema sono ottimizzati per il microfono Knowles. Microfoni differenti possono essere adattati variando il valore di alcuni componenti. Sulla scheda madre sono presenti due schede indipendenti, una per ogni canale d'ingresso della Red Pitaya.

I circuiti stampati corrispondenti agli schemi elettrici sono in produzione.

Appendice 4 - Realizzazione cella con inserimento del campione

Sono stati sviluppati due tipi di celle:

- standard, minimizzando gli ingombri (Fig. 15A),
- esagonale, consentendo l'inserimento simultaneo di tre microfoni per le opportune comparazioni prestazionali e calibrazioni di sensibilità (Fig. 15B).

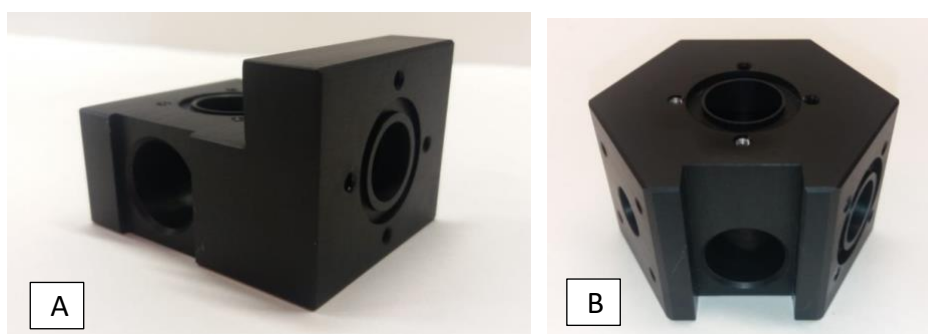


Figura 15 - A) Cella standard con il foro per il cassetto portacampione (a sinistra), la flangia per la finestra (sopra) e la flangia per il microfono (a destra). B) Cella esagonale con un foro per un microfono (a sinistra), la flangia per la finestra (sopra), la flangia per il microfono (a destra) e il foro per il cassetto portacampione (davanti) Un altro foro per un microfono non è visibile.

In entrambi i casi, l'inserimento del campione avviene mediante un cassetto a tenuta grazie a un doppio o-ring (Fig. 16).

Per quanto riguarda il materiale, è stato scelto l'alluminio nero anodizzato che garantisce buone proprietà meccaniche e scarse riflessioni indesiderate della radiazione laser, grazie al trattamento superficiale.



Figura 16 - Cassetto porta campione per entrambe le celle. Si notino i due o-ring.

Appendice 5 - Sperimentazione in laboratorio

Il prototipo per SAL@CQO, essendo basato su un laser CO₂, è troppo ingombrante per essere dispiegato sul campo. Nel quadro della realizzazione del prototipo per linea di produzione per SafeFood è stato deciso di utilizzare un laser QCL, più compatto e user-friendly. Purtroppo, il laser QCL è – allo stato attuale – meno potente del laser CO₂ e occorre quindi verificare l'applicazione della LPAS anche in frodi alimentari rivelate in precedenza. Inoltre, è stato ritenuto opportuno far seguire questa verifica a un brainstorming preliminare che, da una parte, tenesse conto della maggiore idoneità della tecnica LPAS all'analisi di campioni solidi e, dall'altra, fosse aperto a enti attivi nel campo della sicurezza alimentare quali:

1. Agecontrol,
2. European Spice Agency,
3. Federazione Apicoltori Italiani,
4. Interpol,
5. MetroFood.

Alla fine di questa fase di studio, la ricerca si è orientata ai seguenti temi:

1. rivelazione di aflatossina,
2. discriminazione tra spezie e adulteranti,
3. rivelazione di fitofarmaci in miele/polline,
4. rivelazione di istamina nel pesce,
5. discriminazione di risi,

raccomandati, nell'ordine, dagli enti appena elencati.

In generale, le misure con il laser QCL sono state eseguite nell'intervallo spettrale da 8.5 a 11 μm , con uno step di 0.1 μm , corrispondente a 26 misure (tempo di acquisizione: 1 s ciascuna). Lo spettro finale è stato ottenuto mediando 10 spettri.

Discriminazione tra spezie e adulteranti

Sono stati misurati campioni commerciali non certificati in polvere di:

- zafferano (provenienza: Iran)

- curcuma (provenienza: Conad)
- miscele in diverse percentuali tra i due campioni, con rapporto curcuma/zafferano pari al:
 - 12.5%
 - 25%
 - 50%

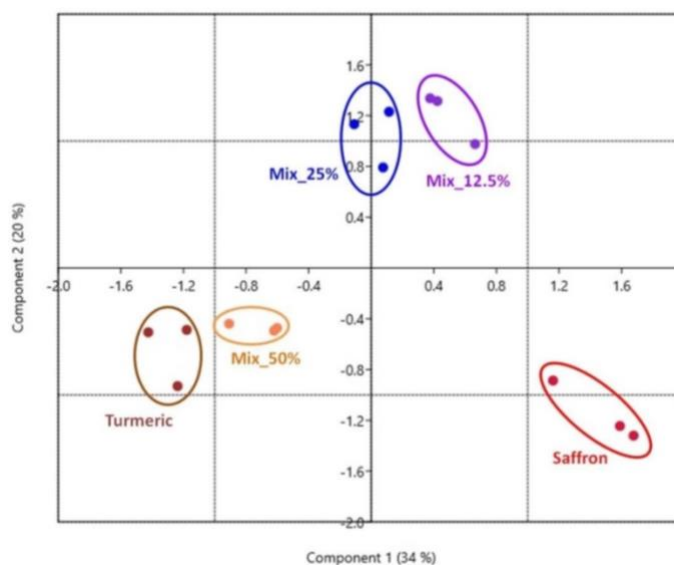


Figura 17 - PCA degli spettri LPAS ottenuti con il laser QCL di campioni di curcuma, zafferano e loro miscele.

Premesso che la PCA su poche misure non è significativa (la somma delle componenti è infatti inferiore al 60% a causa del numero limitato di spettri acquisiti), si osserva una separazione in gruppi diversi nello spazio definito dalle due componenti principali (Fig. 17). La distribuzione percentuale non totalmente coerente (la miscela con più curcuma ha una distanza dallo zafferano paragonabile a quella della miscela con meno curcuma) è dovuta probabilmente al campionamento: se la miscela non è perfettamente omogenea, il fascio laser può colpire una zona in cui la concentrazione è diversa da quella nominale. Per questo, è allo studio una modifica del set up ottico che consenta al fascio laser di irraggiare tutto il campione, mediando automaticamente tali disomogeneità. Comunque si ritiene che i risultati siano promettenti.

Rivelazione di fitofarmaci in miele/polline

È stato svolto un primo tentativo di applicazione della LPAS alla rivelazione di pesticidi nei pollini. Un campione di circa 0.05 g di polline è stato analizzato prima e dopo averci fatto cadere una goccia

di soluzione di pesticida di concentrazione commerciale. Gli spettri dei due campioni sono radicalmente diversi (Fig. 18 alto). È stata inoltre svolta la PCA sugli spettri e la discriminazione è eccellente (Fig. 18 basso). Comunque, il successo di questo tentativo, è condizione necessaria ma non sufficiente affinché il sistema funzioni a concentrazioni più basse di pesticidi.

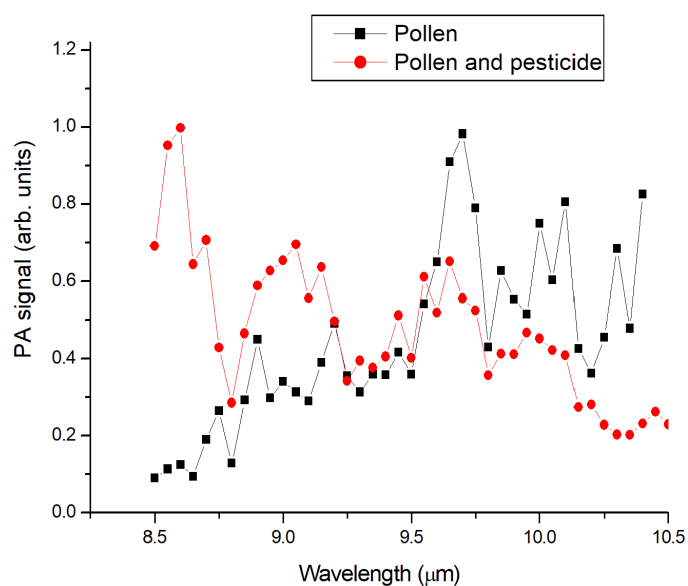


Figura 18 - Spettri LPAS (alto) e loro PCA (basso) ottenuti con il laser QCL di campioni di polline e polline con pesticida

Discriminazione di risi

Sono state misurate farine di alcuni tipi di riso, ottenute in laboratorio mediante frantumazione di grani. Le farine sono state pressate in pasticche di circa 1 g con spessore di circa 2 mm e diametro di 20 mm.

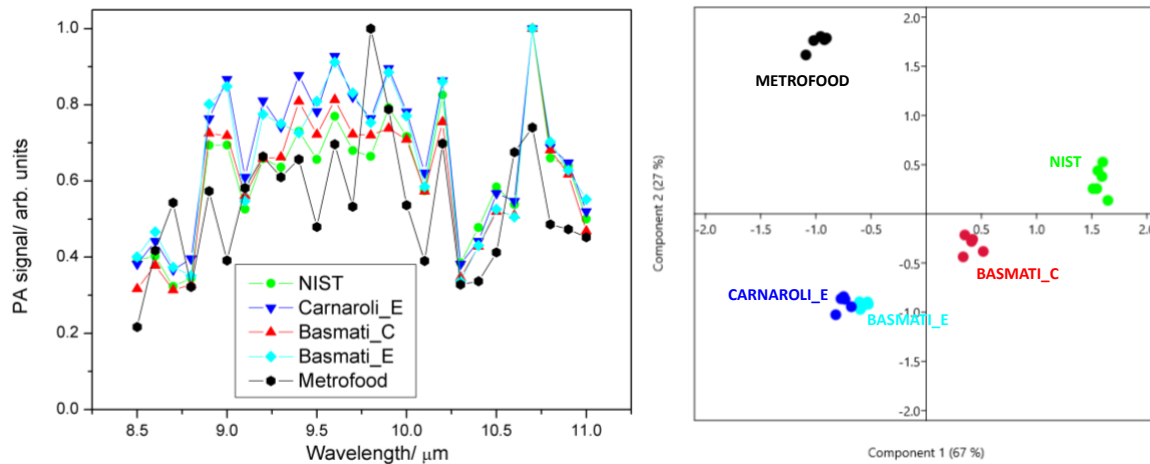


Figura 19- Spettri LPAS (sinistra) e loro PCA (destra) ottenuti con il laser QCL di campioni di riso.

Sono stati misurati i seguenti tipi di riso, sia commerciale, sia standard:

- Basmati da Eurospin,
- Basmati da Coop,
- Carnaroli da Eurospin,
- Metrofood,
- NIST.

Gli spettri LPAS (Fig. 19 sinistra) non consentono una facile discriminazione tra i diversi campioni, mentre la PCA li clusterizza correttamente per tipologia (Fig. 20 destra), incoraggiando a proseguire questo tipo di indagine.

Appendice 6 - Realizzazione dei prototipi

I prototipi sono stati realizzati con il materiale elencato nella Tabella 7.

Tabella 7. Marca e modello dei principali sottosistemi usati per la realizzazione dei prototipi.

| Sottosistema | Prototipo per linea di produzione | Prototipo per analisi speditive |
|--------------------|--|---|
| PC | Marca: Asus Modello: X55C | |
| Laser | Marca: DRS Daylight Solutions Modello: MirCat | Marca: Pranalytica Modello: MonoLux-90 |
| Chopper | Marca: Stanford Modello: SR530 | |
| Beam splitter | Marca: Thorlabs Modello: WG71050 | |
| Power meter | Marca: Gentec-EO Modello: MAESTRO | |
| Specchio | Marca: Thorlabs Modello: PF10-03-M01 | |
| Cella fotoacustica | Standard | |
| Microfono | Marca: Knowles Modello: EK-23024 | |
| Lock-in amplifier | Marca: Zurich Instruments Modello: MFLI | |

Come si può notare, il cuore dei due sistemi è costituito dai due laser: MirCat (upgrade di un modello preesistente) e MonoLux-90 (completamente nuovo).

Il MirCat si distingue per l'elevata potenza e l'ampio range spettrale ma è piuttosto voluminoso e richiede il raffreddamento ad acqua. Nel MonoLux-90, la riduzione degli ingombri e l'assenza di raffreddamento ad acqua è pagata in termini di potenza e range spettrale.

La foto e la potenza in funzione della lunghezza d'onda del laser del prototipo per linea di produzione e del laser del prototipo per analisi speditive sono mostrate in Fig. 20 e in Fig. 21, nell'ordine.

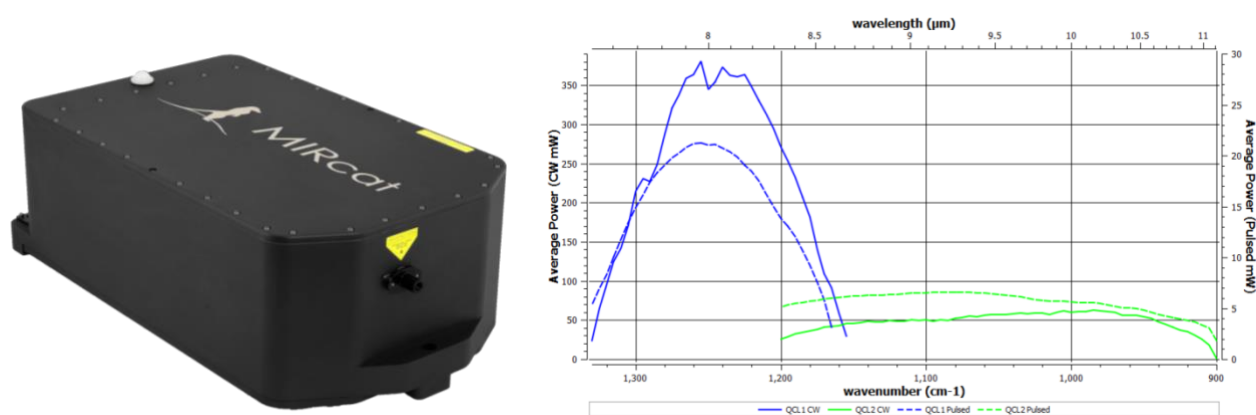


Figura 20 - Foto (sinistra) e potenza in funzione della lunghezza d'onda (destra) del laser del prototipo per linea di produzione.

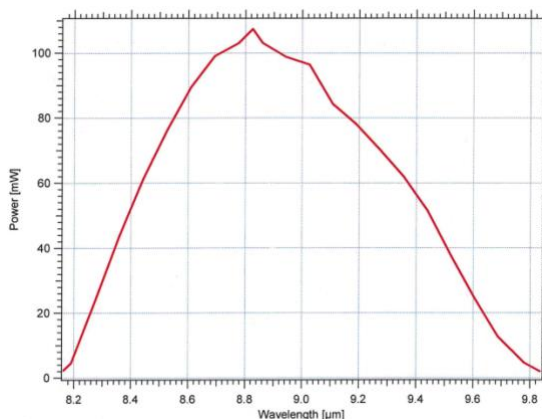


Figura 21 - Foto (sinistra) e potenza in funzione della lunghezza d'onda (destra) del laser del prototipo per analisi speditive.

Appendice 7 - Progettazione dei prototipi ingegnerizzati

Relativamente al prototipo per linea di produzione sono stati eseguiti tutti i disegni tecnici di dettaglio per la realizzazione, come da Tabella 8. È stato elaborato anche un abbozzo progettuale del prototipo per analisi speditive (Fig. 22).

Tabella 8. Disegni tecnici del prototipo per linea di produzione.

| Numero | Descrizione |
|---------------|---------------------------|
| 12.A.01.000 | Vista d'insieme |
| 12.A.01.001 | Copertura |
| 12.A.01.002 | Ripiano |
| 12.A.02.000 | Cella di analisi |
| 12.A.02.001 | Piastra supporto elastico |
| 12.A.02.002 | Cassettino |
| 12.A.02.003 | Cella |
| 12.A.02.004 | Flangetta un pollice |
| 12.A.03.000 | Cella di analisi (hex) |
| 12.A.03.001 | Cravatta tipo A |
| 12.A.03.002 | Cravatta tipo B |
| 12.A.03.003 | Cella esagonale |

| | |
|-------------|--------------------------|
| 12.A.04.000 | Tavolino ripiegabile |
| 12.A.04.001 | Zampe corte |
| 12.A.04.002 | Zampe medie |
| 12.A.04.003 | Piano tavolo ripiegabile |
| 12.A.04.004 | Zampe lunghe |



Figura 22 - Abbozzo progettuale del prototipo per analisi speditive.

Bibliografia

- Adányi N., Székács I., Szendrő I., Székács A. (2014) Determination of histamine content in vegetable juices by using direct and competitive immunosensors, *Food and Agricultural Immunology*, **25**, 20-33
- AGILENT (2013) *Quick, Easy and Reliable Detection of Histamine in Food Using the Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS with Jet Stream Technology*, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-1286EN.pdf>
- AOAC (2019) *Certificate No. 031901*, https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2014/08/19c_031901_rbiohistamine.v3.pdf
- Biji K. B., Ravishankar C. N., Venkateswarlu R., Mohan C. O., Srinivasa Gopal T. K. (2016) Biogenic amines in seafood: a review, *Journal of Food Science and Technology*, **53**, 2210-2218
- Birkun A., Noltkamper D., Patrick J. D. (2018) *Histamine Toxicity from Fish*, <https://emedicine.medscape.com/article/1009464-overview> (aggiornato il 26/12/2018)
- Fiorani L., Giubileo G., Mangione L., Puiu A., Saleh W. (2017) *Food Fraud Detection by Laser Photoacoustic Spectroscopy*, RT/2017/41/ENEA, Rome, Italy, 28 pp.
- Fiorani L., Giubileo G., Mannori L., Puiu A., Saleh W. (2019) *QCL Based Photoacoustic Spectrometer for Food Safety*, RT/2019/1/ENEA, Rome, Italy, 24 pp.
- Giubileo G., Puiu A., Calderari I. (2015) *Spettroscopia ad alta risoluzione di zuccheri*, RT/2015/4/ENEA, Rome, Italy, 27 pp.
- Giubileo G., Puiu A., Nunziante Cesaro S. (2016) *Spettroscopia della melamina con laser CO₂*, RT/2016/23/ENEA, Rome, Italy, 30 pp.
- HATTON (2019) *Sugar Fraud Protection*, <http://www.hattongrp.com/sugar-fraud-protection> (consultato il 10/09/2019)
- INTERPOL & EUROPOL (2018) *Operation OPSON VI: Targeting Counterfeit and Substandard Foodstuff and Beverage*, https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/official-controls-food-fraud_opson-vi-report.pdf
- Jakšić S., Baloš M. Ž., Mihaljev Ž., Prodanov Radulović J., Nešić K. (2017) Comparison of analytical methods for the determination of histamine in reference canned fish samples, *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **85**, 012066 (6 pp.)
- Ladero V., Calles-Enríquez M., Fernández M., Alvarez M. A. (2010) Toxicological effects of dietary biogenic amines, *Current Nutrition & Food Science*, **6**, 145-156
- Lai A., Palucci A., Almaviva S., Caneve L., Chirico R., Fiorani L., Lazic V., Spizzichino V., Puiu A. (2019) *Indagine spettroscopica non distruttiva su campioni di riso e tessuto di ostrica per METROFOOD*, RT/2018/19/ENEA, Rome, Italy, 50 pp.

- La Vecchia G. (2019) The anti-fraud laser: the revolutionary breakthrough by ENEA against food alterations, *ImpactScool Magazine*, <https://magazine.impactscool.com/en/scienza-e-medicina/il-laser-anti-frodi-la-rivoluzionaria-svolta-di-enea-contro-le-alterazioni-alimentari/> (pubblicato il 22/02/2019)
- Mardia K. V., Kent J. T., Bibby J. M. (1979) *Multivariate Analysis*, Academic Press, London, UK, 521 pp.
- McGlynn W. (2014) *The Importance of Food pH in Commercial Canning Operations*, FAPC, Stillwater, US, 8 pp.
- Moore J. C. (2011) Food fraud: public health threats and the need for new analytical detection approaches, in: Allan Eaglesham A., de León F. A., Hardy R. W. F., eds., *Food Security: The Intersection of Sustainability, Safety and Defense*, NABC Report 23, Ithaca, US, pp. 209-220
- Palucci A., ed. (2018) *2017 Activity Report. Diagnostic and Metrology Laboratory*, ENEA, Rome, Italy, 60 pp.
- R-BIOPHARM (2018) *RIDASCREEN® Histamine (Enzymatic)*, https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2018/07/2018-06_r1605_flowchart_histamine_enzymatic_en_lores.pdf
- Riccio P., Felici G., Alisi G., Caira E. (2014) *La lotta alla contraffazione in Italia nel settore agroalimentare 2009-2012*, Ministero dello Sviluppo Economico, Rome. Italy, 112 pp.
- ROMER (2012) *AgraQuant® Histamine ELISA Test Kits*, <https://www.kemitekskimya.com.tr/files/9273e46477944.pdf>
- Shakila R. J., Vijayalakshmi K., Jeyasekaran G. (2003). Changes in histamine and volatile amines in six commercially important species of fish of the Thoothukkudi coast of Tamil Nadu, India stored at ambient temperature, *Food Chemistry*, **82**, 347-352
- Spink J., Moyer D. C. (2011) *Backgrounder: Defining the Public Health Threat of Food Fraud*, NCFPD, Minneapolis, US, 7 pp.
- Vemireddy L. R., Satyavathi V. V., Siddiq E. A., Nagaraju J. (2015) Review of methods for the detection and quantification of adulteration of rice: Basmati as a case study, *Journal of Food Science and Technology*, **52**, 3187-3202
- WHO (2015) *Food Safety: What You Should Know*, http://www.searo.who.int/entity/world_health_day/2015/whd-what-you-should-know/en/ (datato 07/04/2015)