



Francesca Rigano<sup>a</sup>, Cinzia Cafarella<sup>a</sup>, Domenica Mangraviti<sup>a</sup>,  
Paola Dugo<sup>a,b</sup>, Luigi Mondello<sup>a,b</sup>

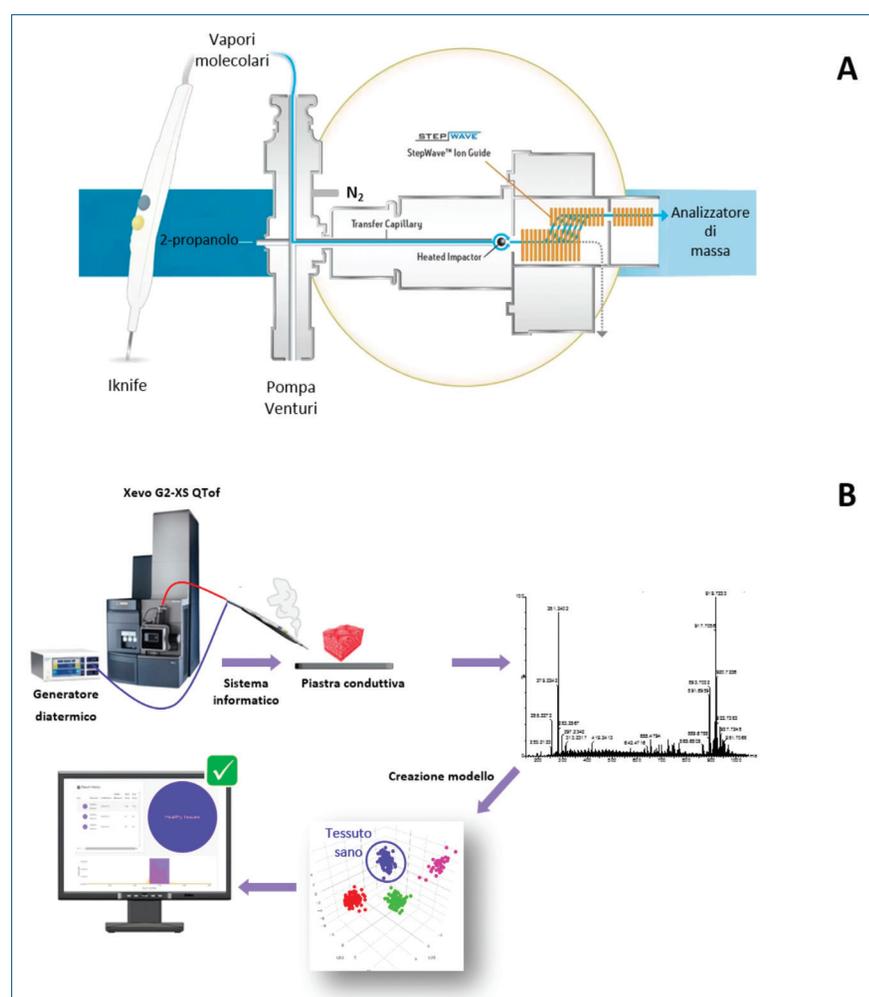
<http://dx.medra.org/10.17374/CI.2023.105.6.28>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali  
Università degli Studi di Messina

<sup>b</sup>Chromaleont Srl, c/o Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche e Ambientali  
Università degli Studi di Messina  
frigano@unime.it

## LA TECNOLOGIA IKNIFE CONTRO LE FRODI ALIMENTARI

*Il presente articolo mira a fornire una panoramica delle potenzialità della tecnologia iknife in vari ambiti applicativi, con particolare attenzione alla salvaguardia del settore agro-alimentare. In tale contesto, sono discusse applicazioni a tutela sia della qualità che della sicurezza degli alimenti, preservando così sia i consumatori che i produttori, oltre che gli ecosistemi.*



### Introduzione: principi e origine della tecnica iknife

Il termine iknife, abbreviazione di “Intelligent Knife” (coltello intelligente) è stato coniato nel 2013 dal gruppo di ricerca dell’Imperial College di Londra, guidato dal Prof. Zoltan Takats, per indicare l’accoppiamento tra un elettrobisturi da sala operatoria con la spettrometria di massa a ionizzazione evaporativa rapida [1], nota con l’acronimo REIMS. La tecnica REIMS è basata sull’impiego di una sorgente di ionizzazione altrettanto recente, introdotta nel 2009 dallo stesso gruppo di ricerca [2]. Tale sorgente è stata ad oggi usata esclusivamente in approcci di spettrometria di massa a pressione atmosferica, in cui il campione viene analizzato nella sua forma nativa, a pressione atmosferica e a temperatura ambiente [3].

Lo schema di funzionamento della tecnica iknife è mostrato in Fig. 1A. L’elettrobisturi provoca, per effetto Joule, il riscaldamento locale del campione, nonché l’evaporazione termica dei suoi componenti mo-



Fig. 1 - A) Schema di funzionamento della strumentazione iknife, riprodotto dal sito <https://www.waters.com>; B) tipico work-flow sperimentale di un'applicazione iknife



lecolari. Questi, per effetto Venturi e guidati da un flusso di azoto e uno coassiale di 2-propanolo, raggiungono la sorgente REIMS dove la ionizzazione avviene per effetto termoionico, cioè per contatto con una superficie riscaldata ad oltre 800 °C. Gli ioni generati raggiungono così l'analizzatore e il rivelatore di massa.

La combinazione di tale configurazione strumentale con l'analisi chemiometrica dei dati consente, poi, la costruzione di database spettrali e modelli statistici che permettono la differenziazione tra una moltitudine di campioni classificati dall'operatore stesso, secondo il concetto di apprendimento automatico:

- 1) lo strumento viene dapprima istruito attraverso l'analisi di campioni noti (costruzione di una libreria spettrale);
- 2) l'analisi chemiometrica consente di clusterizzare i campioni minimizzando le differenze tra campioni appartenenti alla stessa classe e massimizzando quelle tra classi di campioni distinti (costruzione del modello statistico);
- 3) lo strumento è in grado di identificare campioni incogniti attraverso confronto col modello statistico costruito (riconoscimento in tempo reale del campione incognito).

L'intero work-flow sperimentale è riportato in Fig. 1B, nella quale si distinguono le 3 fasi sopra elencate precedute dal campionamento tramite elettrobisturi e analisi dei vapori generati attraverso spettrometria di massa con sorgente REIMS.

Dal momento che l'evaporazione termica è ciò che accade durante la resezione chirurgica dei tessuti, la tecnica *iknife* è stata usata, in principio, in ambito clinico a scopo diagnostico per l'analisi di tessuti biologici e per la differenziazione tra cellule sane e cellule cancerose. Ha riscosso da subito molto clamore per la possibilità di identificare i tessuti in tempo reale, ponendosi come alternativa alle più lunghe e laboriose tecniche di istopatologia, o alle più incerte metodiche di istologia estemporanea che mostrano un'alta probabilità di errore.

### Diffusione della tecnica *iknife*

La Fig. 2 mostra il numero di applicazioni della tecnica in oggetto suddivise per anno (Fig. 2A) e per ambito di applicazione (Fig. 2B).

Dall'unione delle informazioni schematizzate in Fig. 2A e Fig. 2B, è possibile costruire un istogramma che riporta l'andamento delle applicazioni *iknife* nei diversi ambiti nel corso degli anni (Fig. 2C).

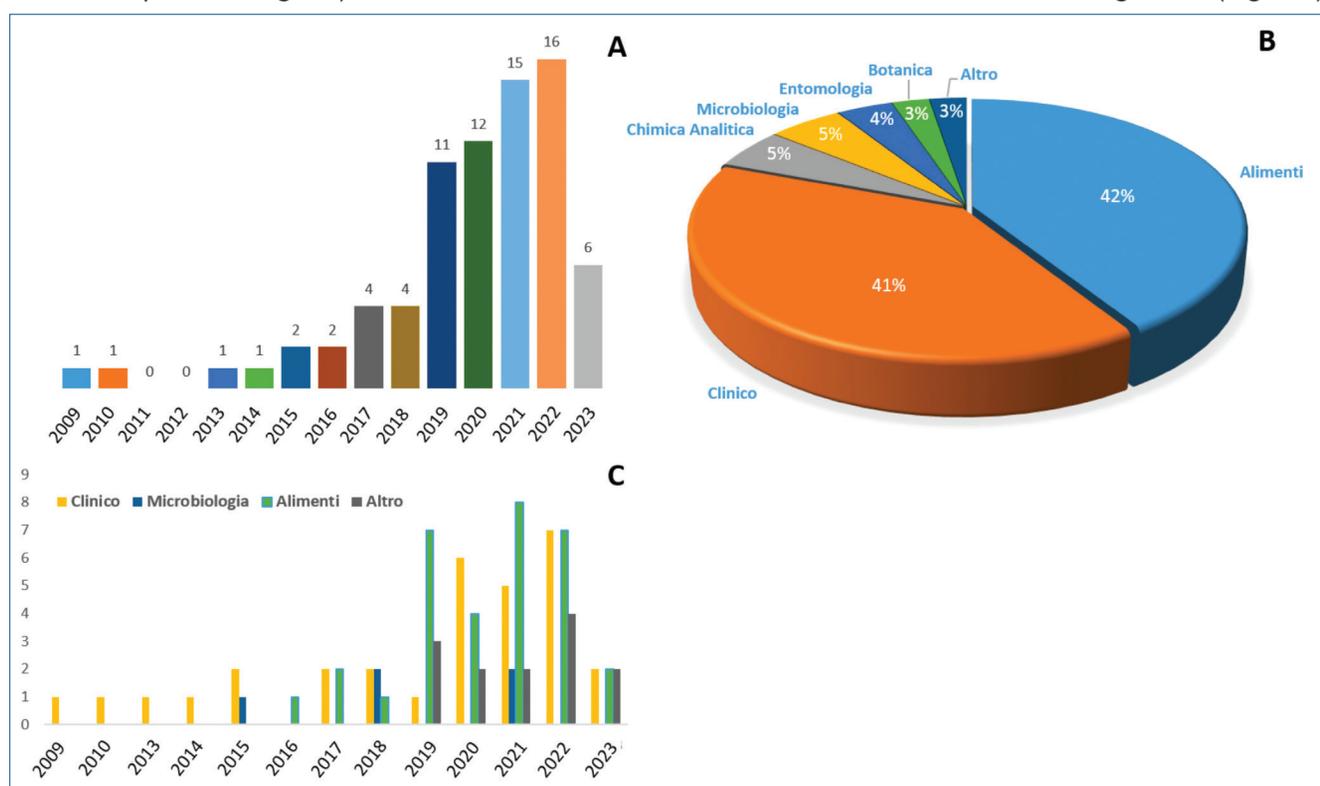


Fig. 2 - Applicazioni della tecnica *iknife*: A) dal 2009 ad oggi, B) suddivise per ambito di applicazione, C) suddivise nei principali ambiti di applicazione dal 2009 ad oggi. Fonte: Scopus (20 luglio 2023)

Emerge chiaramente che, dalla sua nascita fino al 2015, tale strumento è stato impiegato solo in ambito diagnostico, ad eccezione di un'applicazione in ambito microbiologico [4].

Nel 2016 appare la prima applicazione in campo alimentare per l'identificazione della specie animale da cui provenivano diverse carni. Lo studio ha preso in considerazione carni equine e bovine, differenziazione resa necessaria in seguito allo scandalo della carne di cavallo presentatosi tre anni prima, che ha messo in allarme gli organi che si occupano di sicurezza e tracciabilità alimentare, concetti distinti ma profondamente legati dal rispetto della normativa vigente in relazione all'etichettatura dei prodotti alimentari. In tale contesto, l'iknife si è rivelato uno strumento utile per la lotta alla contraffazione alimentare, andando a generare dei profili spettrali caratteristici per ogni tipologia di alimento [5]. I risultati promettenti di questa prima applicazione hanno aperto la strada a un cospicuo impiego della tecnologia iknife in ambito alimentare, superando il numero di applicazioni in ambito clinico.

A partire dal 2019, cominciano ad apparire applicazioni in svariati ambiti che spaziano dalla botanica [6-7] all'entomologia [8-10]. Esse impiegano due approcci analitici complementari: il primo è volto alla delucidazione della composizione chimica del campione; il secondo è invece un approccio di *fingerprinting* che mira ad ottenere dei profili caratteristici di varie tipologie di campione, senza mirare necessariamente all'identificazione e alla quantificazione dei singoli costituenti molecolari.

Nella maggior parte delle applicazioni presenti in letteratura i due approcci sono stati utilizzati congiuntamente per consentire sia la differenziazione dei campioni sulla base dei loro profili spettrali unici, sia l'identificazione delle cosiddette caratteristiche discriminanti.

Queste ultime sono state identificate in maniera accurata grazie all'utilizzo di uno spettrometro di massa ibrido ad alta risoluzione che consente di raccogliere dati di massa esatta ed effettuare esperimenti MS/MS utili per la delucidazione strutturale. In ambito oncologico, la combinazione di chirurgia tradizionale e analisi molecolare in tempo reale può contribuire a ridurre il rischio di recidive aumentando la precisione intraoperatoria nella definizione dei margini tumorali [1, 11-17]. In altri termini, l'asportazione completa della massa tumorale è guidata

da cambiamenti significativi rivelati nei profili lipidici [1, 11-17] al confine tra cellule sane e cancerose. Ciò è stato sfruttato anche dal nostro gruppo di ricerca in ambito veterinario per la differenziazione di diverse patologie mammarie canine [18].

Anche in ambito alimentare, i metaboliti principalmente rivelati e identificati sono stati lipidi, componenti delle membrane cellulari vegetali e animali, tale che l'iknife è risultato negli anni uno strumento idoneo per indagini lipidomiche.

### Applicazioni in ambito alimentare

L'utilizzo di una tecnologia così sofisticata e costosa in campo alimentare si giustifica con la crescente consapevolezza dell'importanza di un'alimentazione sana e sostenibile. Ciò significa assicurare ai consumatori prodotti di qualità ed esenti da rischi per la salute umana e dell'ecosistema.

L'iknife è stato impiegato con successo sia per la salvaguardia della qualità degli alimenti sia per la tutela della sicurezza alimentare. Nel primo caso ci si riferisce alla determinazione della composizione chimica dell'alimento, ovvero all'ottenimento di profili metabolomici correlati alla provenienza geografica/condizioni pedoclimatiche, varietà coltivate o specie allevate, e tecnologie produttive. In altri termini, tali profili metabolomici sono stati usati per confermare la genuinità del prodotto rispetto a quanto dichiarato in etichetta, incluse la denominazione di origine come nel caso dei marchi DOP (denominazione di origine protetta) e IGP (indicazione geografica protetta), consentendo quindi la distinzione tra alimenti autentici e contraffatti.

In tale contesto, l'Italia rappresenta il luogo ideale in cui cercare alimenti autentici da salvaguardare, considerato il numero significativo di marchi di origine presenti nel territorio (ad oggi risultano registrati oltre 300 marchi [19]).

La prima applicazione sviluppata dal nostro gruppo di ricerca ha riguardato la salvaguardia del pistacchio di Bronte DOP, in quanto prodotto intimamente legato alle caratteristiche territoriali della zona di coltivazione [20]. Esso è coltivato nella zona di Bronte in un'area limitrofa al vulcano Etna, dove il terreno lavico e il clima permettono la produzione di pistacchi dal colore verde intenso e dal gusto aromatico, molto apprezzati nei mercati internazionali. A causa della dimensione relativamente piccola della superficie coltivata, la produzione italiana è molto bassa rispetto ad Asia e California; tuttavia,

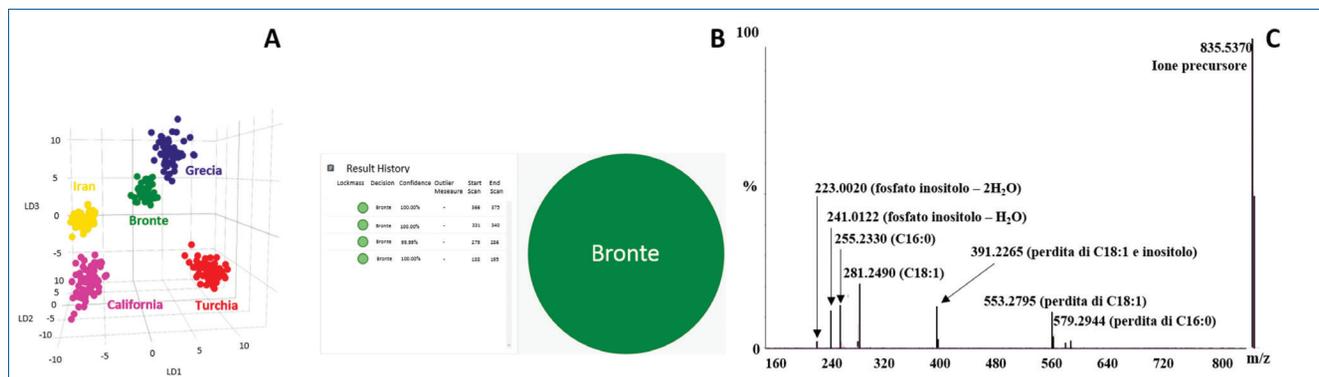


Fig. 3 - A) Modello statistico per la differenziazione di pistacchi provenienti da 5 diverse regioni geografiche; B) riconoscimento in tempo reale di un campione di pistacchio di Bronte; C) spettro MS/MS del fosfatidilinositolo PI (C16:0/C18:1). Immagine riprodotta con il permesso da Rigano *et al.* [20]

la qualità è riconosciuta superiore nel mondo, tale che il pistacchio di Bronte rappresenta una delle maggiori fonti economiche della Sicilia orientale. Un ulteriore scopo del lavoro è stato determinare marker di autenticità che consentano di differenziare il pistacchio di Bronte da quello proveniente da altre aree geografiche. La Fig. 3 riassume i punti chiave del lavoro pubblicato.

Una seconda applicazione a tutela di prodotti italiani è stata sviluppata nell'ambito del progetto VIOLIN (Valorizzazione di prodotti Italiani derivanti dall'OLiva attraverso tecniche analitiche INnovative), finanziato dalla fondazione in rete per la ricerca Agroalimentare (Ager), che ha consentito la costruzione di un database di 90 oli extravergine di oliva italiani al fine di differenziarli in base al marchio DOP e alle varietà di oliva [21]. Ciò si pone lo scopo di preservare i prodotti di qualità italiani e l'enorme biodiversità del nostro territorio dal momento che ogni cultivar mantiene determinate caratteristiche, incluse quelle organolettiche, solo se coltivata nelle specifiche condizioni pedoclimatiche di origine. Grazie alla velocità di analisi e accuratezza nel riconoscimento di campioni "incogniti", l'iknife si può considerare uno strumento potente a difesa dell'origine dei prodotti, contribuendo a tutelare gli interessi dei produttori e dei consumatori e l'economia del nostro Paese.

Un altro aspetto correlato alla qualità alimentare in cui l'iknife ha trovato applicazione è relativo all'ottimizzazione dei processi di produzione: l'analisi dei profili metabolici può fornire informazioni sulle variazioni chimiche durante i processi di trasformazione degli alimenti, consentendo di ottimizzare i parametri di produzione per migliorare la qualità del prodotto finale.

Rientra in questa categoria il lavoro di Song e colleghi per valutare la data di scadenza del pregiato cetriolo di mare in base al processo di essiccazione [22], o lo studio pubblicato degli stessi autori l'anno precedente per valutare l'ossidazione dei lipidi durante la frittura ad aria di mazzancolle del Pacifico a differenti temperature [23]. In particolare, i cambiamenti indotti da vari processi di trattamento hanno ripercussioni sulla sicurezza alimentare tale che le due macroaree della qualità e della sicurezza alimentare si intrecciano costantemente.

Infine, quando si parla di sicurezza alimentare non si può trascurare la delicata questione dell'approvvigionamento alimentare che garantisce che tutti gli individui abbiano accesso a cibo sufficiente, sicuro e nutriente che soddisfi le loro esigenze e preferenze dietetiche secondo uno stile di vita sano. Tale concetto è strettamente correlato alla biodiversità.

A tal riguardo, la differenziazione di specie ittiche provenienti da diverse zone costiere è di notevole rilevanza per la tutela della biodiversità. La salvaguardia di specie di piccola taglia o del periodo riproduttivo di alcune specie a rischio estinzione è di fondamentale importanza per tutelare l'ecosistema marino. In tale contesto si inquadra il lavoro condotto dal nostro gruppo di ricerca che ha portato alla costruzione di un database di 18 specie provenienti dal Mar Mediterraneo [24], nonché alla loro differenziazione in base alla classificazione tassonomica (Fig. 4A). Inoltre, la costruzione di sotto-modelli permette di discriminare specie molto simili, appartenenti alla stessa famiglia o anche stadi di maturazione diversi della stessa specie, come nel caso di cavagnola e ricciola, entrambe specie di *Seriola dumerilli* (famiglia *Carangidae*, Fig.

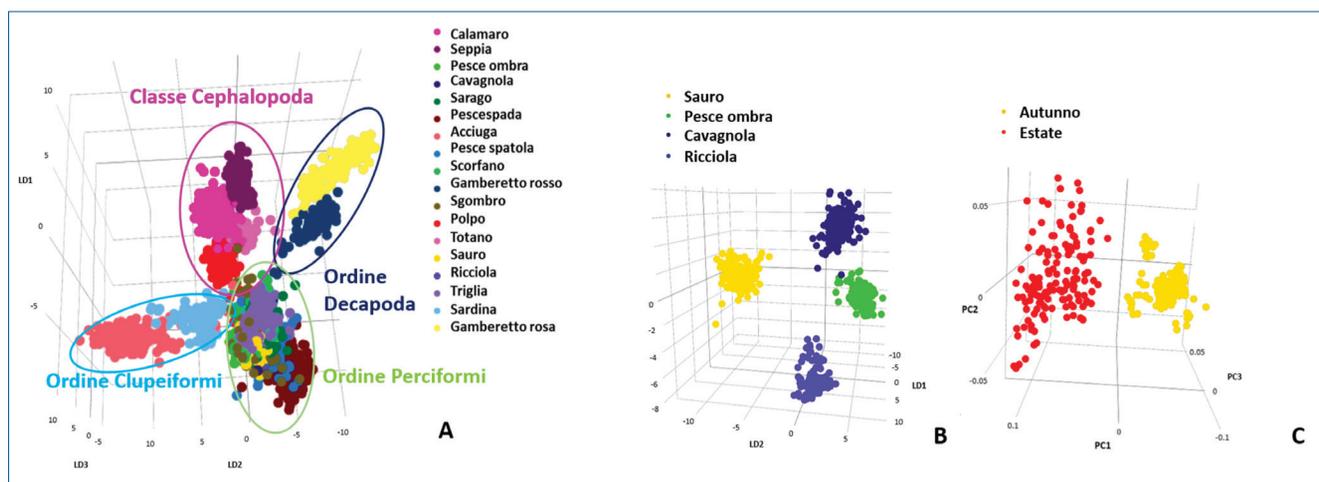


Fig. 4 - Modelli statistici per la differenziazione di A) 18 specie ittiche tipiche del Mar Mediterraneo, B) 4 specie appartenenti alla famiglia delle Carangidi, C) pesce spada pescato in due diverse stagioni. Immagine riprodotta con il permesso da Rigano *et al.* [24]

4B). Infine, nello stesso studio, sono stati comparati i profili spettrali di specie di pesce spada, pescate in due diverse stagioni, gettando le basi per la rivelazione di periodi di pesca illegale.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Balog, L. Sasi-Szabó *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, 2013, **5**, 194.
- [2] K.C. Schäfer, J. Dénes *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 8240.
- [3] Z. Takáts, J.M. Wiseman *et al.*, *Science*, 2004, **306**, 471.
- [4] O. Golf, N. Strittmatter *et al.*, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 2527.
- [5] J. Balog, D. Perenyi *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2016, **64**, 4793.
- [6] K. Arena, F. Rigano *et al.*, *Molecules*, 2020, **25**, 962.
- [7] K. Arena, E. Trovato *et al.*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2023, **230**, 115399.
- [8] I. Wagner, N.I. Koch *et al.*, *Open Biol.*, 2020, **10**, 200196.
- [9] I. Wagner, L. Grigoraki *et al.*, *BMC Biology*, 2023, **21**, 1882.
- [10] J. Morgan, J.E. Salcedo-Sora *et al.*, *Journal of Insect Science*, 2022, **22**, 1.
- [11] E.R. St John, J. Balog *et al.*, *Breast Cancer Research*, 2017, **19**, 59.
- [12] D.L. Phelps, J. Balog *et al.*, *British Journal of Cancer*, 2018, **118**, 1349.
- [13] S. Mason, E. Manoli *et al.*, *Surgical Endoscopy*, 2019, **34**, 3618.
- [14] M. Tzafetas, A. Mitra *et al.*, *PNAS*, 2020, **117**, 7338.
- [15] P.M. Vaysse, H.I. Grabsch *et al.*, *Laboratory Investigation*, 2021, **101**, 381.
- [16] D. Marcus, D.L. Phelps *et al.*, *Cancers*, 2022, **14**, 5892.
- [17] H. Wang, T. Li *et al.*, *Electrophoresis*, 2023, **44**, 1057.
- [18] D. Mangraviti, J.M. Abbate *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, **23**, 10562.
- [19] Regolamento UE n. 1151/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 novembre 2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari (aggiornato al 23 marzo 2023).
- [20] F. Rigano, S. Stead *et al.*, *Food Anal. Methods*, 2019, **12**, 558.
- [21] D. Mangraviti, F. Rigano *et al.*, *LWT*, 2021, **138**, 110715.
- [22] G. Song, Q. Zhao *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2021, **69**, 14699.
- [23] G. Song, L. Li *et al.*, *Food Control*, 2020, **111**, 107066.
- [24] F. Rigano, D. Mangraviti *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2019, **411**, 660.

## Iknife against Food Fraud

An overview of the potential of the iknife technology in several application field is provided, with a special focus on the preservation of agri-food sector. Within this context, we reported applications for the safeguard of both food quality and food security, demonstrating its applicability against food fraud, thus protecting producers and consumers, as well as ecosystems.