

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di biomedicina comparata ed alimentazione

Dipartimento di agronomia animali alimenti risorse naturali e ambiente

Corso di laurea magistrale in biotecnologie per l'alimentazione

**DETERMINAZIONE DELLO IODIO IN MATRICI
LATTIERO-CASEARIE CON METODO DI RIFERIMENTO E
TECNOLOGIA AI RAGGI X**

Relatore: Dr. Giovanni Niero

Correlatori: Prof. Massimo De Marchi

Dr.ssa Marta Pozza

Laureanda: Tamara Garziera

Matricola n. 2087040

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUZIONE.....	3
1.1. Lo iodio nella salute umana.....	3
1.2. Fonti di iodio nella dieta umana.....	6
1.3. Fonti di variazione dello iodio nel latte e derivati.....	9
1.3.1. <i>Alimentazione delle vacche da latte.....</i>	<i>9</i>
1.3.2. <i>Presenza di composti goitrogeni negli alimenti destinati alla vacca da latte.....</i>	<i>10</i>
1.3.3. <i>Tipologia di allevamento e stagionalità.....</i>	<i>10</i>
1.3.4. <i>Disinfezione dei capezzoli con prodotti contenenti iodio.....</i>	<i>11</i>
1.3.5. <i>Trattamenti tecnologici del latte.....</i>	<i>12</i>
1.4. Metodo di riferimento per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari.....	13
1.4.1. <i>Spettrometria al plasma per induzione accoppiata.....</i>	<i>13</i>
1.4.2. <i>Applicazioni della spettrometria al plasma per induzione accoppiata per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari.....</i>	<i>14</i>
1.4.3. <i>Applicazioni della spettrometria al plasma per induzione accoppiata per la quantificazione dello iodio in latte e derivati.....</i>	<i>15</i>
1.4.4. <i>Limiti della spettrometria al plasma per induzione accoppiata.....</i>	<i>16</i>
1.5. Metodi predittivi per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari...17	
1.5.1. <i>Spettroscopia nel vicino infrarosso e spettroscopia nel medio infrarosso.....</i>	<i>17</i>
1.5.2. <i>Analisi mediante spettroscopia nel medio infrarosso per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari</i>	<i>18</i>
1.5.3. <i>Principi e utilizzo della tecnologia ai raggi X per la quantificazione dello iodio in matrici lattiero-casearie.....</i>	<i>19</i>
2. OBIETTIVO DELL'ELABORATO.....	23
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1. Campionamento.....	25

3.2. Analisi mediante spettrometria al plasma per induzione accoppiata.....	25
3.2.1. <i>Mineralizzazione dei campioni.....</i>	<i>25</i>
3.2.2. <i>Quantificazione dello iodio mediante spettrometria al plasma per induzione accoppiata.....</i>	<i>26</i>
3.3. Analisi mediante tecnologia ai raggi X.....	27
3.4. Analisi statistica.....	28
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	31
4.1. Statistiche descrittive.....	31
4.2. Calibrazione della strumentazione ai raggi X.....	35
4.3. Cross validazione e validazione esterna della strumentazione ai raggi X.....	37
5. CONCLUSIONI.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	41
RINGRAZIAMENTI.....	44

RIASSUNTO

Lo iodio è un microelemento essenziale per la salute dell'uomo con particolare riferimento alla funzionalità e alla fisiologia della tiroide. L'assunzione inadeguata di iodio influisce negativamente sulla produzione degli ormoni tiroidei e favorisce l'insorgenza di una serie di disturbi da carenza di iodio. I pesci di mare, i crostacei ed il sale iodato, sono tra gli alimenti più ricchi di iodio, seguiti da latte e latticini, che assumono in questo contesto una maggior importanza, per il loro costo contenuto e le abitudini alimentari dei consumatori. Tra i metodi utilizzati per quantificare lo iodio in prodotti lattiero caseari, il metodo Gold standard è rappresentato dalla spettrometria al plasma per induzione accoppiata. Si tratta di una tecnica altamente sensibile, ma che richiede una fase preliminare di preparazione del campione, personale specializzato, tempi di analisi lunghi e costi elevati. In questo contesto, le metodologie di tipo predittivo assumono grande importanza, in quanto permettono di ottenere risultati in minor tempo e con una minima preparazione del campione. Tra i metodi più utilizzati in tracciabilità alimentare vi sono la spettroscopia nel vicino infrarosso, la spettroscopia nel medio infrarosso e la spettrofotometria ai raggi X. Lo scopo di questa tesi è valutare l'accuratezza e la sensibilità della metodologia predittiva ai raggi X nel determinare la concentrazione di iodio presente in matrici lattiero-casearie (latte, yogurt e ricotta). Sono stati raccolti 45 campioni da diversi supermercati collocati nelle province di Padova e Venezia, tra i quali 18 campioni di latte, 14 campioni di yogurt e 13 campioni di ricotta. Per l'analisi di riferimento, i campioni sono stati inizialmente sottoposti a una fase preparativa per l'estrazione dello iodio, seguita dall'analisi mediante spettrometria al plasma per induzione accoppiata. Successivamente, i campioni tal quali, ovvero senza essere sottoposti a trattamenti preparativi, sono stati analizzati tramite strumentazione ai raggi X. I coefficienti di determinazione ottenuti nelle fasi di cross-validazione e validazione esterna della strumentazione ai raggi X sono risultati pari a 0.64 e 0.46, rispettivamente. Il valore della ratio performance deviation calcolato è, invece, risultato pari a 2,61. Lo studio ha permesso di verificare la moderata capacità predittiva della strumentazione ai raggi X nella determinazione della concentrazione di iodio in latte e latticini. In conclusione, dato il valore della ratio performance deviation, è possibile considerare i modelli ottenuti adeguati per lo screening preliminare dei campioni. Tuttavia, per ottenere dei risultati più accurati e verificare l'effettiva efficacia dei

modelli predittivi XRF, sarà necessario eseguire ulteriori analisi, nonché aumentare il numero di campioni entro ciascuna matrice analizzata.

ABSTRACT

Iodine is a fundamental element for human health, with particular regard for the function and physiology of the thyroid gland. Inadequate iodine intake can adversely affect the production of thyroid hormones, causing the onset of various iodine deficiency disorders. Seafood, shellfish, and iodized salt are the major sources of iodine, followed by milk and dairy products. Milk and dairy products are particularly important due to their affordability and widespread consumption. Among the methods used to quantify iodine in dairy products, the Gold standard is represented by inductively coupled plasma mass spectrometry. This analytical technique displays a high level of sensitivity, but it necessitates skilled personnel and is time demanding in terms of sample preparation and analysis. In this context, predictive methodologies are important as they allow for obtaining results in a shorter time and with minimal sample preparation. The most commonly used methods for food traceability include near-infrared, mid-infrared, and X-ray spectrophotometry. This thesis aims to evaluate the accuracy and sensitivity of the predictive X-ray methodology in determining the iodine concentration in dairy products such as milk, yogurt, and ricotta. A total of 45 samples were collected from various supermarkets in the provinces of Padua and Venice, including 18 samples of milk, 14 samples of yogurt, and 13 samples of ricotta. The samples underwent a preliminary preparation phase to extract iodine and then, they were analyzed using inductively coupled plasma mass spectrometry. After that, the samples without any preparative treatments, were analyzed using the X-ray instrument. Cross-validation and external validation exhibited a coefficients of determination equal to 0.64 and 0.45, respectively. The calculated ratio of performance to deviation value was 2.61. The study showed that X-ray technology can moderately predict the iodine concentration in milk and dairy products. Based on the ratio performance deviation values, the prediction models can be considered adequate for rough screening of milk and dairy products samples. However, additional research is needed to validate the effectiveness of ED-XRF prediction models by increasing the number of samples in both cross-validation and external validation sets for each type of product analyzed.

1. INTRODUZIONE

1.1. Lo iodio nella salute umana

Lo iodio è un microelemento fondamentale per la salute dell'uomo. Un'assunzione adeguata di iodio è essenziale per il corretto funzionamento e la fisiologia della tiroide (*Flachowsky et al. 2014*). Lo iodio viene assunto attraverso la dieta nella forma di ioduro (I^-) e assorbito per la quasi totalità (90 %) nel duodeno. Lo iodato (IO_3^-) invece, che solitamente si trova nel sale iodato, viene inizialmente ridotto nello stomaco a ioduro per poi essere assorbito a livello intestinale (*Sorrenti et al. 2021; van der Reijden et al. 2017*). L'assorbimento dello iodio è mediato per la maggior parte dal trasportatore sodio/ioduro (NIS), presente nella parte apicale degli enterociti del duodeno, digiuno e ileo. Una volta assorbito, lo ioduro passa al circolo sanguigno e durante le successive 10 ore, il 90 % di esso viene eliminato dalla circolazione dai reni, attraverso le urine (*Zimmermann, 2009*). Il restante 10 % di ioduro circolante viene assorbito dalla tiroide grazie all'azione del trasportatore NIS, presente nella membrana plasmatica basolaterale dei tireociti (*Sorrenti et al. 2021; van der Reijden et al. 2017*). Tuttavia, in caso di ridotto apporto di iodio, la ghiandola tiroidea può trattenere l'80 % di iodio dal flusso sanguigno per svolgere la propria attività endocrina. Di conseguenza, la quantità di iodio eliminata attraverso le urine si riduce, portando ad una riduzione della clearance renale dello iodio, ovvero la velocità con cui il rene è in grado di filtrare e quindi eliminare lo iodio dal sangue in una certa unità di tempo (ml/min) (*Sorrenti et al. 2021*).

La tiroide utilizza lo ioduro per la sintesi di due ormoni: la triiodotironina (T3) e la tiroxina (T4), che contengono rispettivamente tre e due atomi di iodio nella loro struttura chimica (*van der Reijden et al. 2017*). Gli ormoni tiroidei, una volta prodotti, raggiungono i diversi tessuti bersaglio attraverso la circolazione sanguigna, dove esercitano la loro azione regolatoria (*Flachowsky et al. 2014; Sorrenti et al. 2021*).

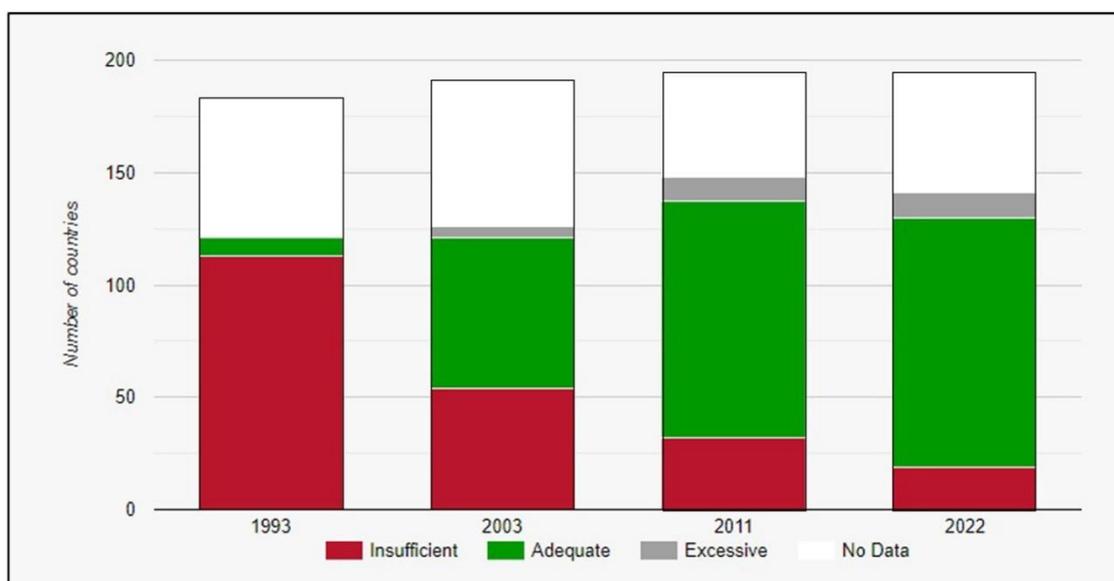
Nell'uomo il fabbisogno giornaliero di iodio varia in funzione dell'età, del peso corporeo, dello stadio fisiologico e del sesso dell'individuo (*Flachowsky et al. 2014; van der Reijden et al. 2017*). In media, secondo l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), le dosi raccomandate variano da 90 µg/die per i bambini, a 120 µg/die negli adolescenti, fino a 150 µg/die negli adulti. L'apporto raccomandato durante la gravidanza e durante l'allattamento aumenta fino a 200-250 µg/die, per garantire un adeguato trasferimento

di ormoni tiroidei dalla madre al feto prima che la tiroide fetale inizi a svilupparsi (Sorrenti et al. 2021).

Un apporto insufficiente di iodio influisce negativamente sulla produzione degli ormoni tiroidei (van der Reijden et al. 2017). Di conseguenza, l'individuo può sviluppare una serie di disturbi da carenza di iodio (*iodine deficiency disorders*, IDD). Questo termine, coniato da Basil S. Hetzel, comprende tutte le patologie derivanti da un insufficiente apporto di iodio (Sorrenti et al. 2021).

Nel 1993 sono stati pubblicati i dati circa lo stato nutrizionale relativo allo iodio nei diversi continenti del mondo, grazie alla collaborazione tra l'organizzazione mondiale della sanità (OMS) e lo Iodine Global Network (IGN). Gli stessi dati sono stati successivamente raccolti nel 2003, 2011 e 2022 (Figura 1). Secondo le stime effettuate, nel 1993 erano 113 i paesi che presentavano dei livelli di iodio inadeguati per la salute. Nel 2022, confrontando i dati con le stime degli anni precedenti, si può osservare come il numero di paesi che affrontano una situazione di insufficienza di iodio sia sceso a 20. Tuttavia, nonostante questa riduzione, i disturbi causati dalla carenza di iodio continuano a costituire una sfida significativa per la salute pubblica, colpendo sia le nazioni in via di sviluppo che quelle industrializzate (van der Reijden et al., 2017).

Figura 1. Grafico delle tendenze storiche in riferimento allo stato nutrizionale relativo allo iodio a livello mondiale (IGN, 2022).



L'Italia ha raggiunto la iodio-sufficienza solo recentemente, grazie all'approvazione del Decreto del 9 luglio 2012 "Disposizioni finalizzate alla prevenzione del gozzo endemico e di altre patologie da carenza di iodio" (con la quale è stato introdotto il programma nazionale di iodio-profilassi su base volontaria) ed un attento monitoraggio da parte dell'osservatorio nazionale per il monitoraggio della iodio-profilassi, preposto dall'Atto d'Intesa della Conferenza Stato Regione del 26 febbraio 2008.

I disturbi da carenza di iodio possono essere più o meno gravi, a seconda dell'entità della carenza e del periodo di vita in cui essa si verifica (*Sorrenti et al. 2021*). Nel feto e nel neonato, una produzione adeguata di ormoni tiroidei, conseguente a una sufficiente assunzione di iodio, è essenziale per il corretto sviluppo del sistema nervoso centrale, per la crescita e per il mantenimento dell'equilibrio metabolico dell'individuo (*Flachowsky et al. 2014; Sorrenti et al. 2021*).

Uno fra i disordini più frequenti dovuti ad una non adeguata assunzione di iodio è la comparsa del cosiddetto gozzo, situazione in cui si assiste ad un aumento del volume della ghiandola tiroidea (*Flachowsky et al. 2014*). Nelle donne la carenza di iodio può causare importanti alterazioni riproduttive, come anovulazione o infertilità. Queste condizioni possono portare a gravi complicazioni anche durante la gravidanza, tra cui l'aumento del rischio di mortalità perinatale, mortalità infantile, cretinismo e danni irreversibili al sistema nervoso centrale (SNC), con conseguente ritardo mentale permanente (*Sorrenti et al. 2021; van der Reijden et al. 2017*).

È importante ribadire che, anche un'eccessiva assunzione di iodio, può avere conseguenze negative sulla salute. L'eccesso di iodio, solitamente derivante dall'elevato consumo di sale iodato e di integratori alimentari, può causare disfunzioni tiroidee, quali ipotiroidismo o ipertiroidismo. In particolare, l'ipertiroidismo indotto dallo iodio si manifesta in soggetti con iodio-insufficienza all'inizio dell'adesione a programmi di integrazione di iodio. In questi casi, la tiroide comincia a produrre una quantità eccessiva di ormoni tiroidei in risposta all'improvviso aumento dell'apporto di iodio, che porta conseguentemente ad una situazione di ipertiroidismo (*Pennington, 1990*). Al contrario, in individui con un'adeguata riserva di iodio, un eccesso del minerale provoca un aumento dei livelli dell'ormone stimolante la tiroide (TSH), il quale inibisce la produzione di ormoni tiroidei, portando ad una situazione di ipotiroidismo. Pertanto, l'effetto dell'eccesso di iodio varia da soggetto a soggetto ed è strettamente legato alla funzione tiroidea preesistente (*Pennington, 1990*). Secondo linee guida, i livelli massimi

di assunzione di iodio possono variare da 3 a 7 volte la dose giornaliera raccomandata (*van der Reijden et al. 2017*).

1.2. Fonti di iodio nella dieta umana

Per soddisfare il fabbisogno di iodio così come raccomandato dalle linee guida, è importante adottare una dieta varia e bilanciata, che preveda l'assunzione di alimenti ricchi in tale micronutriente. Lo iodio, sia in cibi che in bevande è presente in concentrazioni variabili; in Tabella 1 è possibile osservare la concentrazione media dello iodio contenuto in diverse categorie alimentari. Lo iodio presente nell'acqua è influenzato da innumerevoli fattori, come la concentrazione di iodio del suolo (aree con suoli naturalmente ricchi di iodio possono contribuire ad una maggiore presenza del minerale nell'acqua, qui trasportato attraverso la pioggia o l'irrigazione), la vicinanza al mare e il deflusso agricolo (l'acqua che viene utilizzata per l'irrigazione dei campi agricoli può trasportare lo iodio naturalmente presente nel suolo nei corpi idrici vicini, contribuendo ad aumentare la sua concentrazione) (*Sorrenti et al. 2021; Nerhus et al. 2018*).

In frutta e verdura la quantità di iodio è prevalentemente influenzata dalla concentrazione dello stesso nel suolo, nonché da fertilizzanti o dai composti contenenti iodio utilizzati per l'irrigazione. Di conseguenza, tali fattori influenzano l'apporto di iodio nella dieta di animali al pascolo come bovini da carne o vacche da latte, ma anche altri animali quali specie avicole alimentate con mangimi (*Sorrenti et al. 2021*).

Gli alimenti con la più elevata concentrazione di iodio sono i pesci e le piante marine, in quanto capaci di accumularlo direttamente dall'ambiente circostante. Una nuova fonte di iodio, prima consumata principalmente in paesi asiatici, ma che si sta ad oggi ampiamente espandendo in più paesi del mondo, è rappresentata dalle alghe. Tuttavia, è stato riscontrato che un'eccessiva assunzione di tale alimento può portare ad un'eccessiva assunzione di iodio, che potrebbe risultare dannoso per la funzione tiroidea in individui più sensibili, come donne in gravidanza e soggetti affetti da autoimmunità tiroidea (*Sorrenti et al. 2021; van der Reijden et al. 2017; Nerhus et al. 2018*).

In questo contesto, pesci di mare, crostacei e sale iodato, utilizzato sia in ambito domestico che nell'industria alimentare, sono tra gli alimenti più ricchi di iodio (*Niero et al. 2023*). Tuttavia, visto il costo spesso elevato del pesce, il latte ed i prodotti lattiero-

caseari, stanno diventando una fonte sempre più importante di iodio nella dieta umana nei paesi industrializzati (*Flachowsky et al. 2014; van der Reijden et al. 2017*). Come riportato in letteratura, 125 ml di latte (circa un bicchiere), contengono tra gli 11 e i 60 µg di iodio, sufficienti a coprire tra il 25 e il 70 % del fabbisogno giornaliero raccomandato per una persona adulta (*van der Reijden et al. 2017, IIS, 2021*). Valori più bassi sono invece contenuti nel formaggio (tra 2 e 6 µg di iodio in circa 30 g), mentre concentrazioni più elevate sono state riscontrate in ricotta vaccina e caprina (30 g di prodotto fornisce tra il 26 e il 90 % del fabbisogno giornaliero di iodio raccomandato per persona una adulta) (*van der Reijden et al. 2017; IIS, 2021*).

Tabella 1. Contenuto medio e deviazione standard ($\mu\text{g/g}$) di iodio in diverse categorie alimentari (IIS, 2021).

Categoria alimentare	n	Alimenti (n)	μg iodio/g
Pesce e prodotti ittici	20	Cozze (3), vongole veraci (2), calamari (3), triglie (4), Merluzzo (3), tonno dell'Atlantico (3), nasello europeo (2)	0.74 \pm 0.24
Cereali (pasta e pane)	25	Pasta (12), pizza (8), cereali per la colazione (5)	0.06 \pm 0.02
Latte e bevande a base di latte	15	Latte (12), yogurt (3)	0.15 \pm 0.06
Formaggio semistagionato	10	Formaggio vaccino	0.30 \pm 0.06
Carne	15	Manzo (4), maiale (5), pollame (6)	0.03 \pm 0.01
Uova	10		0.08 \pm 0.03
Frutta/vegetali	20	Ortaggi a foglia (4), pomodori (3), radici (6), frutta fresca (7)	0.03 \pm 0.01
Acqua e bevande	10		< ¹ LOD
Sale	163	Sale grosso iodato (65), sale fino iodato (98)	29.8 \pm 2.5

¹LOD = Limit Of Detection (limite di rilevabilità)

1.3. Fonti di variazione dello iodio nel latte e derivati

La concentrazione di iodio nel latte e nei latticini varia in funzione di molti fattori presenti lungo l'intera filiera lattiero casearia, ivi inclusi la produzione e lavorazione dell'alimento (*Niero et al. 2023*).

1.3.1. Alimentazione delle vacche da latte

La letteratura scientifica riporta che la quantità di iodio assunta dagli animali attraverso la dieta è correlata positivamente alla quantità di iodio presente nel latte (*Flachowsky et al. 2014; Guerra et al. 2024; Niero et al. 2023*). Gli integratori iodati somministrati in allevamento alle vacche come supplemento alimentare può essere considerato uno fra i fattori che più influenzano la concentrazione di iodio nella matrice latte (*Flachowsky et al. 2014; Niero et al. 2023*). Il fabbisogno di iodio per le vacche in lattazione è pari a 0.5 mg di iodio per kg di alimento.

Sia l'alimentazione che l'acqua potabile utilizzata in allevamento presentano concentrazioni scarse di iodio che spesso non permettono di raggiungere le concentrazioni minime raccomandate per le vacche da latte (*van der Reijden et al. 2017*). Questo è in parte spiegato dal fatto che la maggior parte dei foraggi impiegati in allevamento per l'alimentazione provengono da terreni naturalmente carenti di iodio; pertanto, il suo assorbimento da parte delle radici delle piante risulta scarso (*Flachowsky et al. 2014; Niero et al. 2023*). In questo contesto, diventa essenziale integrare lo iodio tramite l'uso di miscele e integratori minerali (*Flachowsky et al. 2014; Schöne et al. 2017*). Questa integrazione risulta cruciale per prevenire carenze e mantenere la salute e le prestazioni produttive degli animali, nonché per garantire un contenuto adeguato di iodio negli alimenti di origine animale destinati al consumo umano (*Niero et al. 2023; van der Reijden et al. 2017*).

Diversi studi dimostrano come anche la composizione della dieta possa influenzare il contenuto di iodio presente nel latte: una maggiore concentrazione del minerale è presente in insilati di erbe e legumi come la soia, piuttosto che nel fieno, insilati di mais o miscele a base di cereali (*van der Reijden et al. 2017*).

1.3.2. Presenza di composti goitrogeni negli alimenti destinati alla vacca da latte

Sono considerati goitrogeni quei composti come i glucosinolati, i tiocianati o i metaboliti degli stessi che sono contenuti in alcuni alimenti per i quali è stata comprovata la capacità di interferire con il normale funzionamento della tiroide, provocandone l'ingrossamento e limitando la produzione di ormoni tiroidei (*Guerra et al. 2024; Niero et al. 2023*).

I glucosinolati o altri composti con proprietà antitiroidea, esercitano la loro funzione inibendo il trasportatore NIS, interferendo con l'ossidazione dello ioduro o con l'incorporazione degli atomi di iodio nella formulazione degli ormoni T3 e T4 (*Flachowsky et al. 2014; Niero et al. 2023*). Per tali motivi, i composti goitrogeni portano ad un minore trasferimento di iodio nel latte, il quale sarà caratterizzato da una minor concentrazione di questo elemento (*Guerra et al. 2024; Niero et al. 2023*). I composti goitrogeni sono presenti in tutti i mangimi a base brassica (colza, rape, soia, polpa di barbabietola), mentre in piante come frumento ed orzo la loro concentrazione risulta inferiore (*Flachowsky et al. 2014; van der Reijden et al. 2017*).

Inoltre, le tecniche di fermentazione sfruttate per la produzione di insilati possono contribuire a ridurre la quantità di goitrogeni, permettendo così di ottenere latte e latticini con concentrazione di iodio maggiore. In particolare, durante il processo di insilamento, la fermentazione dei foraggi che avviene da parte di alcuni batteri lattici, porta ad una diminuzione dei composti goitrogeni, i quali vengono degradati o trasformati, perdendo così la propria funzione antitiroidea (*Guerra et al. 2024; Niero et al. 2023*).

1.3.3. Tipologia di allevamento e stagionalità

Il contenuto di iodio nel latte e nei suoi derivati è influenzato dalla tipologia di allevamento. Si osserva, in particolare, una differenza significativa tra allevamenti biologici e convenzionali, con una concentrazione di iodio più elevata nel latte prodotto in questi ultimi (*van der Reijden et al. 2017*). Questa divergenza può essere spiegata dalla differenza nel tipo di alimentazione: tendenzialmente, gli allevamenti biologici utilizzano minori quantità di supplementi minerali contenenti iodio. Inoltre, in quest'ultimi la pratica di disinfezione dei capezzoli mediante l'utilizzo di disinfettanti contenenti iodio è generalmente meno frequente (*Niero et al. 2023; van der Reijden et al. 2017*). Il maggiore consumo di foraggi freschi rispetto a quelli secchi comporta,

inoltre, un aumento della presenza di composti goitrogeni, a scapito dello iodio, che viene assorbito in minor quantità per poi trasferirsi in concentrazione inferiore nel latte (*Flachowsky et al. 2014; van der Reijden et al. 2017*).

Inoltre, da alcuni studi è emerso come la concentrazione di iodio nel latte prodotto durante l'estate (stagione durante la quale in alcuni contesti gli animali possono essere allevati in contesti estensivi), sia inferiore rispetto alla concentrazione di iodio nel latte prodotto durante l'inverno (stagione durante la quale gli animali vengono allevati in stalla) (*Niero et al. 2023; Sorrenti et al. 2021*). Questa differenza è probabilmente causata da una maggiore integrazione minerale e da una minore presenza di goitrogeni nei mangimi utilizzati durante la stagione invernale, rispetto a quella estiva (*Flachowsky et al. 2014*).

1.3.4. Disinfezione dei capezzoli con prodotti contenenti iodio

L'immersione dei capezzoli della vacca da latte in soluzioni contenenti iodio è una pratica comunemente utilizzata per la pulizia e la disinfezione, nonché per prevenire la diffusione e la trasmissione di patogeni che potrebbero causare mastite (*Flachowsky et al. 2014*). L'utilizzo di questi prodotti nelle fasi che precedono e succedono la mungitura rappresenta un fattore in grado di influenzare la concentrazione dello iodio nel latte (*Niero et al. 2023*). La concentrazione di iodio nel latte viene notevolmente aumentata in relazione alla concentrazione del minerale nel disinfettante e del modo di applicazione della soluzione. In particolare, si è osservato che la concentrazione di iodio nel disinfettante, correla direttamente con il trasferimento dello stesso nel latte. Inoltre, la pratica di disinfezione della zona attraverso immersione del capezzolo nel disinfettante stesso, favorisce un maggiore trasferimento di iodio nel latte rispetto alla nebulizzazione dello stesso disinfettante per il medesimo scopo (*Flachowsky et al. 2014*).

Secondo uno studio condotto da *Conrad e Hemken (1978)*, lo iodio contenuto nei disinfettanti utilizzati nelle fasi di pre e post dipping viene assorbito a livello epiteliale, trasferito nel lume della mammella e successivamente trasferito nel latte (*Conrad, Hemken, 1978; Flachowsky et al. 2014*). Tuttavia, in ulteriori ricerche tra cui gli studi eseguiti da *Galton et al. (1984)* è emerso che i residui di iodio presenti nel latte provengono principalmente dalla contaminazione della superficie del capezzolo

piuttosto che dall'assorbimento di iodio attraverso la pelle (*Galton et al. 1984; Flachowsky et al. 2014*).

1.3.5. Trattamenti tecnologici del latte

I trattamenti tecnologici a cui viene sottoposto il latte, quali la scrematura o i trattamenti termici, possono influire sulla concentrazione di iodio. Tuttavia, gli studi condotti sino ad oggi sono stati effettuati su un basso numero di campioni, per cui sono necessarie ulteriori ricerche per confermare questi risultati (*Niero et al. 2023; van der Reijden et al. 2017*).

La letteratura non riporta significative differenze in termini di concentrazione di iodio in latte sottoposto a pastorizzazione o sterilizzazione (*van der Reijden et al. 2017; Flachowsky et al. 2014*). Ciò può essere spiegato dal fatto che lo iodio, essendo un elemento minerale inorganico, non subisce deterioramento quando sottoposto a riscaldamento. Inoltre, durante i trattamenti termici non avvengono scambi con l'esterno, per cui è lecito attendersi che non vi siano variazioni della concentrazione di iodio in latte pastorizzato o UHT (*Niero et al. 2023; Guerra et al. 2024*). Pertanto, le piccole variazioni di iodio che si registrano in campioni di latte crudo rispetto a campioni di latte sottoposti a trattamenti termici quali UHT o pastorizzazione possono considerarsi dovute ad artefatti o a differenze a livello di composizione chimica del latte, piuttosto che al trattamento termico in senso stretto (*Niero et al. 2023*).

In merito all'effetto del processo di scrematura sulla concentrazione di iodio nel latte, non sono state rilevate differenze notevoli tra latte scremato, parzialmente scremato o intero. Infatti, lo iodio è presente prevalentemente in soluzione acquosa e pertanto, anche in questo caso è lecito che il processo di scrematura non interferisca con la concentrazione del minerale nel latte. (*Niero et al. 2023; van der Reijden et al. 2017*). Durante la produzione del formaggio, una frazione dello iodio contenuto nel latte viene persa nel siero, mentre la restante parte viene trattenuta nella cagliata. Maggiore sarà il taglio della cagliata (procedura eseguita per l'ottenimento di formaggi a pasta dura), maggiore risulterà la perdita di iodio nel siero. Inoltre, è stato osservato che, nei formaggi stagionati, la concentrazione di iodio aumenta in relazione alla diminuzione dell'umidità presente. Infine, anche l'aggiunta di sale iodato, adottata nelle produzioni di molti formaggi freschi e stagionati, porta ad un aumento della concentrazione di iodio

(*van der Reijden et al. 2017*). L'utilizzo del sale iodato durante il processo di salamoia per formaggi freschi e stagionati si è rivelata una tecnica efficace per aumentare la concentrazione di iodio nel formaggio stesso. Tale incremento si è registrato principalmente in formaggi a pasta dura rispetto che in formaggi freschi (*Haldimann et al, 2019*).

1.4. Metodo di riferimento per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari

1.4.1. Spettrometria al plasma per induzione accoppiata

La spettrometria al plasma per induzione accoppiata (ICP-MS) è una tecnica analitica altamente sensibile che permette di rilevare e quantificare microelementi presenti in tracce in matrici di varia natura (*Costa et al. 2021*). Tra i principali vantaggi vi è la possibilità di eseguire un'analisi multielemento, ovvero di misurare più elementi simultaneamente in un'unica analisi (*Wilschefski et al. 2019*). Sebbene in alcuni laboratori siano ancora in uso tecniche più datate, come la spettroscopia di emissione atomica al plasma per induzione accoppiata (ICP-AES) o la spettrometria di emissione ottica al plasma per induzione accoppiata (ICP-OES), soprattutto nell'ultimo decennio si sta assistendo ad un progressivo passaggio verso l'ICP-MS, che risulta uno fra i metodi di riferimento (definiti anche "Gold standard") utilizzati per la determinazione del profilo minerale di campioni biologici, ambientali e alimentari (*Wilschefski et al. 2019*). Ad esempio, è possibile utilizzare l'ICP-MS per poter eseguire un'analisi quantitativa dello iodio presente in campioni alimentari quali latte e derivati, pesci o crostacei (*Costa et al. 2021; Wilschefski et al. 2019*).

Nel metodo ICP-MS, i campioni devono essere portati allo stato liquido per poi essere successivamente nebulizzati; l'aerosol creato, viene introdotto in una camera di nebulizzazione che permette di filtrare selettivamente le gocce di aerosol, scartando quelle più grandi. Le gocce con un diametro inferiore a 10 μm vengono trasferite al plasma, un gas ionizzato (solitamente Argon) che converte tutti gli analiti in ioni a carica singola. In seguito, un analizzatore di massa separa gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) ed infine, un rilevatore misura l'intensità dei segnali prodotti dagli elementi presenti nel campione e ne determina la concentrazione (*Lehner et al. 2021; Wilschefski et al. 2019*).

1.4.2. Applicazioni della spettrometria al plasma per induzione accoppiata per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari

Tra gli alimenti con una maggiore concentrazione di iodio i prodotti ittici quali pesci di mare, crostacei e alghe occupano un posto di rilievo.

Nello studio condotto da *Nerhus et al.* (2018) viene valutata la quantità di iodio presente in diverse specie ittiche pescate nei mari della Norvegia. Conoscere la concentrazione di iodio nei pesci pescati in queste acque risulta fondamentale per i calcoli dell'assunzione di iodio Europea, in quanto la Norvegia esporta verso l'Europa considerevoli quantità di tale alimento. Per la determinazione dello iodio nei campioni di pesce raccolti è stato utilizzato il metodo Gold standard, rappresentato dall'ICP-MS. I campioni sono stati prima omogenizzati, successivamente liofilizzati e infine portati in forma liquida per l'analisi. Lo studio ha concluso che il contenuto di iodio varia notevolmente sia tra specie ittiche, sia tra individui all'interno della specie, se pescati in periodi differenti o in aree geografiche diverse (*Nerhus et al.* 2018).

Un ulteriore studio condotto da *Eckhoff et al.* (1997) vede l'utilizzo dell'ICP-MS per quantificare lo iodio presente in pesci marini e di acqua dolce nonché in alcuni prodotti vegetali consumati nell'Africa orientale, al fine di valutare le principali fonti alimentari di iodio per la popolazione nelle rispettive aree geografiche. Dai risultati ottenuti, si può dedurre che lo iodio presente nell'acqua di mare influenza direttamente lo iodio presente nelle specie marine locali. Infatti, i pesci pescati in acque salate avevano una concentrazione di iodio circa 5-10 volte superiore rispetto alle stesse specie pescate in acque dolci, con valori di iodio intorno a 900 µg/l per i pesci di mare e 5-8 µg/l per i pesci di acqua dolce.

Infine, nel lavoro pubblicato da *Aslan et al.* (2024), in cui la tecnologia ICP-MS è stata applicata per quantificare lo iodio presente in campioni di pesce crudo e cotto, si è osservato che la concentrazione del minerale in pesci crudi risulta più elevata rispetto che nel pesce cotto; inoltre, l'ebollizione è in grado di ridurre notevolmente la quantità di iodio in quasi tutti i campioni di pesce.

1.4.3. Applicazioni della spettrometria al plasma per induzione accoppiata per la quantificazione dello iodio in latte e derivati

Latte e latticini sono tra gli alimenti più ricchi di iodio e spesso costituiscono la principale fonte di iodio in paesi in cui il prodotto ittico risulta inaccessibile per la maggior parte della popolazione per ragioni economiche, geografiche e culturali. (Nerhus et al. 2018).

La ricerca condotta da Niero et al. (2019) ha permesso di validare un protocollo rapido, affidabile e semplice, basato sull'ICP-MS, per quantificare lo iodio nel latte vaccino crudo e commerciale, nonché nel latte crudo di bufala, pecora, capra e asina. I campioni sono stati prima diluiti in una soluzione di acqua e ammoniaca 0.6 % e successivamente posti in bagno termostato a 90 °C per 1 ora, al fine di promuovere la mineralizzazione ed estrazione dello iodio. Ogni campione è stato poi filtrato, ulteriormente diluito in ammoniaca 0.6 % ed infine analizzato in ICP-MS per la quantificazione dello iodio. Dai risultati ottenuti si sono osservate concentrazioni comparabili di iodio nel latte specie ruminanti (vacca, bufala, pecora e capra). Il latte di asina, invece, aveva una concentrazione di iodio inferiore. L'analisi ha potuto inoltre confermare che differenze nella concentrazione di iodio osservabile in campioni di latte diversi, sono probabilmente dovute a fattori come l'alimentazione, la fisiologia dell'animale e la tipologia di allevamento.

Risultati simili sono stati ottenuti nello studio condotto da Nerhus et al. (2018), che ha utilizzato la tecnologia ICP-MS per la quantificazione dello iodio in campioni di latte vaccino e prodotti lattiero-caseari. I singoli campioni sono stati posti in una soluzione di idrossido di trimetilammina (TMAH) e acqua per 3 ore prima di procedere con l'estrazione dello iodio. Dall'analisi si sono osservate concentrazioni maggiori del minerale in campioni di latte ottenuto durante i mesi estivi e autunnali, rispetto a quelli prelevati in mesi invernali. Infine, è stato possibile notare come nel latte di allevamenti biologici la concentrazione di iodio sia inferiore rispetto a latte di allevamenti convenzionali. Questo perché in allevamenti biologici viene limitato l'uso di integratori minerali e preferito il pascolo all'aperto, favorendo un'assunzione di goitrogeni maggiore.

1.4.4. Limiti della spettrometria al plasma per induzione accoppiata

Seppur altamente sensibile, precisa e selettiva, la tecnologia ICP-MS richiede una strumentazione costosa e personale esperto, specializzato e dedicato (*Niero et al. 2023*). Inoltre, i tempi di preparazione dei campioni risultano piuttosto lunghi: ogni campione deve essere sottoposto ad un processo di mineralizzazione che ha lo scopo di concentrare i minerali ed eliminare la parte organica. È in tale fase che la perdita di campione ed il rischio di contaminazione risulta più elevato (*Costa et al. 2021*). Si può assumere che per 20 campioni sottoposti ad analisi ICP-MS, sono necessarie circa 3 ore per la mineralizzazione degli stessi e ulteriori 2 ore per l'analisi dei campioni e degli standard utilizzati per la costruzione della retta di calibrazione.

Per tali motivi è nata la necessità di ottenere risultati affidabili in minor tempo attraverso l'implementazione di metodi alternativi (*Niero et al. 2020*).

1.5. Metodi predittivi per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari

Tra le analisi di tipo predittivo di maggior rilievo vi sono la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS), la spettroscopia nel medio infrarosso (MIRS) e la tecnologia ai raggi X (XRF). Si tratta di tecniche rapide, non invasive e non distruttive, utilizzate spesso nell'ambito della tracciabilità alimentare per predire la composizione chimica e le proprietà fisiche di diverse matrici. Sono caratterizzate da una minore precisione nella misura rispetto ai metodi Gold standard, ma sono tuttavia metodiche pratiche e veloci, che non necessitano di preparative laboriose dei campioni, né di personale tecnico specializzato (*Holroyd et al. 2013*).

1.5.1. Spettroscopia nel vicino infrarosso e spettroscopia nel medio infrarosso

La tecnologia NIRS è considerata uno dei principali metodi analitici di routine utilizzati nell'industria alimentare. In particolare, la tecnologia NIRS sfrutta lo spettro elettromagnetico nella regione del vicino infrarosso (tra i 800 e i 2500 nm) (*De Marchi et al. 2018*). L'output di un'analisi NIRS è uno spettro, ovvero una rappresentazione dell'energia assorbita dal campione quando colpito dalla radiazione elettromagnetica (*Holroyd et al. 2013*).

La tecnologia MIRS sfrutta lo spettro elettromagnetico nella regione del medio infrarosso (tra i 2500 e i 25000 nm) (*De Marchi et al. 2018*). Viene comunemente utilizzata per predire la composizione chimica di matrici alimentari e biologiche di natura liquida o fluida, come latte, olio, sangue, siero e urine (*De marchi et al. 2014*).

L'utilizzo di strumenti che basano il loro funzionamento sulla spettroscopia NIR o MIR prevede la cosiddetta fase di calibrazione a partire dai dati di riferimento (ottenuti con metodo Gold Standard) e dai dati spettrali (ottenuti mediante analisi spettroscopica). La fase di calibrazione è necessaria per verificare se lo strumento di predizione è accurato nelle sue misurazioni ed è durante tale fase che si confrontano i valori predetti dallo strumento con tecnologia NIR o MIR, con i valori ottenuti attraverso il metodo di riferimento. Successivamente allo sviluppo e alla valutazione della calibrazione, lo strumento potrà essere utilizzato per predire la composizione del campione incognito con un certo livello di accuratezza (*Cozzolino et al. 2021*). Esempi di strumenti che implementano la tecnologia NIR sono il Foodscan (FOSS Electric A/S, Hillerød,

Denmark), che opera nella regione tra 850 nm e 1050 nm con intervallo di scansione di 2 nm, il DS2500 (FOSS Electric A/S, Hillerød, Denmark), che esegue scansioni nella regione tra 400 nm e 2499.5 nm con intervallo di scansione di 0.5 nm e lo SCiO (Consumer Physics, Israel), che opera nella regione tra 740 nm e 1070 nm con intervallo di scansione di 1 nm. Sono strumenti utilizzati su matrici solide o semi-solide.

Un esempio di strumento che basa il suo funzionamento sulla tecnologia MIRS è il MilkoScan (FOSS Electric A/S, Hillerød, Denmark), utilizzato in particolare per l'analisi chimica della composizione di campioni di latte, ma anche di altre matrici di natura liquida.

1.5.2. Analisi mediante spettroscopia nel medio infrarosso per la quantificazione dello iodio in matrici alimentari

La tecnologia MIR è ampiamente utilizzata nelle industrie lattiero-casearie per la valutazione della qualità del latte (*De marchi et al. 2018*). Nello studio condotto da *De Marchi et al. (2014)* viene dimostrato un potenziale utilizzo della tecnologia MIRS per predire tratti fenotipici del latte di rilevanza economica come la composizione degli acidi grassi e proteine, il contenuto minerale o l'acidità. Dall'analisi condotta, si è dimostrata la capacità di strumenti che implementano la tecnologia MIRS di predire questi tratti con diverso grado di accuratezza e ampi margini di miglioramento nelle equazioni di previsione.

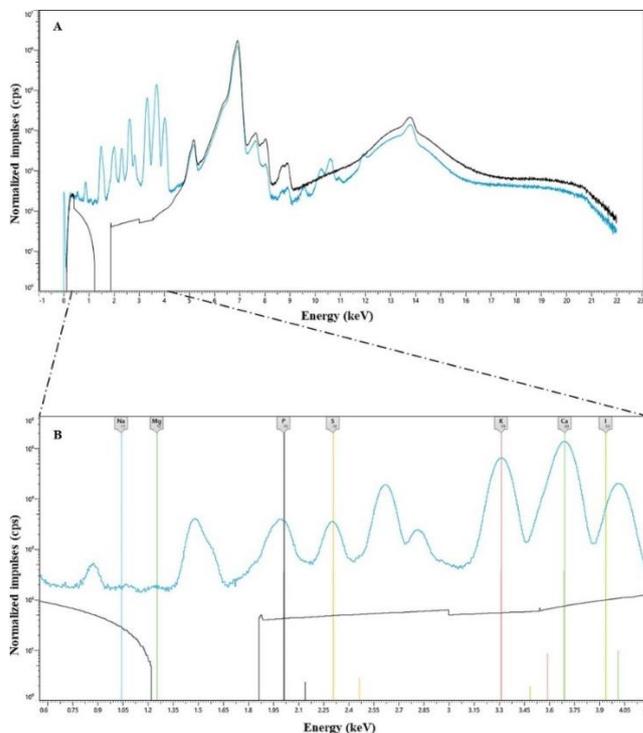
L'utilizzo del MIRS per la predizione dello iodio in campioni di latte è stato inoltre valutato nello studio condotto da *Niero et al (2020)*. In particolare, campioni di latte individuale sono stati prima analizzati con ICP-MS e successivamente con Milkoscan FT6000, che implementa la tecnologia MIRS e permette di ottenere gli spettri dei medesimi campioni. I risultati ottenuti non sono stati sufficienti per validare il modello di previsione MIRS; pertanto, il modello di predizione non può sostituire l'analisi di riferimento. Serviranno pertanto ulteriori studi ed un numero di campioni più elevato per ottenere dei risultati più soddisfacenti.

1.5.3. Principi e utilizzo della tecnologia ai raggi X per la quantificazione dello iodio in matrici lattiero-casearie

La tecnologia XRF si è affermata negli ultimi decenni come una metodica pratica, rapida ed economica utilizzabile in diversi campi di applicazione (*Pashkova et al. 2018*). L'analisi può essere effettuata in dispersione di lunghezza d'onda (WD) o in dispersione di energia (ED). Nel caso di analisi WD-XRF la tecnica viene considerata distruttiva in quanto il campione subisce un processo di macinazione al fine di ottenere un pellet da sottoporre ad analisi. Nel caso di analisi ED-XRF, invece, la tecnica viene considerata non distruttiva poiché il campione è normalmente analizzato tal quale (*Acquafredda, 2019*).

Sia il WD-XRF che l'ED-XRF presentano due componenti base: la sorgente di eccitazione e il sistema di rilevamento. Il campione viene irradiato con i raggi X, che ne inducono l'emissione di fluorescenza. Quest'ultima viene raccolta dal rilevatore in modo proporzionale alla quantità di elemento presente nel campione. Ogni elemento ha livelli di energia discreti (ad esempio, dipendenti dall'energia dell'elettrone) in modo che la radiazione emessa sia caratteristica per l'elemento specifico. Viene creato uno spettro con picchi distinti per ogni elemento presente nel campione e le aree dei picchi determinano l'intensità; è necessaria poi una fase di calibrazione per correlare l'intensità alle concentrazioni effettive degli elementi (*Brouwer, 2003*). In Figura 1A è possibile osservare un tipico spettro ottenuto con ED-XRF. La linea blu rappresenta lo spettro ED-XRF di un campione di latte, mentre la linea nera raffigura lo spettro ED-XRF di un campione di acqua. Nella Figura 2B si osserva una porzione ingrandita dello spettro per mostrare i picchi correlati ad alcuni elementi minerali presenti nel latte.

Figura 2A. Spettro di un campione di latte (linea blu) ottenuto con la tecnologia ai raggi X e un campione di acqua (linea nera); **Figura 2B.** Porzione ingrandita dello spettro di un campione di latte ottenuto con la tecnologia ai raggi X, che mostra i picchi associati a elementi minerali (*Visentin et al, 2023*).



Tuttavia, la tecnologia XRF presenta anche alcuni svantaggi. Il primo consiste nella sua scarsa sensibilità per la determinazione dei microelementi (ad esempio cromo, molibdeno, selenio e iodio) o di elementi contaminanti in materie prime, alimenti e nei prodotti finiti. Il secondo, consiste nella sua totale dipendenza dai metodi di riferimento per la calibrazione, la validazione e il progressivo monitoraggio delle performance di predizione (*Pashkova et al. 2018; Fiamegos, de la Calle Guntiñas. 2018*).

Nel contesto della tracciabilità alimentare, la tecnologia XRF viene ampiamente utilizzata per eseguire analisi su latte e prodotti lattiero-caseari al fine di quantificare simultaneamente minerali e oligoelementi, valutare il valore nutrizionale e monitorare la qualità del latte e derivati (*Pashkova et al. 2018*).

Nella ricerca svolta da *Visentin et al. (2023)* è stato utilizzato l'ED-XRF per predire la concentrazione di iodio nel latte non liofilizzato. Durante la fase di calibrazione dello strumento sono stati presi in considerazione 20 campioni per ottenere la retta di regressione tra la concentrazione di iodio ottenuta tramite ICP-MS e i valori di iodio

predetti da ED-XRF. Per valutare l'accuratezza del metodo è stato utilizzato il coefficiente di determinazione ottenuto durante la fase di calibrazione (R^2_{CV}), eseguito sull'intero set di dati (56), ed il coefficiente di determinazione in validazione esterna (R^2_{EV}), eseguito escludendo i campioni utilizzati in calibrazione (20) e considerando solo i campioni rimanenti (36). L' R^2_{CV} è risultato pari a 0.60, mentre R^2_{EV} è risultato pari a 0.45. I risultati indicano che la tecnica ED-XRF ha una moderata accuratezza nella previsione della concentrazione di iodio nel latte.

Lo studio ha permesso di concludere che la tecnica ED-XRF non può sostituire il metodo Gold standard, ma che la stessa tecnologia può essere utilizzata da aziende lattiero-casearie come strumento decisionale per la discriminazione di lotti di latte con alta o bassa concentrazione di iodio.

2. OBIETTIVO DELL'ELABORATO

Lo iodio è un microelemento essenziale per la salute umana, in particolare per la funzionalità e fisiologia della tiroide. L'uomo assume lo iodio esclusivamente attraverso la dieta e tra gli alimenti più ricchi di iodio vi sono il latte ed i prodotti lattiero caseari.

Lo scopo di questo elaborato di tesi è quello di quantificare lo iodio in matrici lattiero-casearie (latte vaccino, yogurt e ricotta) sia con metodo di riferimento ICP-MS, che con la tecnologia XRF, quale metodica predittiva alternativa.

L'accuratezza della tecnologia XRF nella predizione dello iodio in latte e latticini è stata valutata confrontando i risultati ottenuti dall'applicazione del metodo di riferimento con i risultati ottenuti dall'applicazione del metodo predittivo.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campionamento

I campioni di latte, yogurt e ricotta sono stati acquistati in diversi punti vendita della grande distribuzione organizzata, collocati nelle provincie di Padova e Venezia. Sono stati raccolti un totale di 18 campioni di latte, 14 campioni di yogurt bianco e 13 campioni di ricotta. Il latte acquistato comprendeva 3 campioni di latte intero pastorizzato e 2 di latte intero UHT; 3 campioni di latte scremato UHT; 5 campioni di latte parzialmente scremato pastorizzato e 5 di latte parzialmente scremato UHT. Tra i campioni di yogurt, 7 campioni erano yogurt bianco prodotto con latte intero e 7 erano di yogurt bianco magro prodotto con latte parzialmente scremato.

Alcuni campioni di latte, yogurt e ricotta, seppur appartenenti a marchi differenti, sono stati prodotti nello stesso stabilimento. In particolare, tra i campioni di latte sono stati rilevati 13 stabilimenti di produzione differenti; tra i campioni di yogurt si distinguono 5 stabilimenti di produzione diversi; mentre i campioni di ricotta provenivano da 8 distinti stabilimenti di produzione.

Sono state prelevate delle aliquote pari a 10 ml per ogni campione di latte e 10 g per ciascun campione di ricotta e yogurt. Le aliquote sono state poste in Falcon da 50 ml e mantenute a temperatura refrigerata (4 °C) fino al momento dell'analisi, la quale è stata effettuata pochi giorni successivi al campionamento, avendo cura di non superare la data di scadenza riportata in ogni campione.

3.2. Analisi mediante spettrometria al plasma per induzione accoppiata

3.2.1. Mineralizzazione dei campioni

L'estrazione dello iodio da latte, yogurt e ricotta è stata effettuata presso il laboratorio del Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse Naturali, Animali e Ambiente dell'Università di Padova (Legnaro, Italia).

I campioni sono stati portati a temperatura ambiente, omogenizzati attraverso inversione e diluiti con una soluzione di ammoniaca 0.6 % in rapporto 1:24 in provette di plastica monouso da 50 ml. La miscela è stata quindi incubata in un bagnetto termostato a 90 °C

per 1 ora al fine di favorire l'estrazione dello iodio. Successivamente, i campioni sono stati raffreddati e sottoposti ad un processo di filtrazione. Si è utilizzato un filtro per siringa da 0.45 μm per filtrare 5 ml di soluzione, che è stata a sua volta diluita con ulteriori 5 ml (rapporto 1:1) di soluzione di ammoniaca 0.6 %.

In seguito, i campioni mineralizzati sono stati inviati per l'analisi ICP-MS presso il laboratorio Eurolab s.r.l. (Bassano del Grappa, Italia).

3.2.2. Quantificazione dello iodio mediante spettrometria al plasma per induzione accoppiata

La quantificazione dello iodio è stata eseguita con analizzatore ICP-MS (Spectro MS, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Germania). Prima di ogni analisi è stata allestita una nuova retta di calibrazione composta da sei punti, utilizzando sei standard a concentrazione nota crescente (0, 1, 10, 20 e 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), con un coefficiente di determinazione (R^2) ≥ 0.99 .

A tutti i campioni e alle soluzioni standard di iodio sono stati aggiunti 10 μL di soluzione di rodio (1 mg/kg) come standard interno, per far fronte alla sottostima dovuta alle perdite dell'elemento target. Le impostazioni dello strumento, i parametri chimico-fisici adottati per le analisi ICP-MS sono riportati in Tabella 2. All'inizio di ogni analisi viene eseguita la lettura di due campioni spiked, ovvero campioni a cui è stato aggiunto una quantità nota di analita, a conferma dell'accuratezza delle analisi. Dopo l'analisi di 10 campioni lo strumento esegue una lettura del bianco (composto da ammoniaca 0.6 %), una lettura del punto più basso della retta di calibrazione, del punto medio della retta di calibrazione ed un'ulteriore lettura di un bianco al fine di evitare il trascinarsi di tracce di iodio nelle analisi seguenti. Per ogni campione vengono eseguite tre letture, e la concentrazione di iodio finale è data dalla media dei tre valori ottenuti. Lo strumento impiega circa 3 minuti per l'analisi di un singolo campione.

Tabella 2. Impostazioni dei parametri della spettrometria al plasma per induzione accoppiata, per la rilevazione e quantificazione dello iodio in matrici lattiero-casearie.

Parametri	Impostazioni
Potenza	1.425 W
Portata del gas di raffreddamento	12 L/min
Portata del gas ausiliario	1.2 L/min
Portata del nebulizzatore	0.92 L/min
Velocità di aspirazione del campione	1 mL/min
Cono del campione	Nickel
Camera di nebulizzazione	Cyclonic (con deflettore)
Torcia al plasma	tubo iniettore da 1,5 mm in quarzo
Intervallo di base/tempo di integrazione	20 ms/30 s
Repliche tecniche	5

3.3. Analisi mediante tecnologia ai raggi X

Per l'analisi XRF i campioni di latte, yogurt e ricotta non hanno subito alcun trattamento preliminare. I campioni sono stati analizzati utilizzando lo strumento XRF Spectro Xepos 5C (Ametek, Kleve, Germania), dotato di un anodo nel tubo a raggi X composto da una lega di palladio e cobalto (65:35). Le impostazioni dello strumento includevano una tensione di 50 keV e una corrente di 2 mA. La quantificazione dello iodio è stata effettuata basandosi sulla linea spettrale I L- α (3.94 keV), sfruttando il potenziale specifico dell'anodo nel tubo a raggi X di Pd e Co. Le analisi sono state svolte presso il Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse Naturali, Animali e Ambiente dell'Università di Padova (Legnaro, Italia). Sono stati pesati 5 g di campione, poi posti in appositi supporti di plastica con diametro 32 mm e altezza 24 mm, composti da un filtro di polipropilene, due cilindri e un tappo di plastica. In seguito, i campioni pesati e collocati nei rispettivi supporti sono stati posizionati nella camera XRF, in particolare in un autocampionatore composto da 12 posizioni totali. Prima dell'inizio dell'analisi sono state fornite allo strumento informazioni sul campione come il tipo di matrice ed il suo

peso esatto. Queste informazioni risultano rilevanti in quanto l'accuratezza dello strumento dipende molto dall'uniformità e dalla quantità di materiale che i raggi X devono attraversare. Una volta posizionati i primi dodici campioni e definito il metodo, si dava inizio all'analisi. Lo strumento impiega circa un'ora e mezza per acquisire gli spettri di dodici campioni.

3.4. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state condotte per valutare l'accuratezza delle predizioni effettuate con lo strumento XRF rispetto ai dati misurati mediante ICP-MS.

La fase calibrazione dello strumento XRF è stata eseguita utilizzando l'intero set di campioni ($n = 45$). Gli spettri XRF dei campioni sono stati processati mediante algoritmo chemometrico basato sull'effetto Compton, implementato nel software dello strumento XRF Analyzer Pro (Ametek, Kleve, Germania). Questa fase preliminare ha permesso di giungere ai dati relativi le concentrazioni di iodio predetti con lo strumento XRF. È stato creato un diagramma a dispersione tra la concentrazione di iodio ottenuta con ICP-MS e quella predetta con lo strumento XRF. L'accuratezza del modello è stata espressa tramite il coefficiente di determinazione in calibrazione (R^2_{CAL}).

A partire dal database complessivo, i campioni inclusi nella fase di cross-validazione sono stati selezionati per ottenere la maggiore variabilità di concentrazione di iodio. Sono stati presi in considerazione il 70 % del totale dei campioni ($n = 33$). Gli spettri XRF dei campioni sono stati processati attraverso un algoritmo chemometrico che si basa sull'effetto Compton, implementato nel software dello strumento XRF Analyzer Pro (Ametek, Kleve, Germania). Ciò ha permesso di acquisire i dati relativi le concentrazioni di iodio predetti con lo strumento XRF. Successivamente, è stato costruito un diagramma a dispersione ponendo a confronto i valori di concentrazione di iodio ottenuti con ICP-MS e quelli predetti dallo strumento XRF. L'accuratezza del metodo XRF nella quantificazione dello iodio è stata espressa tramite coefficiente di determinazione in cross-validazione (R^2_{CROSS}).

Nella fase di validazione esterna sono stati utilizzati i campioni esclusi dalla precedente fase di cross-validazione ($n = 12$). La concentrazione di iodio di questi campioni è stata predetta utilizzando il modello ottenuto in fase di cross-validazione. È stato così

costruito un diagramma a dispersione che mette in relazione i valori di concentrazione di iodio dei campioni analizzati con ICP-MS e quelli predetti dall'XRF. L'accuratezza del metodo XRF nella quantificazione dello iodio è stata espressa tramite il coefficiente di determinazione in validazione esterna (R^2_{VAL}).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Statistiche descrittive

Le statistiche descrittive per la concentrazione di iodio nei campioni di latte, yogurt e ricotta analizzati con ICP-MS sono riportate in Tabella 3. La concentrazione media di iodio nei campioni di latte ($n = 18$) è pari a $236.11 \mu\text{g/Kg}$ con una deviazione standard (DS) di $141.80 \mu\text{g/Kg}$ e un coefficiente di variazione (CV) del 60.06% . Suddividendo i medesimi campioni in base ai trattamenti tecnologici di scrematura, pastorizzazione e sterilizzazione, si nota che il latte pastorizzato parzialmente scremato contiene in media la più alta concentrazione di iodio; infatti, la quantità media di iodio rilevata risulta essere di $327 \mu\text{g/Kg}$ (DS = $228.97 \mu\text{g/Kg}$; CV = 70.02%). La solubilità dello iodio in acqua, unita al fatto che nel latte parzialmente scremato la frazione acquosa è relativamente maggiore rispetto al latte intero, spiega l'elevata concentrazione di iodio riscontrata nei campioni di latte parzialmente scremato. Inoltre, ciò giustifica i valori di iodio significativamente più bassi osservati nel latte intero rispetto a quello parzialmente scremato, in quanto, a causa di un più elevato contenuto di grassi, esso presenta una frazione solubile inferiore, che riduce di conseguenza la proporzione della fase acquosa e limitando così la solubilità dello iodio. (Niero *et al.* 2017). Le concentrazioni di iodio osservate nel presente lavoro di tesi sono inferiori rispetto a quelle riportate nello studio di Visentin *et al.* (2023), che ha valutato l'accuratezza della metodologia XRF nella predizione dello iodio in latte vaccino individuale. Questa discrepanza può essere giustificata dal fatto che nel lavoro di Visentin *et al.* (2023) sono stati utilizzati campioni di latte crudo individuale provenienti da diverse aziende agricole (con diversi regimi di alimentazione e diversi livelli di integrazione di iodio) e da differenti razze di vacca da latte; queste condizioni di campionamento sono state adottate con il fine di ottenere una elevata variabilità tra i campioni riguardo la concentrazione di iodio, in modo tale da migliorare la robustezza dei modelli di predizione XRF. Al contrario, nel presente studio sono stati utilizzati campioni di latte commerciale pastorizzato o UHT, sottoposti quindi a processi di standardizzazione industriale. Confrontando i risultati ottenuti con quelli riportati nello studio di Niero *et al.* (2019) nel quale è stato validato un metodo Gold Standard per la quantificazione dello iodio nel latte di diverse specie, si rilevano valori

comparabili per la concentrazione di iodio nel latte parzialmente scremato pastorizzato. I valori di concentrazione di iodio ottenuti nel presente lavoro di tesi risultano superiori rispetto a quelli pubblicati da *Walther et al.* (2018), che ha valutato la concentrazione di iodio in campioni di latte svizzero convenzionale e biologico, prima e dopo il trattamento termico ad alta temperatura. Nei 4 diversi lotti di latte convenzionale analizzati, la concentrazione di iodio era compresa tra 101 e 113 $\mu\text{g/l}$; dopo essere stati sottoposti a trattamento termico i valori di iodio per i medesimi campioni analizzati variavano tra 101 e 115 $\mu\text{g/l}$, confermando che il trattamento termico non causa variazioni significative nella concentrazione di iodio.

La concentrazione media di iodio nei campioni di yogurt ($n = 14$) risulta essere di 246.79 $\mu\text{g/Kg}$, con una DS di 72.67 $\mu\text{g/Kg}$ e un CV del 29.45 %. Dall'analisi dei dati raccolti, i campioni di yogurt magro mostrano una maggiore quantità di iodio rispetto ai campioni di yogurt intero. In particolare, la concentrazione media di iodio è 255.71 $\mu\text{g/Kg}$ (DS = 79.03 $\mu\text{g/Kg}$; CV = 30.91 %) nei 7 campioni di yogurt magro, mentre è di 237.86 $\mu\text{g/Kg}$ (DS = 64.47 $\mu\text{g/Kg}$; CV = 27.10 %) nei 7 campioni di yogurt intero. È possibile spiegare questa differenza in termini di concentrazione di iodio considerando che lo yogurt magro è ottenuto a partire da latte parzialmente scremato, il quale, a seguito del processo di scrematura, contiene una maggiore concentrazione di iodio nella frazione solubile del latte rispetto al latte intero. I valori di iodio osservati nel presente studio sono superiori rispetto ai risultati ottenuti nei lavori di *Nerhus et al* (2018) e *Dahl et al* (2003). Lo scopo del lavoro svolto da *Nerhus et al* (2018) è stato quello di quantificare lo iodio in diversi prodotti lattiero caseari della Norvegia. In particolare, sono stati valutati i livelli di iodio in campioni di yogurt intero ($n = 3$) e yogurt con aggiunta di aromi naturali ($n = 3$); la concentrazione di iodio media nei campioni di yogurt naturale è risultata di 180 $\mu\text{g/l}$, mentre in quelli con aggiunta di aromi era pari a 130 $\mu\text{g/l}$. Nella ricerca condotta da *Dahl et al* (2003), invece, sono stati analizzati 5 campioni di yogurt intero e la concentrazione di iodio rilevata nei medesimi era di 147 $\mu\text{g/l}$, con un range di concentrazioni tra 115 e 179 $\mu\text{g/l}$. Ulteriori ricerche per quanto concerne la quantificazione dello iodio in yogurt sono state presentate da *Bruhn et al* (1982) e *Abd El Aziz et al* (2012). Nel primo studio è stata valutata la concentrazione di iodio in un totale di 20 campioni di yogurt attraverso elettrodi iono-selettivi. Nel secondo studio, invece, è stata valutata la concentrazione di iodio attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro accoppiato a diverse metodologie di

estrazione dello iodio. In Entrambi gli studi la concentrazione di iodio risulta superiore, se confrontata con i dati riportati nel presente elaborato di tesi.

Per quanto riguarda i campioni di ricotta ($n = 13$), la concentrazione media di iodio risulta pari a $246.15 \mu\text{g/Kg}$, con DS di $56.71 \mu\text{g/Kg}$ e CV di 23.04% . Il valore medio ottenuto risulta più elevato rispetto a quello riportato da *Nerhus et al.* (2018), che, analizzando un set di 3 campioni di ricotte, ha trovato una concentrazione media di iodio di $150 \mu\text{g/l}$. Nell'analisi svolta da *Bruhn et al.* (1982), in cui si ha una distinzione tra ricotte ottenute con basso contenuto di grassi e ricotte convenzionali, si osservano invece, quantità di iodio notevolmente superiori in tutte le diverse categorie rispetto ai risultati del presente studio, con valori compresi tra 380 e $325 \mu\text{g/l}$.

Tabella 3. Statistiche descrittive del contenuto di iodio ($\mu\text{g}/\text{Kg}$) in diversi tipi di latte vaccino, yogurt e ricotta.

Matrice	n	Media	¹DS	²CV, %	Minimo	Massimo
Latte	18	236.11	141.80	60.06	90.00	765.00
Intero pastorizzato	3	156.66	80.55	51.42	90.00	270.00
Intero UHT	2	235.00	5.00	2.13	230.00	240.00
Parzialmente scremato pastorizzato	5	327.00	228.97	70.02	140.00	765.00
Parzialmente scremato UHT	5	216.00	49.44	22.89	160.00	285.00
Scremato UHT	3	198.33	22.48	11.34	170.00	225.00
Parzialmente scremato senza lattosio pastorizzato	2	207.50	57.50	27.71	150.00	265.00
Parzialmente scremato senza lattosio UHT	1	265.00	-	-	265.00	265.00
Yogurt	14	246.79	72.67	29.45	155.00	430.00
Intero	7	237.86	64.47	27.10	155.00	345.00
Magro	7	255.71	79.03	30.91	190.00	430.00
Magro senza lattosio	2	255.00	90.00	35.29	165.00	345.00
Ricotta	13	246.15	56.71	23.04	125.00	330.00
Tradizionale	9	240.56	55.80	23.20	125.00	330.00
Senza lattosio	4	258.75	56.72	21.92	200.00	325.00
Totale	45	242.33	103.15	42.57	90.00	765.00

¹DS = deviazione standard; ²CV = coefficiente di variazione

4.2. Calibrazione della strumentazione ai raggi X

Il diagramma di dispersione in riferimento alla fase di calibrazione dello iodio nei campioni di latte, yogurt e ricotta è rappresentato in Figura 3A. Tale fase è necessaria per valutare l'accuratezza dello strumento nel predire le concentrazioni di iodio in matrici lattiero-casearie. Il modello è stato implementato utilizzando tutti i 45 campioni di latte, yogurt e ricotta disponibili. Nel grafico, sull'asse x, sono riportate le concentrazioni di iodio misurato tramite ICP-MS ($\mu\text{g}/\text{Kg}$), mentre sull'asse y sono indicate le concentrazioni di iodio predette dallo strumento XRF ($\mu\text{g}/\text{Kg}$).

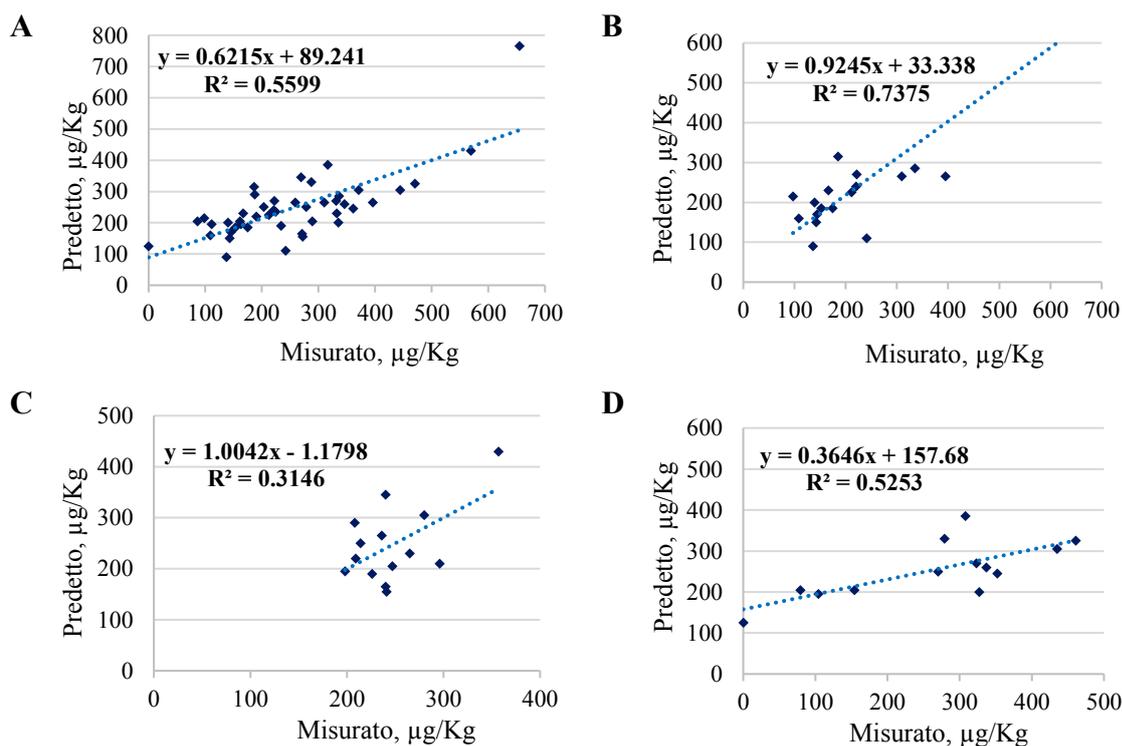
L' R^2_{CAL} è risultato pari a 0.56 (Tabella 4), un valore sensibilmente inferiore rispetto a quello riportato nel lavoro svolto da *Visentin et al.* (2023), che ha valutato l'efficacia dell'XRF nella predizione della quantità di iodio in campioni di latte crudo individuale non liofilizzato ($R^2 = 0.88$). *Visentin et al.* hanno ottenuto un R^2 più elevato rispetto a quanto osservato in questo studio grazie all'utilizzo di campioni di latte crudo individuale, che hanno permesso di ottenere una maggiore variabilità nella concentrazione di iodio. Al contrario, nel presente studio sono stati utilizzati campioni di latte commerciale, i quali presentano una minore variabilità nella concentrazione dello iodio. Un risultato migliore rispetto all' R^2 ottenuto nel presente elaborato di tesi è riportato nel lavoro svolto da *Niero et al.* (2020), in cui il MIRS è stato utilizzato per stimare la quantità di iodio in latte crudo bovino ($R^2 = 0.65$ e 0.69). Tuttavia, l' R^2 ottenuto in questo studio risulta superiore a quello riportato da *Visentin et al.* (2023), in cui è stata valutata la capacità dell'XRF nel predire la concentrazione di alcuni elementi minerali nel latte.

In seguito alla fase di calibrazione, i campioni sono stati suddivisi nelle rispettive categorie, sulla base della matrice alimentare: 18 campioni di latte, 14 di yogurt e 13 di ricotta. Per ciascuna categoria, è stato realizzato un diagramma di dispersione (Figura 4A, B, C) che mette in relazione la concentrazione di iodio misurata con ICP-MS (asse x) e la concentrazione dello stesso predetta dall'XRF (asse y). L' R^2 ottenuto risulta pari a 0.74 per il latte (Figura 4A), 0.31 per lo yogurt (Figura 4C) 0.53 per la ricotta (Figura 4D). I valori di R^2 suggeriscono una moderata accuratezza dello strumento XRF nel predire le concentrazioni di iodio in matrici lattiero-casearie come latte, yogurt e ricotta. I valori di R^2 ottenuti risultano inferiori rispetto a quelli riportati nello studio di *Visentin*

et al (2023). Tuttavia, l' R^2 ottenuto per i campioni di latte è simile a quello riportato nella ricerca svolta da *Niero et al* (2020).

La ridotta numerosità campionaria di tale elaborato di tesi incide, inoltre, sulla robustezza dei risultati ottenuti e rende difficile procedere con una valida fase di validazione dei dati. Occorrerà aumentare la numerosità campionaria per ogni matrice presa in considerazione per aumentare la robustezza dei modelli ed ottenere risultati più accurati.

Figura 3. Diagramma a dispersione in calibrazione per la concentrazione di iodio misurata con spettrometria al plasma per induzione accoppiata ($\mu\text{g}/\text{Kg}$; asse x) rispetto alla concentrazione di iodio predetta dalla tecnologia ai raggi X ($\mu\text{g}/\text{Kg}$, asse y) in latte, yogurt e ricotta (A) ed entro le singole matrici di latte (B), yogurt (C) e ricotta. (D).



4.3. Cross validazione e validazione esterna della strumentazione ai raggi X

Il set di dati completo è stato suddiviso in due subset: il 70 % dei campioni ($n = 33$) è stato utilizzato nella fase di cross-validazione. I campioni selezionati sono stati scelti per rappresentare il più ampio intervallo possibile di concentrazioni di iodio nelle matrici alimentari. La Figura 4A mostra il diagramma a dispersione ottenuto in questa fase e la correlazione tra le concentrazioni di iodio misurate tramite ICP-MS (asse x) e quelle predette dallo strumento XRF (asse y).

Infine, il modello ottenuto nella fase di cross-validazione è stato utilizzato in fase di validazione esterna per predire i valori di iodio dei campioni esclusi dalla precedente fase di cross-validazione ($n = 12$). In Figura 4B, i valori misurati con ICP-MS sono riportati sull'asse x, mentre i valori predetti dell'XRF sono riportati sull'asse y. Questo grafico serve a valutare la capacità del modello nel predire le concentrazioni di iodio e fornisce un'indicazione circa le performance del modello su dati esclusi dalla fase di cross-validazione. L' R^2_{CROSS} e l' R^2_{VAL} sono risultati pari a 0.64 e 0.46 rispettivamente (Tabella 4). La ratio performance to deviation (RPD) è risultata pari a 2.61 (Tabella 4); secondo *Grelet et al* (2021), con valori di RDP superiori a 2, è possibile considerare il metodo predittivo affidabile per analisi predittive e utilizzabile routinariamente durante le fasi di screening. I risultati evidenziano una moderata capacità del modello di predire i valori di iodio contenuto in matrici lattiero-casearie. Tuttavia, sono presenti limiti significativi in termini di accuratezza dello strumento, accentuata inoltre dalla limitata numerosità campionaria.

I risultati ottenuti sono simili a quelli riportati nello studio condotto da *Visentin et al* (2023), in cui sono stati utilizzati campioni di latte bovino liofilizzato per verificare la capacità predittiva dell'XRF nella quantificazione dello iodio ($R^2 = 0.60$ in fase di cross-validazione e $R^2 = 0.45$ in fase di validazione esterna). Risultati simili sono stati ottenuti nel lavoro svolto da *Niero et al* (2020), i quali, utilizzando due algoritmi diversi, hanno riportato un R^2 pari a 0.51 e 0.60 in fase di cross-validazione e un R^2 pari a 0.47 e 0.57 in fase di validazione esterna. Risultati migliori sono stati ottenuti da *Perring et al.* (2003), che hanno utilizzato la tecnologia XRF per predire la concentrazione di minerali nel latte liofilizzato.

Figura 4. Diagramma a dispersione in cross-validazione (A) e validazione esterna (B) per la concentrazione di iodio misurata con spettrometria al plasma per induzione accoppiata ($\mu\text{g}/\text{Kg}$; asse x) rispetto alla concentrazione di iodio predetta dalla tecnologia ai raggi X ($\mu\text{g}/\text{Kg}$, asse y) in latte, yogurt e ricotta.

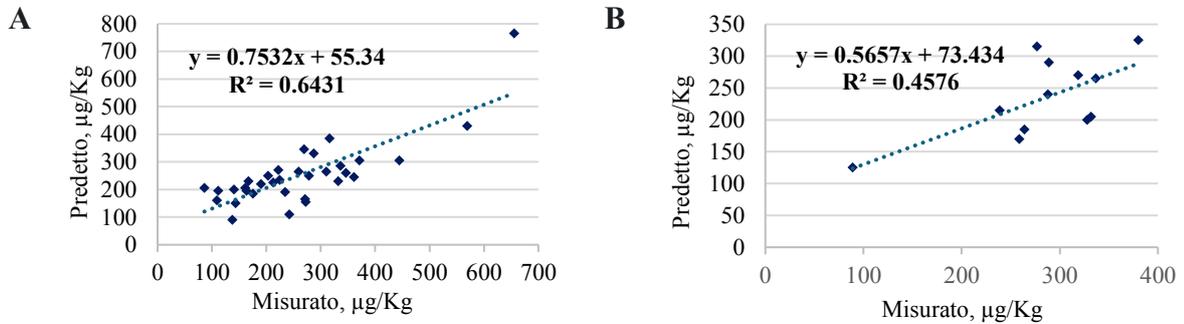


Tabella 4. Confronto delle statistiche calcolate nella fase di calibrazione, cross-validazione e validazione esterna.

	Calibrazione		Cross-validazione		Validazione esterna		
	$^1R^2_{\text{CAL}}$	^2SE	$^3R^2_{\text{CROSS}}$	^2SE	$^4R^2_{\text{VAL}}$	^2SE	^5RPD
Iodio	0.56	70.51	0.64	71.33	0.46	47.16	2.61

$^1R^2_{\text{CAL}}$ = Coefficiente di determinazione in calibrazione; ^2SE = Errore standard;

$^3R^2_{\text{CROSS}}$ = Coefficiente di determinazione in cross-validazione; $^4R^2_{\text{VAL}}$ = Coefficiente di determinazione in validazione esterna; ^5RPD = Ratio Performance Deviation.

5. CONCLUSIONI

Nel presente elaborato di tesi è stata valutata l'accuratezza della tecnologia predittiva XRF nella quantificazione dello iodio presente in latte, yogurt e ricotta. Le concentrazioni di iodio predette dallo strumento XRF sono state confrontate con i risultati ottenuti attraverso l'analisi dei medesimi campioni con il metodo Gold standard, rappresentato dall'ICP-MS.

I risultati ottenuti mostrano che la tecnologia XRF presenta una moderata accuratezza nella predizione della concentrazione di iodio in matrici lattiero casearie ($R^2_{\text{CROSS}} = 0.64$; $R^2_{\text{VAL}} = 0.46$) Inoltre, l'RPD ottenuto indica che i modelli sono potenzialmente adeguati per una fase di screening preliminare dei campioni (RPD = 2.61).

Sebbene l'XRF non possa sostituire il metodo Gold standard a causa della sua bassa sensibilità e precisione nella determinazione della concentrazione di iodio nei prodotti lattiero-caseari, esso potrebbe essere utilizzato per discriminare lotti di prodotti con bassi o alti livelli di iodio. Sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche e un incremento della numerosità campionaria per migliorare l'accuratezza dei modelli di previsione basati sull'XRF.

BIBLIOGRAFIA

- Abd El Aziz M, Abo El Enien K. 2012. Comparative study between spectrophotometric and hplc methods used for iodine extraction in milk and some dairy products. *Journal of Food and Dairy Sciences*. 3:247-258.
- Acquafredda P. 2019. XRF technique. *Physical Sciences Reviews*. 8:2018171.
- Aslan Çin NN, Yüce M, Özçelik AÖ. 2024. The iodine content of raw, boiled, pan-fried, and oven-baked fish samples using ICP-MS: analysis and reliability of measurements. *International Journal of Food Science & Technology*. 59:3226-3234.
- Brouwer P. 2003. *Theory of XRF: Getting Acquainted with the Principles*. PANalytical, Almelo, the Netherlands.
- Bruhn JC, Franke AA, Bushnell RB, Weisheit H, Hutton GH, Gurtle GC. 1983. Sources and Content of Iodine in California Milk and Dairy Products. *Journal of Food Protection*. 46:41-46.
- Conrad LM, Hemken RW. 1978. Milk Iodine as Influenced by an Iodophor Teat Dip. *Journal of Dairy Science*. 61:776-780.
- Costa A, Niero G, Franzoi M, Cassandro M, Marchi MD, Penasa M. 2021. Short communication: Iodine content in bovine milk is lowly heritable and shows limited genetic variation. *Journal of Dairy Science*. 104:3292-3297.
- Cozzolino D. 2021. The Ability of Near Infrared (NIR) Spectroscopy to Predict Functional Properties in Foods: Challenges and Opportunities. *Molecules*. 26:6981.
- Dahl L, Opsahl JA, Meltzer HM, Julshamn K. 2003. Iodine concentration in Norwegian milk and dairy products. *British Journal of Nutrition*. 90:679-685.
- Decreto 9 luglio 2012 n. 183. Modifiche al decreto 29 marzo 2006, recante: "Interventi di attuazione degli articoli 3 e 5 della legge 21 marzo 2005, n. 55, recante: «Disposizioni finalizzate alla prevenzione del gozzo endemico e di altre patologie da carenza di iodio.» Gazzetta ufficiale n. 253, serie generale, 29 ottobre 2012.
- De Marchi M, Toffanin V, Cassandro M, Penasa M. 2014. Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits¹. *Journal of Dairy Science*. 97:1171-1186.

- De Marchi M, Penasa M, Zidi A, Manuelian CL. 2018. Invited review: Use of infrared technologies for the assessment of dairy products - Applications and perspectives. *Journal of Dairy Science*. 101:10589-10604.
- Eckhoff KM, Maage A. 1997. Iodine Content in Fish and Other Food Products from East Africa Analyzed by ICP-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 10:270-282.
- Fiamegos Y, de la Calle Guntiñas MB. 2018. Validation strategy for an ED-XRF method to determine trace elements in a wide range of organic and inorganic matrices based on fulfilment of performance criteria. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 150:59-66.
- Flachowsky G, Franke K, Meyer U, Leiterer M, Schöne F. 2014. Influencing factors on iodine content of cow milk. *Eur J Nutr*. 53:351-365.
- Galton DM, Petersson LG, Merrill WG, Bandler DK, Shuster DE. 1984. Effects of premilking udder preparation on bacterial population, sediment, and iodine residue in milk. *Journal of Dairy Science*. 67:2580-2589.
- Grelet C, Dardenne P, Soyeurt H, Fernandez J.A, Vanlierde A, Stevens F, Gengler N, Dehareng F. 2021. *Methods*. 186:97-111.
- Guerra A, Costa A, De Marchi M, Righi F, Simoni M, Manuelian CL. 2024. The effects of dietary iodine content, milking system, and farming practices on milk iodine concentration and quality traits. *Journal of Dairy Science*. 107:2143-2155.
- Haldimann, M, Walther B, Dudler V, Aubert R, Wechsler D. 2019. Increase of iodine content in brine-salted soft, semi-hard and hard cheeses by diffusion of iodide. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36:1787-1799.
- Holroyd SE. 2013. The Use of near Infrared Spectroscopy on Milk and Milk Products. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*. 21:311-322.
- Lehner AF, Zyskowski J, Johnson M, Buchweitz JP. 2021. Improved accuracy in measurement of iodine in animal feeds by ICP/MS with alkaline dissolution. *Animal Feed Science and Technology*. 272:1147-11481.
- Nerhus I, Wik Markhus M, Nilsen BM, Øyen J, Maage A, Ødegård ER. 2018. Iodine content of six fish species, Norwegian dairy products and hen's egg. *Food Nutr Res*. 62:29219-1291.

- Niero G, Franzoi M, Vigolo V, Penasa M, Cassandro M, Boselli C. 2019. Validation of a gold standard method for iodine quantification in raw and processed milk, and its variation in different dairy species. *Journal of Dairy Science*. 102:4808-4815.
- Niero G, Franzoi M, Vigolo V, Peruzzo M, Cassandro M, De Marchi M. 2020. Variation of iodine content in bovine milk and predictive ability of mid-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*. 102:104-602.
- Niero G, Penasa M, Currò S, Masi A, Trentin AR, Cassandro M. 2017. Development and validation of a near infrared spectrophotometric method to determine total antioxidant activity of milk. *Food Chemistry*. 220:371-376.
- Niero G, Visentin G, Censi S, Righi F, Manuelian CL, Formigoni A. 2023. Invited review: Iodine level in dairy products—A feed-to-fork overview. *Journal of Dairy Science*. 106:2213-29.
- Pashkova GV, Smagunova AN, Finkelshtein AL. 2018. X-ray fluorescence analysis of milk and dairy products: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 106:183-189.
- Pennington JAT. 1990. A review of iodine toxicity reports. *Journal of the American Dietetic Association*. 90:1571-1581.
- Perring L, Andrey D. 2003. ED-XRF as a Tool for Rapid Minerals Control in Milk-Based Products. *J Agric Food Chem*. 51:4207-4212.
- Schöne F, Spörl K, Leiterer M. 2017. Iodine in the feed of cows and in the milk with a view to the consumer's iodine supply. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 39:202-209.
- Sorrenti S, Baldini E, Pironi D, Lauro A, D'Orazi V, Tartaglia F. 2021. Iodine: Its Role in Thyroid Hormone Biosynthesis and Beyond. *Nutrients*. 13:4469.
- Walther B, Wechsler D, Schlegel P, Haldimann M. 2018. Iodine in Swiss milk depending on production (conventional versus organic) and on processing (raw versus UHT) and the contribution of milk to the human iodine supply. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 46:138-143.
- Wilschefski SC, Baxter MR. 2019. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clinical Biochemist Reviews*. 40:115-133.

- Van der Reijden OL, Zimmermann MB, Galetti V. 2017. Iodine in dairy milk: Sources, concentrations and importance to human health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 31:385-395.
- Visentin E, Niero G, De Marchi M. 2023. Assessment of energy dispersive X-ray fluorescence (ED-XRF) for quantification of iodine in non-lyophilized milk. *Food Chemistry*. 429:136892.
- Visentin E, Niero G, Cassandro M, Penasa M, De Marchi M. 2023. Assessment of the ED-XRF technique to quantify mineral elements in nonlyophilised milk and cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 76:102-110.
- www.iss.it/osnami-chi-siamo. Visitato il 28 agosto 2024.
- www.ign.org. Visitato il 28 agosto 2024.
- www.epicentro.iss.it/iodio/. Visitato il 28 agosto 2024.
- Zimmermann MB. 2009. Iodine Deficiency. *Endocrine Reviews*.30:376-408.

RINGRAZIAMENTI

Il presente elaborato di tesi è stato svolto nell'ambito del progetto "The relevance of iodine in human nutrition: filling the gap from the farm to the fork" - Bando 2022 PNRR Prot. P20228RP2Z.

