



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AGRICOLTURA, LE FORESTE, LA NATURA E L'ENERGIA**

Corso di Dottorato di Ricerca in

Ingegneria dei Sistemi Agrari e Forestali - XXVII Ciclo

**“La spettroscopia NIR come strumento per l'ottimizzazione del processo
nella produzione di olio extravergine di oliva”**

Tutor

Prof. Massimo Cecchini

Cotutor

Prof. Riccardo Massantini

Dottoranda

Dott.ssa Elisabetta Stella

4 Maggio 2015

Sommario

Riassunto.....	III
Abstract.....	IV
1. L'oliva.....	1
1.1 Composizione del frutto.....	1
1.2 Cultivar e produzione di olive.....	3
1.3 Danni e avversità delle olive.....	4
1.3.1 Mosca dell'olivo.....	4
1.3.1.1 Conseguenze dell'attacco.....	6
1.3.2 Grandine.....	7
1.3.3 Altri parassiti.....	8
2. Industria olearia.....	9
2.1 Estrazione di olio extravergine d'oliva.....	9
3. L'olio di oliva.....	13
3.1 Composizione dell'olio di oliva.....	13
3.2 Analisi chimiche per il controllo analitico ufficiale.....	14
3.3 Valutazione organolettica degli oli di oliva.....	17
3.3.1 Assaggio dell'olio.....	18
3.3.2 Attributi positivi e negativi.....	19
4. La spettroscopia nel vicino infrarosso (near infrared, NIR).....	21
4.1 Principali tecniche non distruttive.....	21
4.2 Concetti base di spettroscopia NIR.....	21
4.2.1 Principio fisico-chimico.....	22
4.3 Strumentazione e configurazioni.....	23
4.4 Chemometria o tecniche di analisi multivariata.....	24
4.4.1 Pretrattamento dei dati.....	26
4.5 Applicazioni della spettroscopia NIR su olive e olio di oliva.....	29
5 Pubblicazioni.....	32
5.1 Feasibility of NIR spectroscopy to detect olive fruit infested by <i>Bactrocera oleae</i>	32
5.2 Recenti sviluppi sull'impiego della spettroscopia NIR per il controllo qualitativo e la tutela degli oli extravergini di oliva.....	47
5.3 Impiego di tecniche non distruttive per il riconoscimento di nocciole (<i>Corylus avellana</i> L.) di cultivar diverse.....	86
5.4 Altre pubblicazioni.....	99

6 Conclusioni	101
7 Bibliografia	102
Ringraziamenti	114

Riassunto

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di applicare la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) su olive colpite dalla mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*), per indagare la possibilità di discriminare le olive sane da quelle danneggiate dall'insetto. I buoni risultati ottenuti e lo studio della bibliografia del settore hanno portato alla pubblicazione di diversi articoli sull'applicazione di questa metodologia non distruttiva nel settore oleicolo, dato anche il notevole interesse economico rivolto alla produzione di olio extravergine di oliva di ottima qualità. La tesi di dottorato è costituita da una sezione introduttiva che riporta la composizione chimica dell'oliva e dell'olio, il processo di trasformazione del prodotto, nonché le analisi di riferimento, numerose e impegnative sia dal punto di vista dei tempi che dei costi di realizzazione, per ottenere un ottimo prodotto finale. Nella parte introduttiva vengono anche riportati i concetti base della spettroscopia del vicino infrarosso, con cenni alle applicazioni condotte su olive e olio. Nella seconda parte invece, vengono riportate le pubblicazioni di settore realizzate durante il corso dei tre anni di dottorato, che hanno riguardato l'applicazione della spettroscopia NIR e lo stato dell'arte di questa tecnologia non distruttiva applicata all'industria olearia. Viene riportato per esteso anche uno studio condotto sulla discriminazione delle cultivar di nocciole viterbesi attraverso la spettroscopia NIR e l'elenco delle pubblicazioni prodotte durante il dottorato di ricerca.

Parole chiave

Spettroscopia NIR

Mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae* L.)

Qualità dell'olio

Abstract

The aim of this study is to apply NIR spectroscopy on olive fruits infested by *Bactrocera oleae* (olive fruit fly) for detecting the feasibility to discriminate sound and unsound fruits. The results of this research and the study of the existing bibliography allowed to publish several articles regarding the application of this non-destructive technique on oil industry. In the first part basic concepts as olive and oil composition, oil process, traditional analysis and NIR spectroscopy, are reported. In the second part publications regarding the focus of this study are reported, included a precedent work on hazelnut cultivars discrimination and also all the publications of the doctorate study.

Keywords

NIR spectroscopy

Olive fruit fly (*Bactrocera oleae* L)

Oil quality

Introduzione

1. L'oliva

1.1 Composizione del frutto

L'oliva è il frutto della pianta dell'olivo e viene indicata in botanica come drupa. È composta dall'epicarpo (o buccia) che rappresenta la parte più esterna, di colore verde o scuro, ed è costituito da un sottile strato di cellule cementate tra loro dalla cutina e rivestito da uno strato ceroso di pruina. Nell'epicarpo è presente dell'olio per una percentuale pari a 1,5-3%. Il mesocarpo (o polpa) è un tessuto carnoso in cui si accumula l'olio, e le cellule del tessuto sono saldate dalla pectina, nel corso dello sviluppo della drupa, il mesocarpo si accresce e cambia colore con la maturazione dell'oliva (per l'accumulo di antociani). L'olio presente nel mesocarpo è pari al 75-80% del totale. L'endocarpo o nocciolo è un tessuto duro di cellule sclerificate ad alto contenuto di lignina e racchiude l'embrione. Il suo accrescimento termina a due mesi dalla fecondazione. In esso è presente olio in percentuale pari al 15-20% del totale. Nell'endocarpo è racchiuso il seme o mandorla che è ricca di olio (2-4%) e amido.

Gli stadi di sviluppo del frutto sono quattro: iniziale, intermedio, invaiatura e senescenza. Nella prima fase le drupe appaiono verdi per la maggior presenza di clorofilla, le loro cellule sono ricche di citoplasma e contengono una scarsa quantità di olio. Nello stadio intermedio avviene un intenso accumulo di olio (processo di inolizione). Le olive assumono una colorazione debolmente gialla per la degradazione delle clorofille. Il colore è dovuto alla maggior presenza di xantofille e carotenì. Questa fase è tipica del mese di Settembre. Nello stadio di invaiatura (periodo Ottobre-Dicembre) rallenta l'accumulo di olio, le drupe assumono una colorazione brunastra per la presenza di antociani. In questa fase si può distinguere l'invaiatura in superficiale (riguarda solo l'epicarpo), profonda (oltre all'epicarpo imbrunisce anche parte della polpa) e totale (interessa l'epicarpo e la polpa). Nell'invaiatura totale l'oliva è totalmente scura. Infine, nella fase di senescenza l'accrescimento si riduce, così come l'attività respiratoria, e l'oliva giunge al raggrinzimento, con perdita di turgore e successiva caduta dall'albero.

Le cellule in cui si accumula l'olio vengono chiamate oleifere. Nella fase iniziale del processo di inolizione, nelle cellule oleifere la maggior parte dello spazio è occupato dal citoplasma e da piccole inclusioni lipidiche. Man mano i vacuoli membranosi che racchiudono l'olio si accrescono fino a che la cellula oleifera diviene matura. In questa, è possibile distinguere l'olio cosiddetto "legato" (citoplasmatico) che costituisce il 30-40% della cellula immatura e che non è estraibile con mezzi fisici, e l'olio detto "libero" (vacuolare) che rappresenta il 90% di olio di una cellula matura.

Nella cellula matura l'olio della polpa è contenuto essenzialmente nei vacuoli oleosi, tenuto isolato dal citoplasma acquoso e dai suoi enzimi attraverso una membrana. Nel corso della maturazione della drupa, nelle cellule oleifere aumenta la percentuale di olio e decresce quella di acqua. I vacuoli oleosi si ingrandiscono, si fondono e arrivano a occupare circa il 96% della cellula (lume cellulare). Al contrario, il citoplasma si riduce fino a costituire una piccolissima porzione della cellula e diminuisce lo spessore della membrana cellulare che diventa più fragile. Se la membrana cellulare si rompe per senescenza o altre cause (grandine, attacchi parassitari, traumi), così come i vacuoli oleosi, si verifica un'esposizione dell'olio e dei composti fenolici all'ossigeno presente nell'aria e una possibile alterazione ossidativa. Inoltre, possono intervenire anche gli enzimi degradativi (lipasi, polifenolossidasi, perossidasi) contenuti nel citoplasma. Tutto ciò comporta uno scadimento qualitativo dell'olio.

I composti fenolici sono metaboliti secondari che vengono biosintetizzati attraverso la via dell'acido shikimico (o shikimico) e fanno parte integrante della dieta umana. L'oliva rappresenta una buona fonte di approvvigionamento di diversi composti fenolici, che possono essere raggruppati in tre insiemi principali: l'oleuropeina e il ligustroside aglicone con i suoi derivati, i derivati fenolici semplici dall'alcol feniletilico e dagli acidi benzoico e cinnamico, ed infine gli altri composti fenolici identificati come lignani (Conde *et al.*, 2008). Il contenuto fenolico dell'oliva ha un forte connotato genetico, ma può essere influenzato dalle condizioni pedo-climatiche, dalla produzione, dalle tecniche agronomiche e dalla maturità del frutto. Il contenuto fenolico delle olive può variare sia quantitativamente che qualitativamente dalla sua composizione genetica. Al variare del contenuto fenolico varia anche, di conseguenza, la stabilità ossidativa e alcuni attributi sensoriali dell'olio estratto. Studi sui cambiamenti del profilo fenolico e del contenuto correlato alla maturazione dell'oliva, hanno dimostrato che durante la maturazione della drupa la concentrazione dei fenoli totali progressivamente aumenta

fino a raggiungere un livello massimo, per poi decrescere durante il proseguire della maturazione (Conde *et al.*, 2008). La frazione semplice dei fenoli contiene dei composti in parte preesistenti nell'oliva come alcoli e acidi fenolici. In quella composta vi sono secoiridoidi e flavoni che rispetto all'oliva sono presenti nella loro forma aglicone, oltre ai lignani e al verbascoside. Negli acidi fenolici della frazione semplice vi sono i derivati dell'acido benzoico e cinnamico e sono presenti in piccole quantità, rappresentano la frazione fenolica più polare. Gli alcoli fenolici della stessa frazione, l'idrossitirosolo e il tirosolo, sono caratteristici delle *Oleaceae* e derivano dall'idrolisi dei fenoli complessi e tendono ad aumentare con l'invecchiamento degli oli.

1.2 Cultivar e produzione di olive

Generalmente le cultivar di olivo vengono classificate in base alla trasformazione cui sono destinate le olive, si usa infatti distinguere in cultivar da olio, da mensa e per entrambi gli usi. La destinazione è legata alla dimensione della drupa, alla resa in olio e ad altre condizioni. Identificare le diverse cultivar richiede tuttavia una lunga esperienza da parte di coltivatori e frantoiani poiché l'olivo, rispetto ad altre specie, è caratterizzato tendenzialmente da una morfologia omogenea, lo stesso vale per il comportamento.

Le principali differenze morfologiche che si possono riscontrare tra le cultivar sono l'aspetto della pianta, la foglia e la drupa. In particolare, quest'ultimo carattere presenta maggior varietà poiché diversi sono i tratti morfologici che possono variare e, di conseguenza, permettere una distinzione tra le cultivar. Tali caratteri sono il peso della drupa, il rapporto polpa/nocciolo, la forma e il colore del frutto e all'interno di questi sono diversi i parametri da valutare. Nel distinguere le cultivar entrano in gioco anche aspetti legati alla fenologia della pianta e alle caratteristiche tecnologiche.

In Italia vi è il maggior numero di cultivar al mondo e si tende a classificarle secondo la distribuzione regionale. Vi sono cultivar ampiamente diffuse nel territorio nazionale quali Frantoio, Leccino, Moraiolo e Pendolino, ma la maggior parte sono caratterizzanti di un territorio. Nel Lazio le cultivar caratterizzanti sono soprattutto Canino, Carboncella, Itrana, Raja, Rosciola.

Per quanto riguarda la produzione di olive, senza distinzione tra le destinazioni d'uso del prodotto, dai dati Istat emerge per l'anno 2011 che in Italia vi siano oltre 1.188.000 ettari destinati alla coltivazione dell'olivo, con una produzione in quintali superiore a 34.510.000, nel Lazio gli ettari di coltivazione di olivo per lo stesso periodo di riferimento sono oltre 88 mila e la produzione superiore a 1.900.000 quintali. Nel territorio viterbese, infine, la superficie destinata alla coltivazione di olivo è pari a 21.035 ettari e la produzione di olive è pari a 567 mila quintali (Dati Istat, 2011).

1.3 Danni e avversità delle olive

1.3.1 Mosca dell'olivo

Bactrocera oleae (Rossi) o mosca dell'olivo è un insetto carpo-fago appartenente alla famiglia Tephritidae ed è considerato il peggior parassita a carico delle piante di olivo a causa dell'ampia diffusione, in associazione alle aree di coltivazione della pianta. Gli adulti si nutrono di nettare floreale, ambrosia, melata di insetti ed essudati fogliari o altre fonti di materia organica (Benelli, 2014), le larve invece, sono caratterizzate da un rigoroso monofagismo e si nutrono esclusivamente dei tessuti della polpa (mesocarpo) della drupa. Le femmine, infatti, depongono le uova nei frutti, e una volta che le uova si sono schiuse, le larve si alimentano con il mesocarpo e crescono scavando profonde gallerie fino al nocciolo (Mraicha *et al.*, 2010), distruggendo irrimediabilmente il frutto e permettendo lo sviluppo di microrganismi secondari (funghi e batteri) (Koprivnjak *et al.*, 2010).

Le larve sono apode e di forma conico-cilindrica, si sviluppano attraverso tre stadi (1^a, 2^a e 3^a età). Alla fine del terzo stadio si impupano nel frutto o ne fuoriescono per impuparsi nel terreno. Lo sviluppo larvale è fortemente dipendente dalla temperatura (Gucci *et al.*, 2012), il numero di generazioni annuali (specie polivoltina, fino a 8 generazioni l'anno) dipende dall'umidità, dalla disponibilità di olive e dalla loro qualità.

Il danno causato dalla presenza delle gallerie comporta perdite di prodotto superiori al 40%. Si hanno perdite per cascola anticipata, distruzione del frutto e riduzione della qualità dell'olio di oliva. Il numero di individui di mosca si riduce nei mesi estivi, in condizioni di alte temperature e bassa umidità (generalmente Luglio e Agosto), mentre nei mesi di Settembre-Ottobre si raggiunge il picco nel numero di

adulti. Se la raccolta è anticipata, il danno può divenire tollerabile, al contrario, ritardare la raccolta significa far aumentare la popolazione e di conseguenza il danno. Lo sviluppo e la maturazione dell'oliva sono dipendenti dalla cultivar e dall'ambiente e pertanto, cambia per area di crescita e cultivar di olivo (Topuz e Durmusoglu, 2008) e gli effetti dell'attacco della mosca sono dovuti alla severità dell'attacco stesso e allo stadio di sviluppo dell'insetto.

Dopo l'emergenza, entrambi i sessi di *B. oleae* completano la maturazione delle gonadi e in 5-8 giorni diventano sessualmente maturi. La percezione dei segnali olfattivi da parte di maschi e femmine è cruciale. Nella maggior parte dei Tefrinidi sono esclusivamente le femmine che producono feromoni sessuali per attrarre i maschi, ma soltanto nel caso di *B. oleae* entrambi i sessi della specie producono feromoni sessuali (Benelli, 2014). Le femmine si accoppiano 1-3 volte nella vita, i maschi invece sono poligami e si accoppiano giornalmente con le femmine più recettive. Sia in campo che in laboratorio è stato osservato che questi insetti si accoppiano nel tardo pomeriggio o al tramonto (Benelli, 2014).

Vengono colpiti sia frutti maturi che non, e una volta attaccati cadono anticipatamente e sono inservibili per l'industria, anche nel caso delle olive da tavola la puntura di insetti provoca un notevole deprezzamento (Gucci *et al.*, 2012). È stata riscontrata una suscettibilità variabile con la cultivar. La forma della drupa è uno dei parametri fisici predominanti che interessano la femmina dell'insetto nella scelta del sito di ovideposizione, a seguire vengono valutati dall'insetto la misura e il colore del frutto. È stato dimostrato che le femmine depongono le uova nei frutti grandi e tondi, e gli studi relativi concordano nell'affermare che vengono preferite, e in generale maggiormente colpite, le olive verdi, dure, grandi e sferiche. Questo è stato spiegato per il fatto che l'oliva verde è una garanzia di tempo a disposizione della larva per svilupparsi e se l'oliva scelta è grande, la larva ha a disposizione polpa sufficiente per nutrirsi. Inoltre, è stato dimostrato che vi è una buona correlazione tra le cultivar preferite dall'insetto e lo sviluppo e peso delle larve. Infatti, nelle cultivar preferite il peso larvale è maggiore e il tempo di sviluppo della larva è più breve rispetto a quanto riportato per le altre cultivar (Rizzo *et al.*, 2012). Le olive che maturano più tardi sono più suscettibili all'attacco della mosca per la persistenza del colore verde durante la stagione (Tamendjari *et al.*, 2004).

1.3.1.1 Conseguenze dell'attacco

L'attacco della mosca riduce la resa in olio, colpisce i parametri di qualità (acidità, numero di perossidi, assorbimento all'ultravioletto e la qualità organolettica) e altera la composizione chimica (steroli, fenoli, acidi grassi, frazione volatile). La severità degli effetti negativi dipende dallo stadio di sviluppo della mosca. È stato dimostrato che nell'olio ottenuto da olive danneggiate dalla mosca, si registra un aumento dell'acidità (0.8% è la soglia prevista dalla legge) e del numero di perossidi. L'attacco della mosca, infatti, è un fattore che accelera il processo di degradazione, sia dal punto di vista ossidativo che idrolitico per la presenza dei fori di uscita e la conseguente esposizione all'ossigeno (Gucci *et al.*, 2012; Tamendjari *et al.*, 2009). L'acidità aumenta per l'azione di enzimi idrolitici e attività lipolitica praticata da funghi e batteri che si sviluppano accedendo dai fori di uscita. I perossidi indicano prodotti primari di ossidazione aumentano con la lipossigenasi nel frutto e nell'olio ottenuto da olive danneggiate (Pereira *et al.*, 2004).

Per quanto riguarda la stabilità ossidativa, maggiore è il contenuto di grassi monoinsaturi (es. acido oleico e linoleico), maggiore è la stabilità dell'olio. Con l'infestazione da mosca non cambia la composizione in acidi grassi, tuttavia la diminuzione di fenoli, in particolare di alcuni derivati dei secoiridoidi, nelle olive danneggiate, può essere correlata a una minore stabilità e a una maggiore infestazione. Non si può tuttavia stabilire una diretta correlazione tra contenuto fenolico e attacco della mosca perché ci sono numerose variabili che influenzano il profilo fenolico (cultivar, area di coltivazione, condizioni climatiche e conservazione dell'olio) (Gomez-Caravaca *et al.*, 2008).

La resa di olio diminuisce e l'alterazione della composizione chimica del frutto, compresa la riduzione di sostanze fenoliche antiossidanti e l'alterazione del profilo dei composti volatili, comporta l'insorgenza di off-flavor, che compromettono il valore nutrizionale e le proprietà sensoriali. Quando scade la qualità, l'olio non può più essere considerato extravergine perché non più conforme. Le olive colpite dalla mosca non possono essere molite (Moscetti *et al.*, 2015).

La qualità dell'olio è strettamente correlata alle condizioni fisiologiche delle olive da cui viene estratto. L'azione di parassiti come la mosca prima della raccolta e/o l'attività fungina nel periodo tra raccolta ed estrazione sono in generale i principali

responsabili della rottura dei processi metabolici delle olive e di conseguenza del deterioramento dell'olio e della sua qualità (Kyriakidis e Dourou, 2002).

Il valore di K_{232} aumenta all'aumentare dell'infestazione. Si registrano perdite di pigmenti all'aumentare del grado di infestazione per danni strutturali alle clorofille, causate dalle larve e dai microorganismi sopraggiunti, che producono acidi e favoriscono la trasformazione delle clorofille in feofitine. Gli attacchi della mosca causano perdite di flavonoidi, in correlazione alla percentuale di infestazione (Mraicha et al, 2010).

1.3.2 Grandine

La grandine è un fenomeno meteorologico che può causare seri danni all'epicarpo dell'oliva per il forte impatto del “chicco” di ghiaccio sull'epidermide, con formazione di caratteristici segni. La presenza di danni sulla superficie della drupa è un fattore decisivo, forse il principale, nel determinare la qualità esterna del frutto (Riquelme *et al.*, 2008). I consumatori valutano principalmente la qualità del prodotto basandosi sull'apparenza e anche una moderata ammaccatura può ridurre l'accettabilità da parte loro. Tuttavia, il danneggiamento non riguarda solo la superficie dell'epicarpo, ma anche i tessuti interni del mesocarpo. Infatti, l'impatto della grandine sul frutto, provoca la rottura dei tessuti cellulari con rilascio di fluido intracellulare e conseguente ossidazione dei composti fenolici. Nel tempo, a seconda delle caratteristiche dell'impatto, il tessuto danneggiato imbrunisce in contrasto con il tessuto verde circostante (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2013).

La contusione causa delle modificazioni fisiche nella *texture* (struttura) e possibili alterazioni chimiche del colore e del flavor. La presenza di contusioni e altri danni meccanici (tagli, punture, rotture e abrasioni) causa perdite economiche significative di prodotto fresco dovuto al declassamento o rifiuto da parte del consumatore (Opara e Pathane, 2014). La presenza di questi tipi di difetti non è accettabile per l'industria di lavorazione (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2012). Si verifica anche una contaminazione batterica e fungina da parte di quei microrganismi in grado di infettare i tessuti colpiti da danni meccanici (Luo *et al.*, 2012).

La polifenolossidasi (PPO) è l'enzima responsabile dell'imbrunimento dei tessuti (Segovia-Bravo *et al.*, 2009), che provoca il rilascio enzimatico di idrossitirosolo da parte dell'oleuropeina e dell'idrossitirosolo glucoside per azione degli enzimi esterasi e β -glucosidasi, presenti nella drupa. Contemporaneamente si può verificare un ulteriore rilascio di idrossitirosolo a causa dell'idrolisi chimica dell'oleuropeina. Gradualmente l'idrossitirosolo iniziale e il verbascoside vengono ossidati dalla PPO presente nel frutto, e l'intero processo comporta l'imbrunimento del frutto (Segovia-Bravo *et al.*, 2010).

1.3.3 Altri parassiti

Altre avversità che possono colpire le piante di olivo e i loro frutti sono rappresentate da batteri, insetti e funghi, che causano, per citare le più note nel settore oleicolo, la tignola dell'olivo, la rogna e l'occhio di pavone. La tignola è causata da un lepidottero fitofago, *Prays oleae*, che causa la caduta delle olive. Le larve di questo insetto hanno comportamenti diversi, in alcuni stadi agiscono come lepidotteri minatori, per cui le larve scavano gallerie nei tessuti fogliari. In altre fasi le larve sono carpofaghe e si nutrono del mesocarpo della drupa, entro cui la femmina dell'insetto depone le uova. La rogna è causata *Pseudomonas savastanoi*, un batterio Gram negativo, che colpisce giovani rami, branche e fusti formando piccole escrescenze tumorali, e attraverso lesioni di varia origine può propagarsi all'interno della pianta attraverso il flusso linfatico. Altra malattia tipica a carico dell'olivo è il cosiddetto "occhio di pavone", causato dal fungo *Spilotea oleaginea*, che infetta le foglie riducendo la capacità fotosintetica e condiziona la formazione delle gemme ascellari con riduzione della produzione di olive nell'anno successivo. E infine, va citato anche un altro parassita del genere *Olea* che è rappresentato dal batterio Gram positivo *Xylella fastidiosa*.

2. Industria olearia

2.1 Estrazione di olio extravergine d'oliva

La produzione o estrazione di olio extravergine di oliva prevede, dopo la defogliazione e il lavaggio delle olive, le fasi di molitura (o frangitura), di gramolatura e di estrazione dell'olio.

La frangitura o molitura consiste nella riduzione delle olive in una pasta grossolana e ha lo scopo di rompere le cellule e le membrane vacuolari per consentire la fuoriuscita dell'olio in esse contenuto. In questa fase avviene anche la rottura del nocciolo in frammenti, che contribuiscono a sfibrare e sminuzzare la polpa e, nella successiva fase di estrazione, svolgono una funzione drenante. La loro dimensione influisce sul rendimento dell'impianto e sulle caratteristiche dell'olio. Infatti, se i frammenti di nocciolo sono molto grandi, l'impianto avrà una resa minore con un'estrazione inefficiente, e ne possono derivare oli con colori meno verdi per la minor estrazione di clorofilla. Se, al contrario, i frammenti sono piuttosto piccoli, la resa in olio non sarà ottimale perché questi possono interferire con la separazione delle fasi olio/acqua/sansa.

I frangitori maggiormente usati sono quelli a molazze e a martelli. Quelli a molazza consistono in 2-4 ruote di granito ruvido che girano in una vasca d'acciaio e hanno una capacità lavorativa di circa 500-700 kg/h e un tempo di molitura pari a 20-40 minuti circa. Con questo tipo di frangitori si ottiene un'ottima molitura, anche se il processo risulta lento e discontinuo. È un macchinario ingombrante e oneroso che tuttavia esegue in contemporanea anche il rimescolamento della pasta di olive. D'altro canto non evita la contaminazione di partite buone con altre scadenti e inoltre comporta una pulizia difficoltosa. Il frangitore a martelli invece, è costituito da un tubo rotante in cui girano 4 "martelli", con la base forata (diametro 5-6 mm) per permettere il passaggio della pasta di olive. La frangitura avviene in tempo brevi, la necessità di manodopera è ridotta e la capacità lavorativa è elevata (fino a 50 kg di olive/min), si registrano tuttavia dei surriscaldamenti della pasta e la formazione di emulsioni.

La gramolatura consiste in un lento rimescolamento della pasta di olive, che consente il completamento della rottura delle cellule e la coalescenza delle goccioline di olio in gocce di dimensioni sempre più grandi ($\varnothing > 30\text{-}50\mu$). La pasta viene inserita all'interno di un tubo rotante attorno a un asse di rotazione e rimescolato da pale. Il

carico di lavoro è di circa 400-600 kg di pasta, con una capacità lavorativa di 1000-1200 kg l'ora e il tempo di gramolatura variabile tra 15 e 60 minuti circa. L'efficacia della gramolatura dipende dal tempo di lavorazione, dalla temperatura, dall'umidità delle olive e dalle loro caratteristiche. Prolungare il tempo della gramolatura consente un aumento della resa, ma non è conveniente protrarre la gramolatura oltre i 60 minuti, perché il riscaldamento della pasta, sebbene consenta anch'esso di aumentare la resa, fa incrementare la velocità delle reazioni di ossidazione. Le altre variabili che influenzano l'efficacia della gramolatura sono l'umidità (l'operazione è difficoltosa se le olive sono troppo secche o umide), la varietà, lo stato fitosanitario e la fase di maturazione dell'oliva lavorata. Durante la gramolatura operano enzimi endogeni che solubilizzano i fenoli idrofili e danno origine alla biosintesi di aromi (la cosiddetta via della lipossigenasi), è in questa fase che l'olio si arricchisce di composti fenolici e odorosi. Se si allungano i tempi di gramolatura e si opera a temperature elevate, l'olio si impoverisce delle sostanze antiossidanti, si riducono le quantità di aromi gradevoli e incrementano quelli sgradevoli.

L'estrazione può essere eseguita attraverso tre tecniche: pressione, centrifugazione e percolamento. L'estrazione per pressione consiste nello stendere la pasta di olive, dopo la fase di gramolatura (breve e a temperatura ambiente), su supporti simili a dischi, i fiscoli, che vengono poi impilati uno sull'altro. Questa torre viene "schiacciata" da una pressa idraulica che provvede alla spremitura. Da questo sistema si ottiene il mosto di oliva, in cui si trovano olio e acqua di vegetazione, e la sansa. Il mosto viene successivamente centrifugato per separare l'olio dall'acqua di vegetazione. Questo metodo consente di lavorare fino a 350 kg per ciclo, ciascun ciclo richiede fino a 120 minuti ed è discontinuo. La qualità del fiscole è determinante per la qualità dell'olio, questi dischi, infatti, devono essere costituiti da un materiale robusto, facilmente lavabile, indeformabile, che non assorbe molto olio e soprattutto, che non rilascia odori e sapori indesiderabili attraverso la contaminazione di olive scadenti con quelle buone.

Il secondo metodo di estrazione è quello per centrifugazione, e si attua eseguendo la frangitura con un frangitore meccanico e aggiungendo acqua tiepida (30-40°C) durante la fase di gramolatura per fluidificare la pasta di olive. L'estrazione dell'olio con questa tecnica si esegue mediante un estrattore centrifugo orizzontale (definito decanter) a tre fasi. Il numero delle fasi indica il numero dei prodotti che

fuoriescono dall'estrattore, olio, sansa e acqua di vegetazione. È un sistema di estrazione completamente automatizzato, il macchinario è poco ingombrante, con un'alta capacità lavorativa e la garanzia di igiene. Tuttavia, oltre al costo elevato, questo sistema comporta notevoli consumi energetici e la fuoriuscita di una sansa più umida e con minor contenuto in olio, e allo stesso tempo, un'elevata quantità di acqua di vegetazione con contenuto di olio medio-alto (circa 5-15 g/l). Oggigiorno, il sistema di estrazione per centrifugazione sta rimpiazzando gli impianti per pressione, ormai confinati a piccole realtà produttive. Per risolvere gli inconvenienti del decanter a 3 fasi in cui l'aggiunta di acqua causa un depauperamento dell'olio dei suoi composti aromatici idrosolubili e parte di quelli fenolici, con conseguente perdita di sostanze antiossidanti, nonché lo smaltimento dell'acqua di vegetazione in eccesso, sono state proposte diverse soluzioni. La più convincente è l'introduzione di un decanter "flessibile" che permette di optare per tre scelte:

- convenzionale a tre fasi (olio, sansa e acqua di vegetazione)
- a due fasi, senza aggiunta di acqua (olio e sansa che contiene acqua di vegetazione)
- a due fasi e mezzo, con limitato utilizzo di acqua (permette di recuperare fino al 15-30% di acqua di vegetazione dalla sansa)

In questo modo da 100 Kg di olive si possono ottenere a seconda dell'opzione selezionata per il decanter:

- sistema a tre fasi con aggiunta di 50-60 kg di acqua: 18-20 Kg di olio, 50-60 kg di sansa (umidità 45-55%; 85-95 kg di acqua di vegetazione)
- sistema a due fasi: 18-20 Kg di olio e 70-80 kg di sansa (umidità 70-80%)
- sistema a due fasi e mezzo con aggiunta fino a 20 kg di acqua: 18-20 Kg di olio, 50-60 kg di sansa (umidità 50-60%) e 15-20 kg di acqua di vegetazione.

Il terzo tipo di estrazione, detto per percolamento, prevede principalmente due fasi di gramolatura e due di estrazione. Dopo la prima gramolatura, si attua una prima estrazione in vasca che distingue l'olio (70-80% dell'olio estraibile) da una pasta che è composta di olio (8-12%) e per la maggior parte di acqua (50-65%). Questa viene poi sottoposta a una seconda gramolatura, e passa quindi nel decanter o nella pressa, da cui si ottengono le tre fasi di lavorazione. L'estrazione in vasca si basa sul principio della

tensione interfacciale dell'olio sui metalli, che è minore di quella dell'acqua. La pasta di olive viene rimescolata in una vasca di acciaio con un fondo grigliato in cui vengono affondate delle lame in acciaio che permettono solo all'olio di percolare per gravità al di sotto della griglia, mentre l'acqua e la sansa rimangono nella vasca.

3. L'olio di oliva

3.1 Composizione dell'olio di oliva

I componenti degli oli di oliva possono essere classificati utilizzando diversi criteri, secondo la polarità, la struttura chimica, la suscettibilità all'idrolisi alcalina. Più comunemente vengono suddivisi in composti “maggiori” e “minori”, sulla base della loro quantità. Tra i componenti maggiori sono più rappresentativi i trigliceridi (97-98%), vengono compresi in questa porzione anche i digliceridi e i monogliceridi e gli acidi grassi liberi. La composizione acidica degli oli di oliva può variare con la provenienza dell'olio, ma prevale nettamente l'acido oleico (monoinsaturo) che è presente per circa il 70-80% del totale. Tra gli altri sono presenti gli acidi palmitoleico, linoleico e linoleico per gli insaturi e gli acidi palmitico e stearico nella frazione degli acidi grassi saturi. La percentuale dei componenti maggiori copre il 98.5-99.5% del totale, mentre la restante quota (0.5-1.5%) rappresenta i componenti cosiddetti “minori”, insieme eterogeneo che tuttavia conferisce all'olio la sua qualità, poiché le variazioni quali-quantitative creano differenti caratteri organolettici, nutrizionali e merceologici. Dei componenti minori fanno parte idrocarburi, cere, alcoli, fosfolipidi, pigmenti, vitamine, fenoli, oltre ai composti volatili. Il valore nutrizionale dell'olio deriva dall'alto livello di acido oleico e dai componenti minori, come i composti fenolici, mentre l'aroma è fortemente influenzato dai composti volatili (Kalua *et al.*, 2007; Angerosa *et al.*, 2004).

La maggior parte dei componenti minori è rappresentata dagli idrocarburi (30-50%), saturi e insaturi, questi ultimi prevalgono rispetto ai primi, e sono costituiti principalmente dallo squalene, fondamentale nella biosintesi del colesterolo, dei fitosteroli e di tutti gli ormoni steroidei. Il 20-25% dei componenti minori è costituito dagli steroli che negli oli di origine vegetale rappresentano una caratteristica fondamentale della famiglia botanica di provenienza, il più importante di questi è il β -sitosterolo. Gli alcoli sono presenti sia in forma alifatica che terpenica, nettamente predominanti. Sia gli steroli che gli alcoli possono rappresentare un indice importante per indagare eventuali contraffazioni e adulterazioni degli oli extravergini con oli di oliva di minor qualità o di altra origine. I pigmenti sono rappresentati da clorofilla e carotenoidi, entrambi i composti conferiscono colore agli oli e la loro quantità può variare a seconda del grado di maturazione delle olive, della cultivar e della tecnologia di estrazione e tende a diminuire con l'aumentare del tempo di conservazione dell'olio.

I tocoferoli svolgono una funzione antiossidante, seppur limitata durante la conservazione dell'olio, e in particolare α -tocoferolo (vitamina E) è predominante rispetto alle altre forme e, come visto per gli steroli, caratterizza l'origine botanica dell'olio.

I componenti più importanti nella frazione dei composti minori sono i fenoli, perché rappresentano il gruppo più caratterizzante dal punto di vista organolettico e conservativo dell'olio. Hanno, infatti, un alto potere antiossidante e rallentano l'irrancidimento ossidativo dell'olio di oliva, e la loro concentrazione indica una buona qualità degli oli (Cecchi *et al.*, 2013; Yorulmaz *et al.*, 2013). I fenoli contribuiscono al colore e al sapore dell'olio e lo proteggono dall'ossidazione attraverso le proprietà anti-radicali liberi e chelanti dei metalli, che prevengono l'attacco dei radicali che reagiscono con l'ossigeno a scapito dei doppi legami degli acidi grassi insaturi, diminuendo fortemente la formazione di perossidi lipidici (Conde *et al.*, 2008). Sono state individuate tre classi di sostanze fenoliche: fenoli semplici (acidi ed alcoli fenolici), fenoli complessi (secoiridoidi), esclusivi degli oli di oliva, ed i lignani (pinoresinolo e idrossipinoresinolo) (Fregapane e Salvador, 2013). Tra i secoiridoidi, l'oleuropeina è uno dei più abbondanti composti fenolici a ogni stadio di maturazione ed è importante per l'amaro del frutto e i suoi derivati sono correlati al carattere amaro degli oli extravergini (Cecchi *et al.*, 2013.)

3.2 Analisi chimiche per il controllo analitico ufficiale

Attualmente la normativa vigente che riguarda l'olio di oliva, e si occupa del controllo analitico degli oli ricavati dall'oliva in termini di purezza, qualità e salubrità è il Regolamento europeo n. 2568/91 (e sue successive modifiche). Le analisi della qualità sono determinanti per il rispetto dei caratteri chimico-fisici, e a queste va aggiunto il test organolettico. Una volta che l'olio risulta conforme alle analisi relative alla qualità, viene sottoposto a quelle della purezza, che sono necessarie per escludere la presenza di oli estranei. L'insieme di queste analisi è necessario affinché per ciascun olio derivante dall'oliva venga stabilita la corretta classificazione commerciale.

Per accertare la qualità di un olio la normativa prevede l'analisi dell'acidità, del numero dei perossidi, della spettrometria UV, gli etil esteri degli acidi grassi (queste

hanno lo scopo di valutare la qualità delle olive, lo stato di ossidazione e la presenza di oli rettificati) e il saggio organolettico. Per appurare la purezza, le analisi necessarie riguardano tra gli altri gli stigmadieni, la percentuale di isomeri trans degli acidi grassi, la percentuale di acidi grassi, il Δ ECN42, gli steroli, le cere e le percentuali di eritridiolo e uvaiole (Tabella 1, 2 e 3).

Tabella 1. Principali analisi chimiche per il controllo analitico ufficiale secondo il Reg. 2568/91 (segue)

categoria	acidità (%)	numero perossidi (mcq O ₂ /kg)	cere (mg/kg)	2-gliceril mono plamitato (%)	Stigma stadiene (mg/kg)	ECN42	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK
olio extravergine di oliva	≤ 0.8	≤ 20	≤ 250	≤ 0.9	≤ 0.1	≤ 0.2	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01
olio di oliva vergine	≤ 2	≤ 20	≤ 250	≤ 1	≤ 0.1	≤ 0.2	≤ 2.6	≤ 0.25	≤ 0.01
olio di oliva lampante	> 2	-	≤ 300	≤ 0.9	≤ 0.5	≤ 0.3	-	-	-
olio di oliva raffinato	≤ 0.3	≤ 5	≤ 350	≤ 0.9	-	≤ 0.3	-	≤ 1.1	≤ 0.16
oli di oliva raffinati + oli vergini	≤ 1	≤ 15	≤ 350	≤ 0.9	-	≤ 0.3	-	≤ 0.9	≤ 0.15
olio di sansa di oliva greggio	-		> 350	≤ 1.4	-	≤ 0.6	-	-	-
olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0.3	≤ 5	> 350	≤ 1.4	-	≤ 0.5	-	≤ 2	≤ 0.2
olio di sansa di oliva	≤ 1	≤ 15	> 350	≤ 1.2	-	≤ 0.5	-	≤ 1.7	≤ 0.18

Tabella 2. Principali analisi chimiche per il controllo analitico ufficiale secondo il Reg. 2568/91 (segue)

Categoria	Composizione acidica					
	miristic o (%)	linolenic o (%)	arachidic o (%)	eicosenoic o (%)	beenico (%)	lignoceric o (%)
olio extravergine di oliva	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.2	≤ 0.2
olio di oliva vergine	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.2	≤ 0.2
olio di oliva lampante	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.2	≤ 0.2
olio di oliva raffinato	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.2	≤ 0.2
oli di oliva raffinati + oli vergini	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.2	≤ 0.2
olio di sansa di oliva greggio	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.3	≤ 0.2
olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.3	≤ 0.2
olio di sansa di oliva	≤ 0.05	≤ 1	≤ 0.6	≤ 0.4	≤ 0.3	≤ 0.2

Tabella 3. Principali analisi chimiche per il controllo analitico ufficiale secondo il Reg. 2568/91

Categoria	Composizione in steroli						Steroli totali (mg/kg)	Eritri-diolo e uvaiole (%)
	Colesterolo (%)	Brassica sterolo (%)	Campe-sterolo (%)	Stigma-sterolo (%)	Beta-sito sterolo (%)	Delta-7-stigma sterolo (%)		
olio extravergine di oliva	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000	≤ 4.5
olio di oliva vergine	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000	≤ 4.5
olio di oliva lampante	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000	≤ 4.5
olio di oliva raffinato	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000	≤ 4.5
oli di oliva raffinati + oli vergini	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1000	≤ 4.5
olio di sansa di oliva greggio	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 2500	> 4.5
olio di sansa di oliva raffinato	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1800	> 4.5
olio di sansa di oliva	≤ 0.5	≤ 0.1	≤ 4	< Camp.	≥ 93	≤ 0.5	≥ 1600	> 4.5

3.3 Valutazione organolettica degli oli di oliva

Per valutare la qualità di un olio di oliva e poterlo definire extravergine, accanto alle analisi chimiche stabilite dalla normativa vigente (Reg. CE 2568/91 e successive modifiche), è necessario effettuare anche la valutazione delle caratteristiche sensoriali dell'olio. La valutazione organolettica degli oli di oliva vergini viene effettuata mediante un Panel test, secondo il metodo stabilito dal Consiglio Oleicolo Internazionale (COI). La valutazione organolettica ha la stessa importanza degli altri indici di qualità e la non conformità a uno soltanto dei quattro parametri è una condizione sufficiente affinché un olio di oliva subisca una declassazione merceologica.

Il gusto viene percepito attraverso le sensazioni generate nei bottoni gustativi, strutture situate sulla lingua e altre parti della bocca (palato molle, faringe, epiglottide e primo tratto dell'esofago). Tali strutture sono contenute nelle papille gustative che hanno la forma di protrusioni e pieghe. All'interno dei bottoni gustativi vi sono le cellule gustative (o recettori) sormontate da estroflessioni filiformi, i microvilli, che catturano le molecole sapide veicolate dalla saliva e le mettono in contatto con i recettori. Da qui partono impulsi ai nervi gustativi e il segnale della sensazione gustativa raggiunge il cervello, in particolare la corteccia primaria e secondaria, per l'elaborazione del gusto, sia nella componente reale che in quella "affettiva", in cui prevale una risposta comportamentale alla sensazione percepita. Le papille gustative sono di diverso tipo e sono localizzate in punti diversi della lingua per avvertire i diversi sapori: dolce (parte anteriore), salato (parte laterale anteriore), acido (parte laterale posteriore) e amaro (parte posteriore). Nella valutazione sensoriale degli oli di oliva attraverso il gusto viene accertata quasi esclusivamente la nota amara. Anche il senso dell'olfatto viene impiegato nella valutazione sensoriale dell'olio. Durante l'ispirazione vengono messe in contatto particelle microscopiche con i neuroni olfattivi, responsabili della percezione odorosa. Le estremità dei neuroni sono rivolte verso la cavità nasale e le loro ciglia sono dotate di membrane su cui sono localizzati recettori specifici che entrano in gioco quando le ciglia catturano una particella inalata. Quando la sostanza inalata interagisce con il recettore la sua energia chimica viene trasformata in segnale elettrico che viene inviato al cervello attraverso flussi di ioni. Questo sistema permette di inviare informazioni alla base del cervello per l'interpretazione.

3.3.1 Assaggio dell'olio

Affinché un olio di oliva possa essere classificato come extravergine è necessario che un gruppo di assaggiatori addestrati, definito Panel, lo assaggi, lo valuti e lo ritenga privo di difetti organolettici. Il Panel Test è l'analisi delle caratteristiche organolettiche eseguita dal Panel. L'addestramento dei membri del Panel è necessario per normalizzare le condizioni di assaggio e minimizzare così le variabili legate alla risposta allo stimolo sensoriale e all'innescarsi di fattori psichici e ambientali. Ogni assaggiatore deve esprimere il suo giudizio, in maniera indipendente dagli altri, compilando una scheda di valutazione, in cui esprime giudizi sulla presenza e l'intensità

dei pregi (fruttato, amaro e piccante) e di eventuali difetti (rancido, muffa, riscaldamento, avvinato...). La tecnica di assaggio consiste nel valutare dapprima la sensazione olfattiva e successivamente procedere con la valutazione gustativa. A questo punto si esprime una valutazione che sintetizza le sensazioni olfattive e gustative, sia positive che negative, memorizzate durante le fasi di assaggio. Dalla valutazione sensoriale di ciascun assaggiatore si calcola la mediana e il coefficiente di variazione robusto (CVR) che indica la variabilità dei valori riportati e indica l'attendibilità del Panel. La valutazione sensoriale viene ritenuta valida quando il valore di CVR è inferiore o uguale al 20%.

3.3.2 Attributi positivi e negativi

Positivi:

- fruttato: è l'insieme delle sensazioni olfattive dipendenti dalla varietà delle olive e dalle caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi, verdi o maturi, percepite per via diretta o retronasale. Si definisce verde o matura a seconda che le sensazioni olfattive ricordino quelle dei frutti verdi o maturi.
- amaro: sapore elementare caratteristico dell'olio ottenuto da olive verdi o invaiate, percepito dalle papille caliciformi che formano la V linguale.
- piccante: sensazione tattile pungente tipica di oli prodotti all'inizio della campagna olearia, percepita in tutta la cavità boccale, in particolare in gola.

Negativi principali:

- riscaldamento/morchia: flavor caratteristico di un olio ottenuto da olive ammassate, che hanno subito una fermentazione anaerobica oppure tipico di olio rimasto a contatto con residui di decantazione.
- muffa/umidità: flavor tipico di un olio ottenuto da olive conservate in ambiente umido che ha favorito lo sviluppo di funghi e lieviti.
- avvinato/inacetito: flavor che ricorda quello di vino e aceto. È causato dalla fermentazione che comportato lo sviluppo di acido acetico, acetato di etile ed etanolo.
- rancido: tipico di un olio che ha subito un processo ossidativo

Altri attributi negativi:

Metallico, verme, cotto, fieno/legno, terra, acque di vegetazione, legno umido.

A seconda dei risultati riportati, gli oli di oliva vengono classificati, secondo il Reg. UE 640/2008 come indicato in Tabella 4.

Tabella 4. Classificazione degli oli di oliva secondo la valutazione organolettica

olio extravergine di oliva	mediana del difetto = 0 mediana del fruttato > 0
olio di oliva vergine	mediana del difetto $\leq 3,5$ mediana del fruttato > 0
olio di oliva lampante	mediana del difetto > 3,5 oppure mediana del difetto $\leq 3,5$ e mediana del fruttato = 0

4. La spettroscopia nel vicino infrarosso (near infrared, NIR)

4.1 Principali tecniche non distruttive

Le metodologie non distruttive sono numerose e vengono differenziate tra loro in base al proprio principio chimico-fisico di funzionamento. Possiamo distinguere le seguenti tecniche:

- conduttività elettrica
- spettroscopia nel visibile (Vis)
- spettroscopia nell' infrarosso (IR)
- vibrazioni acustiche
- ultrasuoni
- risonanza magnetica nucleare (RMN)
- raggi X
- emissione di composti volatili

Rispetto alle altre, la spettroscopia nel vicino infrarosso (Near infrared, NIR) presenta diversi vantaggi legati non solo alla buona penetrazione nel tessuto della matrice e all'ampio campo di applicazione di questa tecnica, ma anche alla sua semplicità e rapidità di applicazione e alla minima preparazione del campione necessaria (Xiaobo *et al.*, 2010; Nicolai *et al.*, 2007; Burn e Ciurczak, 2008; Rajendran, 2005).

4.2 Concetti base di spettroscopia NIR

La radiazione nel vicino infrarosso copre l'intervallo dello spettro elettromagnetico compreso tra 780 e 2500 nm (o anche 1100-2500 nm). La spettroscopia NIR consiste nell'irradiare il prodotto e misurare la radiazione, riflessa o trasmessa. Durante la penetrazione della radiazione nel prodotto, le sue caratteristiche spettrali variano attraverso la lunghezza d'onda, sia per la dispersione (*scattering*) della luce che per i processi di assorbimento. Questa variazione dipende dalla composizione

chimica del prodotto così come le proprietà dello *scattering*, sono variabili correlate alla microstruttura della matrice (Nicolai *et al.*, 2007; Ruiz-Altisent *et al.*, 2010). Attraverso la spettroscopia NIR è possibile determinare contemporaneamente diversi componenti per lo stesso campione a partire da una singola misurazione, ottenendo informazioni rapide senza trattamenti chimici e in maniera ecosostenibile (Moros *et al.*, 2010). Le informazioni contenute nella curva spettrale vengono poi impiegate per predire la composizione chimica del campione, estraendo solo le variabili di interesse. Generalmente la spettroscopia NIR viene utilizzata in combinazione con tecniche di statistica multivariata (chemometria) per analisi di tipo quali-quantitativo allo scopo di trarre solo le informazioni necessarie dal complesso insieme di spettri (Nicolai *et al.*, 2007; Xiaobo *et al.*, 2010). La chemometria è utile per rilevare le informazioni nascoste negli spettri. Tuttavia le bande di assorbimento ampie e deboli non consentono sempre un'interpretazione indubbia. Inoltre, ci sono altri fattori che aumentano la complessità degli spettri: bande di assorbimento dell'acqua, effetti *scattering*, rumore dello strumento, complessità del campione ed effetti dell'ambiente e della matrice (Teixeira *et al.*, 2013). Per ampliarne il potenziale, nella spettroscopia NIR vengono incluse le tecniche di immagine multi- e iper-spetttrale che forniscono informazioni di tipo spaziale. L'immagine iperspettrale combina le analisi di immagine convenzionale con la spettroscopia, fornendo dati su forma, dimensione, struttura, oltre ai dati spettrali. La multispettrale ha un minor numero di piani spettrali, soltanto quelli che interessano le misurazioni quali-quantitative e/o discriminanti (Nicolai *et al.*, 2007).

4.2.1 Principio fisico-chimico

Gli atomi dei composti organici sono legati tra loro da legami covalenti ed elettrovalenti per formare molecole che sono costantemente in movimento, a causa della natura dei legami e delle cariche elettrostatiche presenti sugli atomi che le formano, questa condizione viene considerata come lo stato fondamentale della molecola. Ogni molecola vibra a frequenze corrispondenti alla regione infrarossa dello spettro elettromagnetico. Dalle vibrazioni molecolari si originano le armoniche (*overtones*) e i corrispondenti *combination tones* che si manifestano nell'infrarosso e nel vicino infrarosso. Le vibrazioni molecolari possono essere di tipo *stretching* (si ha uno stiramento o una compressione del legame tra atomi) o *bending* (si verifica una variazione o un cambiamento dell'angolo di legame tra atomi e sul piano del legame

stesso), che assorbono a lunghezze d'onda specifiche o a frequenze energetiche del vicino infrarosso, a seconda del tipo di legame.

Quando le molecole vengono irradiate cambia il loro stato energetico a spese dell'energia assorbita dalla fonte esterna. I cambiamenti avvengono solo secondo multipli del 'quanto' (si parla di fotone nel caso della radiazione) secondo la relazione $E=h\nu$ (h è la costante di Planck). Quando una quantità di materia viene irradiata con radiazione infrarossa, alcune molecole effettuano un salto energetico dallo stato fondamentale al primo stato eccitato, un numero inferiore di molecole al secondo e un numero ancora più basso al terzo. Le molecole C-H, O-H e N-H sono in grado di assorbire nel vicino infrarosso, ed esistono delle relazioni tra la conformazione di uno spettro e la corrispondente composizione chimica.

4.3 Strumentazione e configurazioni

Uno spettrofotometro NIR è costituito da una fonte di luce (di solito una luce alogena con bulbo a tungsteno), un monocromatore, un rivelatore (o detector) e dei componenti ottici come lenti, collimatori, separatore di luce (beam splitter), sfere integranti e fibre ottiche.

Per convenzione gli spettrofotometri vengono classificati in base al tipo di monocromatore, che è il dispositivo che scompone la luce per permettere di analizzarne l'intensità in funzione della lunghezza d'onda. Tale dispositivo può essere: Filter, Scanning, Fourier Transform, Photodiode array (PDA), Acoustic optic tunable filter (AOTF) o Liquid crystal tunable Filter (LCTF).

L'acquisizione degli spettri può avvenire attraverso 4 diverse modalità di misurazione:

- transmittanza
- riflettanza
- transflettanza
- interattanza

Nella modalità di trasmittanza, la luce incidente si propaga attraverso il campione e viene misurata quando fuoriesce da esso, in un punto all'opposto della fonte di luce. A volte, per campioni solidi, il detector viene posizionato a 90° rispetto alla fonte di luce. Nella riflettanza la fonte di luce e il detector sono posizionati dalla stessa parte. Per evitare il riflesso delle superfici, i rivelatori sono posizionati a 45° rispetto al piano del campione. In alcuni casi viene aggiunta una sfera integrativa per concentrare sia la luce riflessa dal campione che per catturare quella che proviene da diverse posizioni. La transflettanza è una combinazione dei due modi citati sopra. Il campione viene posizionato come nel caso della riflettanza, ma il riflettore è all'opposto della fonte di luce, sul lato più distante dal campione. La luce riflessa che viene trasmessa attraverso il campione torna indietro ancora attraverso il campione fino al detector. L'interattanza è anch'essa una combinazione delle prime due modalità, ma riguarda soltanto i campioni solidi. In questa modalità il campione viene illuminato da un fascio di fibre ottiche a diretto contatto con la superficie del campione. La luce si propaga nel campione ed interagisce con il suo interno attraverso la trasmittanza, la riflettanza o l'assorbanza. I fasci della fibra sono posizionati dallo stesso lato delle fonti e progressivamente riportano la luce che si è propagata dal campione al rivelatore. Il contatto diretto tra il bundle e il campione elimina l'effetto del riflesso della superficie e massimizza la profondità di penetrazione (Alander *et al.*, 2013). Nel selezionare il setup di misura è importante sapere che la penetrazione della radiazione NIR nel prodotto diminuisce con la profondità in modo esponenziale (Ozaki *et al.*, 2007).

4.4 Chemometria o tecniche di analisi multivariata

La chemometria è la scienza che mette in relazione i dati ottenuti da analisi o misurazioni chimiche attraverso processi matematici e statistici per la corretta interpretazione dei risultati. Più correttamente viene definita dalla International Chemometrics Society come *'disciplina che usa metodi matematici e statistici per progettare, selezionare ed ottimizzare procedure ed esperimenti, estrarre la massima informazione dall'analisi dei dati, computare una rappresentazione grafica di tale informazione'*.

Poiché l'acqua è il costituente chimico più importante di molti prodotti ortofrutticoli ed è in grado di assorbire fortemente la radiazione nel vicino infrarosso,

gli spettri NIR di questi prodotti sono composti essenzialmente da un ampio set di armoniche e bande di combinazione che rendono ancora più complicato lo spettro per la complessità della loro composizione chimica. A ciò si deve aggiungere che lo spettro può essere ulteriormente complicato da quelle lunghezze d'onda che dipendono da effetti dello *scattering*, dall'eterogeneità del tessuto, dal rumore dello strumento, dall'effetto dell'ambiente nonché da altre fonti di variabilità. Questo può comportare delle difficoltà nell'assegnare una specifica banda di assorbimento a degli specifici gruppi funzionali, che siano legati soltanto ai componenti chimici. La chemometria è necessaria per estrarre le informazioni sugli attributi di qualità nascosti nello spettro NIR. Le tecniche di regressione insieme ai pretrattamenti spettrali rimuovono tutte le informazioni irrilevanti (Nicolai *et al.*, 2007). La combinazione tra spettroscopia vibrazionale e chemometria fornisce modelli di calibrazione per specifiche analisi e mezzi di classificazione/discriminazione (Moros *et al.*, 2010).

Generalmente le tecniche chemometriche vengono suddivise in due categorie principali: non supervisionate e supervisionate. Nelle prime, la suddivisione in cluster degli elementi a più variabili avviene in base a relazioni funzionali tra gli elementi stessi. Non c'è necessità che si conosca il campione analizzato. Nelle tecniche supervisionate invece, l'attribuzione ad una classe è data da una variabile "risposta". I modelli multivariati forzano per l'attribuzione verso una classe prefissata, in genere sono più performanti dei primi. Le tecniche non supervisionate sono maggiormente utilizzate in senso esplorativo quando l'obiettivo è quello di analizzare o visualizzare (es. Principal Component Analysis, PCA) le relazioni di aggregazione non forzata (supervisionata) tra gli elementi. Sono possibili due metodi: il modellamento e la classificazione vera e propria. Nella classificazione l'elemento analizzato viene attribuito dal modello a una classe predeterminata. In questo caso devono essere presenti almeno due classi di attribuzione. Nel metodo di classificazione si utilizza la matrice di confusione (confusion matrix) per la corretta classificazione. Nei modelli supervisionati sono presenti una fase di calibrazione e una di validazione. Nel modellamento invece, l'elemento considerato può essere attribuito a una delle classi predeterminate oppure a nessuna di esse (in questo caso il campione è considerato come outlier). Viene calcolata una "probabilità di predizione" e un valore minimo di classificazione per ogni classe e l'efficienza del metodo viene indicata con i valori di sensibilità e specificità. La sensibilità (sensitivity) è la percentuale di specie della

categoria, con la specificità (specificity) si intende la percentuale di specie di categorie differenti, rigettate dal modello di classe (Menesatti, 2010).

4.4.1 Pretrattamento dei dati

Esistono essenzialmente 4 tipi di pretrattamento:

- a) metodi di riduzione del rumore
- b) metodi di correzione della linea di base
- c) metodi di miglioramento della risoluzione
- d) metodi di *centering* e normalizzazione

a) Il rumore può essere generato da diversi fattori di origine chimica e/o fisica che interferiscono con l'acquisizione dei dati spettrali. Si può distinguere il rumore di alta frequenza che viene associato al detector dello strumento e ai circuiti elettrici, da quello di bassa frequenza causato dalla deviazione (*drift*) dello strumento durante le fasi di acquisizione. Quest'ultimo tipo di difetto è più difficile da rimuovere perché spesso somiglia all'informazione reale. Per pretrattare questo tipo di disturbo è necessario applicare una "smussatura" (*smoothing*) per ridurre il disturbo di alta frequenza. I metodi più comunemente usati sono il metodo Savitzky-Golay e quello della media mobile. Il metodo Savitzky-Golay si basa sul concetto che nella vicinanza di un punto di misurazione, uno spettro possa essere modellato (fittato) da polinomi di basso grado usando una regressione minima quadrata, o Least Square Regression (LSR). Quello della media mobile consiste nel replicare ogni lettura per ogni variabile come una media pesata tra la stessa e i vicini più prossimi.

È possibile rimuovere sia i disturbi di alta che di bassa frequenza attraverso il metodo delle increspature (*Wavelets*) che consiste nel prendere uno spettro e trasformarlo nel campo delle piccole onde per poi tornare nel dominio spettrale. Questa tecnica è simile alla trasformata di Fourier, ma applicando un modello più sofisticato. Si agisce su dati modellati oltre una certa soglia stabilita dall'operatore e tutti i dati sotto tale soglia vengono persi. Questo permette di ottenere uno spettro chiaro e funzionale per le analisi.

b) La linea di base può slittare per varie ragioni. Si può rappresentare uno spettro come:

$$A(\lambda) = \alpha A_0(\lambda) + \beta + e(\lambda)$$

In cui α è il fattore amplificatore; $A_0(\lambda)$ è lo spettro reale; β è la compensazione della deviazione; e è il disturbo.

Ci sono diversi modi per eliminare o ridurre gli effetti di α e β :

- Metodo delle derivate
- Multiplicative Scatter Correction (MSC)
- Standard Normal Variate (SNV)

Il metodo delle derivate è stato impiegato a lungo come pretrattamento per lo slittamento della linea di base. La più usata è la seconda derivata. I picchi sovrapposti nello spettro originale vengono separati nello spettro di seconda derivata, inoltre con questo metodo si rimuovono le variazioni della linea di base additive e moltiplicative dello spettro originale. Poiché lo spettro ha valori discreti, il calcolo delle derivate di vario ordine è dato dalle differenze algebriche tra dati presi a lunghezze d'onda a brevi distanze. Le derivate vengono calcolate con il metodo Savitzky-Golay che rende un numero di bande più facilmente rilevabili.

Il metodo MSC è valido per correggere le variazioni verticali della linea di base (*additive baseline variation*) e le inclinazioni della linea di base (*multiplicative baseline variation*). Si basa sul fatto che lo scattering della luce ha una dipendenza diversa dalla lunghezza d'onda rispetto all'assorbimento della luce basata sulla chimica. Quindi si possono utilizzare i dati da molte lunghezze d'onda per distinguere tra assorbimento e scattering. In generale MSC migliora la linearità.

Il metodo SNV viene applicato su ogni spettro individualmente. Consiste nel calcolare la media e la deviazione standard per tutti i punti dello spettro, la media viene quindi sottratta dall'assorbimento per ogni dato e il risultato viene diviso per la deviazione standard.

c) È un pretrattamento importante in caso di bande sovrapposte e necessità di mettere in risalto di bande oscure. Per migliorare la risoluzione si utilizzano le

differenze tra spettri, il *mean centering* e l'*auto-convolution* di Fourier. La differenza si calcola sottraendo uno spettro dall'altro. È un sistema efficace nell'indagare le differenze di slittamento (*shift*) e i cambiamenti tra due spettri. Si impiega per analizzare perturbazioni che dipendono dagli spettri NIR come temperature, pH o concentrazione.

d) Per *mean centering* si intende un aggiustamento dei dati con riposizionamento del centroide all'origine del sistema di coordinate. Ogni spettro *mean centering* può essere considerato come uno spettro della differenza tra lo spettro individuale e uno mediato. Con la *Normalisation* si effettua un accomodamento dei dati per equalizzare la magnitudo di ogni campione. Si può effettuare attraverso due procedure, vettori normalizzati o normalizzazione media.

In generale, le fasi dell'analisi chemometrica dei dati spettrali prevedono il pretrattamento dei dati spettrali, la calibrazione, la validazione e l'ottimizzazione del modello matematico. Dopo il pretrattamento dei dati, l'analisi chemometrica prevede la fase di pre-modellamento, in cui dall'intero set di dati a disposizione vengono selezionati set di dati per la calibrazione e la validazione. I campioni impiegati per la calibrazione devono essere selezionati per la loro variabilità, non solo in base al numero. Generalmente si opta per utilizzare 2/3 del dataset per la calibrazione (training set) e il restante per la validazione (test set). A questa, segue la fase di modellamento in cui viene creato un modello che metta in relazione le proprietà del campione con i valori di assorbanza registrati a determinate lunghezze d'onda. Si procede poi con la valutazione del modello generato (Moros *et al.*, 2010; Alander *et al.*, 2013), in cui si stima la prestazione dei modelli ottenuti in predizione.

In base alle finalità di impiego, classificazione o quantificazione, viene selezionato un modello matematico. Tra gli algoritmi di classificazione, i più utilizzati sono: Linear Discriminant Analysis (LDA), Quadratic Discriminant Analysis (QDA), k-Nearest Neighbors (kNN), Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA), Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA).

Nel secondo caso vengono adottate: Multiple Linear Regression (MLR), Principal Components Regression (PCR). Partial Least Squares regression (PLS).

4.5 Applicazioni della spettroscopia NIR su olive e olio di oliva

Alcune qualità specifiche delle olive come consistenza, contenuto in olio, colore e contenuto in acidi grassi oltre a delle caratteristiche chimiche qualitative delle drupe e del loro olio, sono state indagate attraverso la spettroscopia NIR (Kavdir *et al.*, 2009; León *et al.*, 2004) e dai riscontri ottenuti, alcune tecniche spettroscopiche si possono ritenere applicabili a livello industriale. La qualità dell'aspetto esterno delle olive è determinante per l'industria dell'olio e per il mercato delle olive da tavola, infatti, è l'apparenza e l'eventuale presenza di danni sulla superficie che influenza la scelta dei consumatori. Inoltre, la presenza di danneggiamenti si ripercuote sulla composizione dell'olio, innescando alterazioni chimiche e reazioni biochimiche che incidono negativamente sulla qualità finale. Infatti, la presenza di ammaccature o danneggiamenti sulla superficie non riguarda solo l'aspetto esteriore, poiché la rottura dei tessuti cellulari, in conseguenza del danno subito, tende a rilasciare fluidi intracellulari che causano reazioni enzimatiche alteranti nonché l'ossidazione chimica dei lipidi e della frazione fenolica (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2013; Segovia-Bravo *et al.*, 2009). Progressivamente si sviluppa un graduale imbrunimento nell'area interessata dall'impatto, che diviene visibile già dopo un'ora dall'impatto stesso. La presenza di queste aree scure rende il prodotto inaccettabile agli occhi del consumatore e pertanto viene rifiutato anche dall'industria. Studi su impatti e conseguenti imbrunimenti sono stati condotti da Jiménez-Jiménez *et al.* (2012; 2013) allo scopo di indagare le potenzialità della spettroscopia NIR di distinguere tra olive sane e danneggiate. Altri studi sull'aspetto esterno sono stati condotti da Guzman *et al.* (2013) su olive con diversi difetti (lacerazioni, danni da gelo, polpa danneggiata, cicatrici), anche con spettroscopia Raman (Guzman *et al.*, 2012).

Sulle olive la spettroscopia è stata anche applicata per indagare alcune caratteristiche fisiche, considerate indice di qualità (Morales-Sillero *et al.*, 2011). Moscetti *et al.* (2015) hanno investigato l'applicabilità della spettroscopia NIR per rivelare le olive colpite da *Bactrocera oleae*, o mosca dell'olivo. La spettroscopia NIR è stata applicata da numerosi Autori per indagare parametri chimici delle olive, sia destinate all'estrazione di olio che per la produzione di olive da tavola. Alcuni hanno analizzato questi parametri testando NIR portatili direttamente sulle olive ancora sull'albero per investigare l'andamento di tali caratteristiche durante lo sviluppo della drupa, come umidità, contenuto in olio e acidità libera (Cayuela *et al.*, 2009; Cayuela e

Camino, 2010), per individuare il miglior periodo di raccolta (Gracia e León, 2011), l'andamento della frazione fenolica (Bellincontro *et al.*, 2012) e del contenuto in olio (Bellincontro *et al.*, 2013), e allo scopo anche di poter selezionare genotipi (León-Moreno, 2012). Sono stati condotti i primi studi sull'applicazione on-line della spettroscopia NIR (Salguero-Chaparro *et al.*, 2013a; Salguero-Chaparro e Peña-Rodriguez, 2014) e per controllare la presenza di erbicidi residui (Salguero-Chaparro *et al.*, 2013b). Come per l'olio, anche nel caso delle olive intatte è possibile studiarne l'autenticità (Casale *et al.*, 2010; Oliveri *et al.* 2013; Dupuy *et al.* 2010).

Per quanto riguarda l'olio extravergine d'oliva, oggi il mercato richiede prodotti di qualità superiore. Pertanto, anche per quanto riguarda l'olio extravergine di oliva, caratterizzato da una complessità di fattori (genetica, ambiente, tecniche agronomiche e di estrazione) che concorrono a influenzarne la composizione chimica (Servili *et al.*, 2004), la possibilità di determinare on-line, in modo semplice e tempestivo, la composizione chimica ed i caratteri sensoriali dell'olio rappresenta un passaggio fondamentale per interventi tecnologici di ottimizzazione del prodotto. Al contrario delle tradizionali analisi chimiche, che richiedono una preparazione del campione, tempi lunghi di attesa, costi elevati, personale impiegato altamente specializzato, un notevole impatto ambientale e l'utilizzo di complesse strumentazioni, la possibilità di poter verificare in modo semplice e affidabile la qualità, la genuinità e la tracciabilità dell'olio extravergine di oliva rappresenta un'evoluzione importante per la ricerca scientifica del settore attenta a testare tecniche analitiche alternative, non distruttive e in grado di lavorare a vari stadi del processo produttivo.

La spettroscopia NIR associata a procedure chemometriche offre la possibilità di valutare la qualità dell'olio extravergine di oliva, uno dei prodotti italiani più a rischio di frodi e di sofisticazioni. Molte ricerche hanno, infatti, dimostrato l'efficienza di questa tecnica per determinare in modo semplice e rapido numerosi parametri qualitativi dell'olio (acidità libera, numero di perossidi, indici spettrofotometrici UV, stabilità ossidativa), nonché per caratterizzarne la composizione chimica relativamente ai composti sia maggiori che minori.

La possibilità di determinare l'acidità libera degli oli per mezzo della spettroscopia NIR è stata dimostrata (Armenta *et al.*, 2007; Bendini *et al.* 2007). Alcuni studi hanno dimostrato la capacità di questa tecnica spettroscopica di stimare la

componente acidica degli oli di oliva, in alternativa ai metodi gas-cromatografici (Mignani *et al.*, 2008; Mossoba *et al.* 2013; Casale *et al.* 2012; Galtier *et al.* 2007). Lo stesso è stato fatto per la determinazione del numero dei perossidi e degli indici spettrofotometrici (Armenta *et al.* 2007; Watiez *et al.* 2013; Mignani *et al.* 2008), per valutare la stabilità ossidativa dell'olio, che ne indica lo stato di conservazione (Cayuela Sánchez *et al.* 2013; Plard *et al.* 2013; Maggio *et al.* 2011). Sulla valutazione della componente fenolica negli oli extravergini hanno lavorato Inarejos-García *et al.* (2013) e Sinelli *et al.* (2010a), e per lo squalene Galtier *et al.* (2007).

Per controllare la veridicità delle dichiarazioni riportate nelle etichette degli oli extravergini e aggiunte fraudolente di oli estranei all'olio extravergine è stata applicata la spettroscopia NIR (Casale e Simonetti, 2014; Armenta *et al.*, 2010), per indagare adulterazioni con olio di girasole, mais e miscele di altri oli di origine vegetale (Özdemir e Öztürk, 2007; Öztürk *et al.*, 2010), e aggiunta di olio d'oliva raffinato (Wójcicki *et al.*, 2015). Diversi Autori hanno anche cercato di testare questa tecnica sull'identità genetica e sull'origine geografica degli oli extravergini di oliva (Mignani *et al.*, 2008; Woodcock *et al.*, 2008; Devos *et al.*, 2014; Oliveri *et al.*, 2011; Casale *et al.*, 2008; Galtier *et al.* 2007; Galtier *et al.*, 2011; *et al.*, 2008; Sinelli *et al.*, 2010b; Casale *et al.*, 2010a; 2010b Dupuy *et al.*, 2010; Bevilacqua *et al.*, 2012; Oliveri *et al.*, 2011).

5 Pubblicazioni

POSTHARVEST BIOLOGY AND TECHNOLOGY 99: 58-62 (2015)

5.1 Feasibility of NIR spectroscopy to detect olive fruit infested by *Bactrocera oleae*

Roberto Moschetti^a, Ron P. Haff^b, Elisabetta Stella^a, Marina Contini^c, Danilo Monarca^a, Massimo Cecchini^a, Riccardo Massantini^{c,*}

^a Department of Science and Technology for Agriculture, Forest, Nature and Energy, Tuscia University, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

^b United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Western Regional Research Center, 800 Buchanan St., Albany, CA 94710, United States

^c Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest System, Tuscia University, Via S. Camillo de Lellis snc, 01100 Viterbo, Italy

* corresponding author

Abstract

Olive fruit fly infestation is a significant problem for the milling process. In most cases, damage from insects is ‘hidden’, i.e. not visually detectable on the fruit surface. Consequently, traditional visual sorting techniques are generally inadequate for the detection and removal of olives with insect damage. In this study, the feasibility of using NIR spectroscopy to detect hidden insect damage is demonstrated. Using a genetic algorithm for feature selection (from 2 to 6 wavelengths) in combination with linear discriminant analysis (LDA), quadratic discriminant analysis (QDA) or k-nearest-neighbors (kNN) routines, classification error rates as low as 0.00% false negative, 12.50% false positive, and 6.25% total error were achieved, with an AUC value of 0.9766 and a Wilk’s λ of 0.3686 ($P < 0.001$). Multiplicative scatter correction, Savitzky–Golay spectral pre-treatment with 13 smoothing points and mean centering spectral pre-treatments were used. The optimal features corresponded to *Abs*[1108 nm], *Abs*[1232 nm], *Abs*[1416 nm], *Abs*[1486 nm] and *Abs*[2148 nm].

Keywords:

Olea europaea L., Insect damage, Acousto-optic tunable filter-near infrared spectroscopy, Discriminant analysis, Wavelengths selection

1. Introduction

Olea europaea is one of the most important and widespread fruit trees cultivated in the Mediterranean basin, where it has important environmental, economical and social significance. A portion of the olive production is processed for direct human consumption but most is used for the production of oil, for which worldwide consumption multiplied 6-fold over the last 30 years. Among the various vegetable oils, virgin olive oil is unique for many reasons, enclosing its chemical composition which differs from that of other vegetable oils used by humans, containing unique compounds that positively impact sensory, nutritional and health properties. The highest quality olive oils, denominated extra-virgin, contain a high concentration of these compounds. Extra-virgin olive oil is a key component of the Mediterranean diet and is considered, at least in part, to contribute to reduced incidence of cardiovascular diseases observed in this region (Katan *et al.*, 1995). The chemical composition and subsequent quality of extra-virgin olive oil depends entirely on the quality of the fruit from which it is derived. Thus, methods for improving fruit quality or removing damaged or defective fruit have a direct impact on the quality of oil produced.

Bactrocera oleae (olive fruit fly) is the most significant pest of olives worldwide (Daane and Johnson, 2010) and one of the most frequent causes of reduced olive oil quality. The detrimental effects are related to both the severity of infestation and on the stage of the fly development. Infestation occurs when the adult female pierces the fruit and lays eggs just under the surface. The developing larvae causes extensive damage by feeding, excavating deep tunnels which can reach the stone (Rice, 2000). This facilitates the penetration and development of microorganisms, with accompanying loss of fruit integrity and oil quality.

It has been demonstrated that infestation by *B. oleae* reduces oil yield and alters the chemical composition of the olive fruit, negatively affecting many olive oil qualitative parameters such as free acidity, peroxide value and ultraviolet absorption (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008). Moreover, the infested olives produce oil with a reduced content of antioxidant phenolics (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008; Gucci *et al.*, 2012) and an altered volatile compound profile (Angerosa *et al.*, 2004) leading to severe and unacceptable off-flavour. Consequently, the nutritional value and the sensory

properties of oil extracted from infested olives are compromised, and the product often does not conform to legal specification for extra-virgin or virgin oils.

Currently, the loss of oil quality due to infested olives is unavoidable, since processing procedures authorized by the European Union for virgin olive oil do not account for infestation. However, since not all olives in an infested lot are infested, an excellent product could be produced if good product could be separate from defective product. This is the underlying motivation to utilize Near-Infrared (NIR) spectroscopy for detection and removal of olives infested by *Bactrocera oleae*.

NIR spectroscopy has been proven effective for the detection of insects or insect damage in food commodities and seeds such as chestnut (Moscetti *et al.*, 2014a, 2014b), blueberry (Peshlov *et al.*, 2009), cherry (Xing and Guyer, 2008; Xing *et al.*, 2008), fig (Burks *et al.*, 2000), flour (Wilkin *et al.*, 1986), green soybean (Sirisomboon *et al.*, 2009), jujube (Wang *et al.*, 2010, 2011), mangoes (Haff *et al.*, 2013), seeds of the *Larix* species (Tigabu and Odén, 2004), seeds of *Picea abies* (Tigabu *et al.*, 2004), seeds of *Cordia africana* (Tigabu and Odén, 2002) and others. Insects and larvae can be detected directly, due to their hemolymph, lipids and/or chitin content (Rajendran, 2005), or indirectly due to subsequent damage such as internal browning or darkening, dehydration or fungi contamination (Wang *et al.*, 2011). However, on-line inspection systems for infestation of fresh produce, including olives, are still not in common use. NIR techniques have the potential to benefit the food market by reducing the risk of buying poor-quality products and consequently allowing compliance with consumer demands for uniform high-quality products (Butz *et al.*, 2005).

The objective of the present study was to investigate the feasibility of using the NIR spectroscopy for detection of olives infested by the olive fruit fly and identifying combinations of features (based on absorbance of light in the NIR band from 1100 to 2300 nm) having optimal discriminatory ability and testing different classification methods.

2. Materials and methods

2.1 Sample preparation

Approximately 1.2 kg of olives (*Olea europaea* L., cv. canino) were manually harvested on a local farm in Central Italy at the end of October, and were immediately

taken to the laboratory in appropriate thermal boxes. From these, 896 olives that were free from visual external impact damage and/or decay were selected. The fruit were kept at $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 24 h to allow for temperature and moisture equilibrium prior to NIR spectra acquisitions

2.2 NIR spectral acquisition

Olive spectra were acquired using a Luminar 5030 acousto-optic tunable filter-near infrared (AOTF-NIR) Miniature ‘Hand-held’ Analyzer (Brimrose Corp., Baltimore, USA). The instrument was equipped with a reflectance post-dispersive optical configuration, a pre-aligned dual beam lamp assembly and an indium gallium arsenide (InGaAs) array (range 1100–2300 nm, 2-nm resolution) with an integrating time of 60 ms. Two spectra were acquired on each of two opposite side of the fruit along the equatorial line and averaged. Each acquired spectrum was the average of 10 scans. The reference spectrum was automatically measured by the instrument as described by Cayuela and Weiland (2010). Diffuse reflectance spectra were acquired and transformed into absorbance ($A = \log R^{-1}$) using R 3.1.0 statistic software (CRAN, 2014). Immediately after the spectral acquisition, olives were dissected to visually determine presence or absence of olive fruit fly larvae, thus assigning each spectrum into infested (unsound) or not-infested (sound) classes.

2.3 Statistical analysis of NIR spectra

Each olive was modeled as a ‘data vector’, where the spectral absorbance values (otherwise called features) were vector components. Principle component analysis (PCA) was applied to evaluate between class similarity. The original spectral data was converted to score and loading vectors by PCA analysis. The screeplot criterion (Jolliffe, 2002) was used to select the required number of PCs for describing the dimensionality of the data.

Features for use in classification were extracted from the whole spectra. Features were extracted following spectral pretreatments including standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC), and Savitzky-Golay first, second and third derivatives (df , $d2f$ and $d3f$) with second order polynomial (from 5 nm to 13 nm smoothing points with a step of 4 nm) (Savitzky and Golay, 1964; Boysworth and

Booksh, 2008). For each dataset, mean centering (MC) was also tested. Data preprocessing (transformation and data reduction) can dramatically influence the final results of recognition for spectral data, which may contain highly correlated variables, noise and irrelevant information caused directly by scattering or adsorption of NIR light due to variable interaction of the various types of compounds (Wu *et al.*, 1996; Tallada *et al.*, 2011). Spectra pre-treatments can help remove the influence of pericarp thickness and skin condition, and enhance spectral differences between classes. However, spectral information that can be useful for the classification models could be lost in pretreatment process. The aforementioned preprocessing techniques were tested and the worst-fit pretreatments for classification purposes were discarded by evaluating the robustness and the accuracy of each model.

A genetic algorithm (GA) was used to select features for input to classification algorithms, with the obvious goal of selecting a series of wavebands which could describe the correlation between the predictor variables and the response variables (Xing *et al.*, 2008). The GA selects a small subset of spectral bands with biological or biochemical importance, which are representative of the entire spectra dataset. In this study, GA was used to seek n -feature subsets (where n ranged from 2 to 6) which are optimal surrogates for the whole dataset (Cerdeira *et al.*, 2013). A maximum of six features was chosen to minimize overfitting.

Sets of features selected by the GA were input into three different classification algorithms: linear discriminant analysis (LDA), quadratic discriminant analysis (QDA) and k -nearest neighbors (k NN). A cross validation procedure was performed for the selection of the optimal k nearest neighbors (where k ranged from 3 to 15). The smallest k among those having the lowest average error was selected (Massart *et al.*, 1988). LDA is a classification procedure based on Bayes' formula. This method renders a number of orthogonal linear discriminant functions equal to the number of categories minus 1. Thus for the case of two classes a single discriminant function is generated, allowing easier interpretation of the results. QDA is closely related to LDA and is often used when class-covariance matrices are not assumed to be identical. In case of large sample size and large differences between class-covariance matrices, QDA might outperform LDA. k NN is an alternative method much simpler than LDA and QDA in which classification is performed by computing the sample distance from each of the samples

in the training set, finding the k nearest ones and classifying the unknown to the class that has most members among these neighbors (Naes *et al.*, 2004).

Following the random subset selection method, the sample was split as follows: 50% of the samples were assigned to a training set (224 sound and 224 unsound fruits), 25% to a validation set (112 sound and 112 unsound fruits) and 25% to a test set (112 sound and 112 unsound fruits). The random subset selection circumvents overfitting problems and avoids overly optimistic results. No outlier selection was computed.

Classification results for each discriminant model were determined as the percent of false positives (fp, sound fruit classified as unsound), false negatives (fn, unsound fruit classified as sound), and total error (incorrectly classified samples). The receiver operating characteristics (ROC) analysis was performed for evaluating the performance of each discriminant model, and the respective ROC curve was plotted. The ROC curve contains a plot of the ‘false positive rate’ and the ‘true positive rate’ (fraction of positives correctly classified) (also respectively called ‘1-specificity’ and ‘sensitivity’) as a function of the threshold value. For each ROC plot the relative area under the ROC curve (AUC) was additionally used to evaluate the performance of each computed discrimination function (Moschetti *et al.*, 2013). Moreover, each feature subset was analyzed using multivariate analysis of variance (MANOVA), and the Wilks’ λ Test was used to determine if the differences between classes were significant. Data analyses were performed using R 3.1.0 statistical software in combination with MASS 7.3–32, mda 0.4–4, pcaMethods 1.54.0, prospectr 0.1.3 and class 7.3–10 R-packages (CRAN, 2014).

3. Results and discussion

The PCA analysis of data variations provides insight into the class distribution of the non-pretreated spectra (Fig. 1). The first two principal components (PCs) accounted for 98.34% of the variance. Score values for unsound olives were tightly clustered over the two-dimensional space, while scores for sound fruit were widely distributed. Mean-raw spectra showed higher absorbance in unsound fruit in the range of 1900 nm, and showed low absorbance between ~1100 nm and ~1400 nm, and between ~1550 and ~1860 nm (Fig. 1b), suggesting possible differences between the two classes.

Tables 1 and 2 summarize discriminant performances for LDA and QDA based on n -features subsets of pre-treated or untreated spectra. In both cases, the AUC and Wilk's λ values were well correlated with the total classification error. For QDA the correlation was weaker, although a high AUC still coincides with a low total classification error (Table 2, Trial no. 01). The results indicate that baseline correction was necessary to obtain the lowest classification errors and the best model accuracy in most cases. Mean centering improved the classification accuracy for most of the discriminant methods used, probably by enhancing the differences between spectra (Boysworth and Booksh, 2008).

The interpretation of NIR spectra is complicated by the fact that specific bands are composites of many bands containing information on various molecular vibration and generic functional groups. However, knowledge of sample chemical composition allows some speculation regarding the wavelengths selected for class discrimination: the major constituents in raw olives are water (~80.0%), lipids (~10.7%), carbohydrates (~6.3%), and fibers (~3.2%) (USDA, 2014).

In some cases, water could interfere with NIR analysis due to the strength and the broadband characteristics of water absorption (Rasco *et al.*, 1991; Peshlov *et al.*, 2009). Consequently, water bands may be excluded from the computations if the goal is to develop infestation–classification methods based on other minor constituents (Ghaedian and Wehling, 1997; Peshlov *et al.*, 2009). As stated earlier, however, for olives the change in water content due to infestation is expected to improve discriminant performances and the water bands were not excluded. In fact, in the case of qualitative analysis, the moisture content can be one of the most important factors for classifying samples (Tsuchikawa, 2007).

Features at ~1100–1250 nm and ~1400–1500 nm were frequently paired as features by the GA. Changes in absorbance in each of these wavelength regions are commonly associated with hydroperoxides and phenols related with the fruit fly damage. In fact, phenolic content has been reported to decrease as a consequence of the olive fruit fly attack (Gómez-Caravaca *et al.*, 2008; Tamendjari *et al.*, 2009). Highly infested olives generally exhibit a strong increase in peroxide value (Pereira *et al.*, 2004; Gucci *et al.*, 2012).

Differences in absorption in the water and protein/amino acid regions (~1170 nm, ~1400-1500 nm and ~2150-2250 nm) could be related to infestation as consequences of microbial growth and/or fruit processes to repair damaged tissue (Workman and Weyer, 2007). In fact, fungal growth also disrupts the internal tissues, affecting fruit density and firmness, and thus the overall information of the NIR spectra because of changes in light scattering. The microbe-damaged olive fruit have higher free acidity due to hydrolytic enzymes and lipolytic activity of bacteria and fungi (Pereira *et al.*, 2004; Mraicha *et al.*, 2010).

LDA and QDA results indicate good recognition. Data pre-processing, including data transformation and feature selection, improved recognition accuracy. Spectral data are usually affected by issues due to correlated variables, noise and irrelevant information. Removing or reducing non-relevant variability as well as selecting relevant features from the raw dataset were crucial for the development of accurate classification models.

The *k*NN model yielded the worst classification results (data not shown). Both LDA and QDA models were capable of performing accurate discrimination of unsound fruit. The accuracy of LDA and QDA generally depends on the dimensionality of the training set, the multivariate normal distribution of the data and whether the class covariances are equal. In this case, QDA outperformed LDA due to large differences between class-covariance matrices. The scoreplot (Fig. 1a) suggests a much larger variance for the sound vs. the unsound class.

The most accurate classification of 12.50% fp, 0.00% fn, and 6.25% total error was achieved using QDA (Table 2, Trial no. 01) using MSC, 13 point Savitsky-Golay filter and MC. Second best corresponded to 18.75% fp, 0.00% fn, and 9.38% total error, using LDA with MSC, 13 point Savitsky-Golay filter and MC. In terms of total error, QDA performed better than LDA, with a lower number of features and the same pretreatments. AUC values higher for QDA indicating superior discrimination. Spatial distribution plots (Fig. 2) illustrate posterior-probability differences between LDA and QDA. The application of the best QDA model is shown in Fig. 2b, in which only 14 sound olives (12.50%) were incorrectly classified, yielding an average accuracy of 93.75%.

Results of MANOVA indicate that Wilk's λ test (Tables 1 and 2) was significant at the $P < 0.001$ level, suggesting that the classes differ on the basis of the extracted features for LDA and QDA classifications. Wilk's λ compares group means, with a lower value indicating higher difference between the mean absorbance values of the classes. Thus, the higher statistical distance was observed in Trial no. 01, Table 1.

4. Conclusions

In general, the use of NIR spectroscopy in the long wavelength region (1100–2300 nm) as an automated, non-destructive and rapid means to detect larvae attack olives appeared feasible, with classification accuracy as high as almost 94%. Misclassified fruit were primarily assigned to sound olives. As such, NIR spectroscopy has the potential for detection of olive fruit fly infestation in olives. Optimal features selected for discriminant analysis comprised wavelengths that are generally associated with water, peroxides and phenols (~1100-1250 nm and ~1400-1500 nm).

Classification accuracy was highest for QDA with a 13 point SG filter, MSC and mean centering, yielding 0.00% fn, 12.50% fp and 6.25% total error. Second lowest error rates of 18.75% fp, 0.00% fn and 9.38% total error were obtained using LDA with a 13 point SG filter, MSC and mean centering. Nevertheless, the major advantages and disadvantages of the LDA should be taken into account prior to implementation of the classification model for an automated sorting system.

The methods used here provide the basis for a superior detection system in terms of sensitivity, selectivity, non-destructive analysis and automation. However, the number of wavelengths required in an online sorting device would be conditioned by the spectral pre-treatment used.

The good results obtained represent a promising step forward for sorting technologies employed by mill facilities. Moreover, the proposed NIR method could be useful as a screening tool for quality control and for studying olive fruit fly incidence directly in the orchard by using a portable spectrophotometer.

Finally, future research should include testing wavelengths not measured by the spectrophotometer used for this study, improving the class model simplicity, increasing the light-beam intensity, and/or combining other chemometric methods, as these could improve the accuracy and the robustness of the sorting system.

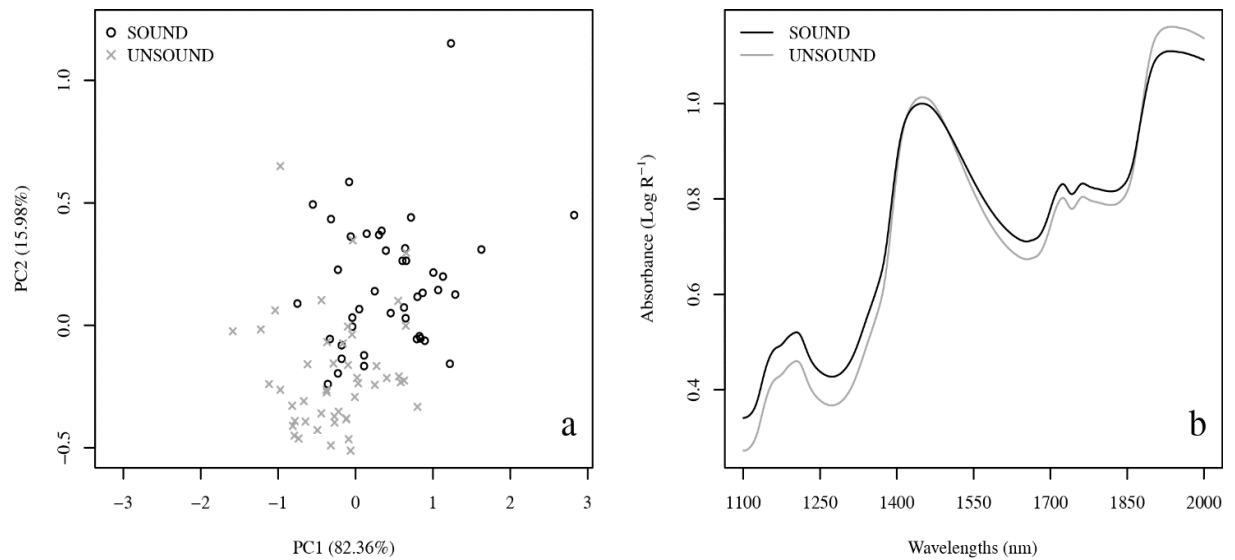


Fig.1. PCA score plot computed from the whole spectra acquired from not-infested (sound) and infested (unsound) olive fruit (a). Sound and unsound spectra at the range of 1100-2150 nm (b)

Table 1. Results based on pretreatments, GA and LDA performed on the spectra acquired from olive fruit. The selected features corresponded to the wavelengths yielding the lowest error rates of classification per each dataset.

Trial #	Dataset				Selected Features (nm)						Error rate (%)			AUC	Wilks' λ	Pr ($> F$)
	Scatt. C.	Norm.	SG*	Deriv.	1	2	3	4	5	6	fp	fn	total			
01	MSC	Yes	13	-	1178	1226	1246	1566	2150	2246	18.75	0.00	9.38	0.9531	0.3525	< 0.001
02	SNV	Yes	9	1st	1168	1420	1602	1712	-	-	12.50	6.25	9.38	0.9531	0.4590	< 0.001
03	MSC	Yes	13	-	1108	1232	1416	1486	2148	-	6.25	18.75	12.50	0.9570	0.3686	< 0.001
04	MSC	Yes	9	-	1232	1764	2248	-	-	-	12.50	18.75	15.63	0.9141	0.4658	< 0.001
05	SNV	-	5	1st	1420	1710	-	-	-	-	31.25	12.50	21.88	0.8984	0.5328	< 0.001

Table 2. Results based on pretreatments, GA and QDA performed on the spectra acquired from olive fruit. The selected features corresponded to the wavelengths yielding the lowest error rates of classification per each dataset

Trial #	Dataset				Selected Features (nm)						Error rate (%)			AUC	Wilks' λ	Pr ($> F$)
	Scatt. C.	Norm.	SG*	Deriv.	1	2	3	4	5	6	fp	fn	total			
01	MSC	Yes	13	-	1108	1232	1416	1486	2148	-	12.50	0.00	6.25	0.9766	0.3686	< 0.001
02	-	-	13	1st	1108	1168	1418	1466	1710	1984	6.25	12.50	9.38	0.9922	0.3758	< 0.001
03	-	Yes	13	1st	1138	1418	1464	-	-	-	12.50	18.75	15.63	0.9297	0.4588	< 0.001
04	SNV	-	9	1st	1168	1420	1602	1712	-	-	25.00	6.25	15.63	0.9531	0.4590	< 0.001
05	MSC	Yes	5	1st	1422	1712	-	-	-	-	31.25	12.50	21.88	0.8984	0.5874	< 0.001

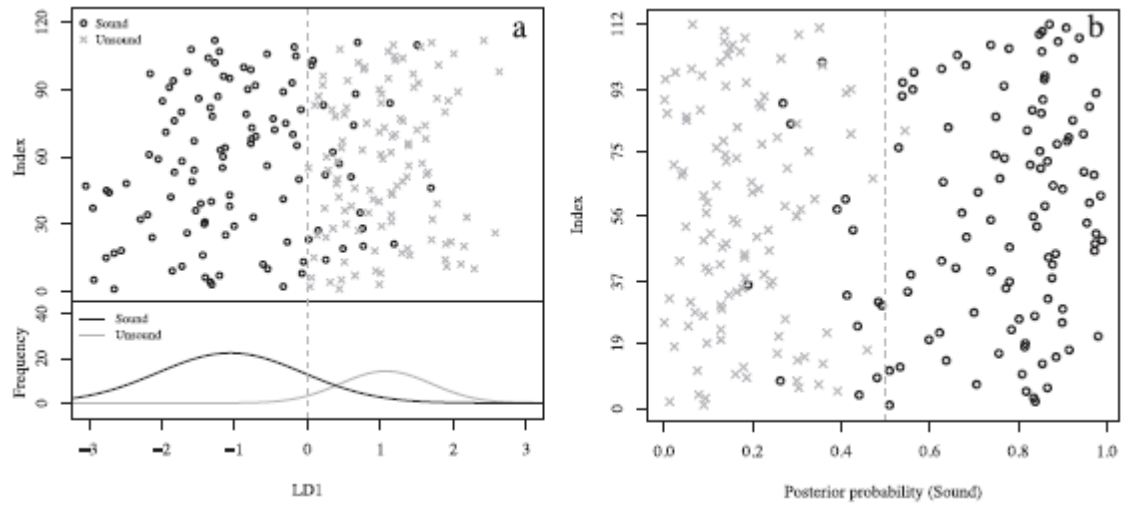


Fig.2 Class spatial distribution plot obtained from LDA (a) (Trial no.1, Table 2) models for each group of features selected. Lower part of the (a) represent the frequency plot of the LD1 function computed from the six selected features.

References

- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G., 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A* 1054, 17–31.
- Boysworth, M.K., Booksh, K.S., 2008. Aspects of multivariate calibration applied to near-infrared spectroscopy. In: Burns, D.A., Ciurczak, E.W. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis*. CRC Press, New York, NY, pp. 207–229.
- Burks, C., Dowell, F., Xie, F., 2000. Measuring fig quality using near-infrared spectroscopy. *J. Stored Prod. Res.* 36, 289–296.
- Butz, P., Hofmann, C., Tauscher, B., 2005. Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. *J. Food Sci.* 70, 131–141.
- Cayuela, J.A., Weiland, C., 2010. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. *Postharvest Biol. Technol.* 58, 113–120.
- Cerdeita, J.O., Silva, P.D., Cardima, J., Mihoto, M., 2013. Package ‘Subselect’ 0.12–3 for use with R. Selecting variable subsets, <http://cran.r-project.org/web/packages/subselect/> (accessed 04.28.14).
- CRAN, 2014. Comprehensive R Archive Network. CRAN, [_http://cran.r-project.org/_](http://cran.r-project.org/) (accessed 04.28.14).
- Daane, K.M., Johnson, M.W., 2010. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 151–169.
- Ghaedian, A., Wehling, R.L., 1997. Discrimination of sound and granary-weevil-larva-infested wheat kernels by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *J. AOAC Int.* 80, 997–1005.
- Gómez-Caravaca, A.M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., Cichelli, A., 2008. Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4577–4583.
- Gucci, R., Caruso, G., Canale, A., Loni, A., Raspi, A., Urbani, S., Taticchi, A., Esposto, S., Servili, M., 2012. Qualitative changes of olive oils obtained from fruits damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *HortScience* 47, 301–306.
- Haff, R.P., Saranwong, S., Thanapase, W., Janhiran, A., Kasemsumran, S., Kawano, S., 2013. Automatic image analysis and spot classification for detection of fruit fly infestation in hyperspectral images of mangoes. *Postharvest Biol. Technol.* 86, 23–28.
- Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*. Springer, New York, NY.

Katan, M.B., Zock, P.L., Mensink, R.P., 1995. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1368–1373.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Deming, S.N., Michotte, Y., Kaufman, L., 1988. *Chemometrics: a textbook*. In: *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands, pp. 339–355 (373–378).

Moscetti, R., Haff, R.P., Aernouts, B., Saeys, W., Monarca, D., Cecchini, M., Massantini, R., 2013. Feasibility of vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. *J. Food Eng.* 118, 1–7.

Moscetti, R., Haff, R.P., Saranwong, S., Monarca, D., Cecchini, M., Massantini, R., 2014a. Nondestructive detection of insect infested chestnuts based on NIR spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 87, 88–94.

Moscetti, R., Monarca, D., Cecchini, M., Haff, R.P., Contini, M., Massantini, R., 2014b. Detection of mold-damaged chestnuts by near-infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 93, 83–90.

Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S., Bouaziz, M., 2010. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food Chem. Toxicol.* 48, 3235–3241.

Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., Davies, T., 2004. *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK.

Pereira, J.A., Alves, M.R., Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., 2004. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars cobranca, osa, madural and verdeal transmontana. *Italian Journal of Food Science*, 16, 355–365.

Peshlov, B., Dowell, F., Drummond, F., Donahue, D., 2009. Comparison of three near infrared spectrophotometers for infestation detection in wild blueberries using multivariate calibration models. *J. Near Infrared Spectrosc.* 17, 203.

Rajendran, S., 2005. Detection of insect infestation in stored foods. *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 163–232.

Rasco, B.A., Miller, C.E., King, T.L., 1991. Utilization of NIR spectroscopy to estimate the proximate composition of trout muscle with minimal sample pretreatment. *J. Agric. Food Chem.* 39, 67–72.

Regolamento europeo N. 2568/91, della commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti (GU L 248 del 5.9.1991, pag. 1)

Regolamento europeo N. 640/2008 della commissione del 4 luglio 2008 che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti

- Rice, R., 2000. Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. Univ. Calif. Plant Prot. Q., 10. Univ. Calif., California, pp. 1–5.
- Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. Anal. Chem. 36, 1627–1639.
- Sirisomboon, P., Hashimoto, Y., Tanaka, M., 2009. Study on non-destructive evaluation methods for defect pods for green soybean processing by near-infrared spectroscopy. J. Food Eng. 93, 502–512.
- Tallada, J.G., Wicklow, D.T., Pearson, T.C., Armstrong, P.R., 2011. Detection of fungus infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging. Trans. ASABE 54, 1151–1158.
- Tamendjari, A., Angerosa, F., Mettouchi, S., Bellal, M.M., 2009. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. Grasas Aceites 60, 509–515.
- Tigabu, M., Odén, P., 2002. Multivariate classification of sound and insect-infested seeds of a tropical multipurpose tree, *Cordia africana*, with near infrared reflectance spectroscopy. Near Infrared Spectrosc. 10, 45.
- Tigabu, M., Odén, P.C., 2004. Simultaneous detection of filled, empty and insect-infested seeds of three *Larix* species with single seed near-infrared transmittance spectroscopy. New For. 27, 39–53.
- Tigabu, M., Odén, P.C., Shen, T.Y., 2004. Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. Can. J. For. Res. 34, 76–84.
- Tsuchikawa, S., 2007. Sampling techniques. In: Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. (Eds.), Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 133–144.
- USDA, 2014. National Nutrient Database for Standard Reference—Release 26. USDA, http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list_ (accessed 03.12.14).
- Wang, J., Nakano, K., Ohashi, S., 2011. Nondestructive detection of internal insect infestation in jujubes using visible and near-infrared spectroscopy. Postharvest Biol. Technol. 59, 272–279.
- Wang, J., Nakano, K., Ohashi, S., Takizawa, K., He, J.G., 2010. Comparison of different modes of visible and near-infrared spectroscopy for detecting internal insect infestation in jujubes. J. Food Eng. 101, 78–84.
- Wilkin, D.R., Cowe, I.A., Thind, B.B., McNicol, J.W., Cuthbertson, D.C., 1986. The detection and measurement of mite infestation in animal feed using near infrared reflectance. J. Agric. Sci. 107, 439–448.

Workman, J., Weyer, L., 2007. Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, London, UK.

Wu, W., Mallet, Y., Walczak, B., 1996. Comparison of regularized discriminant analysis linear discriminant analysis and quadratic discriminant analysis applied to NIR data. *Anal. Chim. Acta* 2670, 257–265.

Xing, J., Guyer, D., 2008. Comparison of transmittance and reflectance to detect insect infestation in Montmorency tart cherry. *Comput. Electron. Agric.* 64, 194–201.

Xing, J., Guyer, D., Ariana, D., Lu, R., 2008. Determining optimal wavebands using genetic algorithm for detection of internal insect infestation in tart cherry. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 2, 161–167.

5.2 Recenti sviluppi sull'impiego della spettroscopia NIR per il controllo qualitativo e la tutela degli oli extravergini di oliva

E. Stella¹, R. Moscetti¹, R. Massantini², D. Monarca¹, M. Cecchini¹, M. Contini^{2*}

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) - Università degli Studi della Tuscia - Via S.C. De Lellis - 01100 Viterbo - Italia

² Dipartimento di Innovazione dei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) - Università degli Studi della Tuscia - Via S.C. De Lellis - 01100 Viterbo - Italia

*email: mcontini@unitus.it

Riassunto

Sono riportati e discussi i risultati dei più recenti studi relativi all'impiego della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) per la caratterizzazione qualitativa dell'olio extravergine di oliva. I progressi della ricerca consentono di asserire che questa tecnica, abbinata a metodologie di elaborazione chemometrica dei dati spettrali, consente di valutare in maniera simultanea tutti gli aspetti qualitativi dell'olio: parametri analitici di legge, composizione chimica, proprietà organolettiche, salutistiche e nutrizionali, stima della shelf-life, identità varietale e geografica, accertamento della presenza di adulteranti. La spettroscopia NIR si presenta dunque come un potente e versatile mezzo di indagine degli oli extravergini, rapido, non invasivo, economico ed a basso impatto ambientale. La sua affidabilità è giunta ad un livello tale da poter essere impiegata con successo in sostituzione o in supporto alle classiche metodiche analitiche, sia per monitorare gli effetti delle variabili di processo sulla qualità dell'olio, sia per fini ispettivi.

Parole-chiave: olio extravergine di oliva, spettroscopia nel vicino infrarosso, chemometria, qualità, adulterazioni.

Recent advances on the use of NIR spectroscopy for qualitative control and protection of extravirgin olive oil

Abstract

Recent studies on near infrared (NIR) spectroscopy use for the qualitative characterization of extravirgin olive oil, are reported and discussed in this paper. The improvement of the research confirms that this method, combined with chemometric data analysis, allows to evaluate simultaneously all qualitative aspects of oil: analytical parameter by law, chemical composition, sensorial, health and nutritional properties, shelf-life estimation, varietal and geographic identity, presence of adulterants. NIR spectroscopy is a powerful and versatile tool to detect extravirgin olive oils, being fast, noninvasive, not expensive and environment friendly. By now NIR spectroscopy reliability allows to substitute and/or support traditional analytical techniques, both to monitor effects of processing on the oil quality and for check purpose.

Keywords: extravirgin olive oil, near infrared spectroscopy, chemometrics, olive oil quality, olive oil adulterations.

1. Introduzione

Il mercato degli oli extravergini d'oliva, altamente competitivo e globalizzato, richiede prodotti di alta qualità, le cui caratteristiche compositive sono condizionate da numerose variabili di natura genetica, ambientale, agronomica e tecnologica [1, 2]. Tra queste, un ruolo importante è svolto dalla tecnologia di estrazione, che è in grado di influenzare profondamente alcuni tra i più importanti caratteri chimici, organolettici e salutistici dell'olio. Ne deriva che modificando le variabili tecnologiche si ottengono oli diversi partendo dalle stesse olive, e che modulando opportunamente le fasi critiche di processo (frangitura e gramolatura) in relazione alle olive che si stanno lavorando è possibile pervenire ai massimi livelli qualitativi del prodotto. In quest'ottica, la possibilità di determinare on-line, in maniera semplice e tempestiva, la composizione chimica ed i caratteri sensoriali dell'olio costituisce la base di ogni intervento tecnologico mirato all'ottimizzazione del prodotto. Tale possibilità è preclusa utilizzando le classiche metodiche analitiche, la cui complessità non consente di fornire risposte nei tempi richiesti dall'industria di produzione.

L'olio extravergine di oliva è tra i prodotti italiani più noti ed apprezzati e per questo ad elevato rischio di frodi e sofisticazioni. Per assicurare una leale concorrenza e proteggere i consumatori, la valutazione dei caratteri di autenticità dell'olio costituisce un importante e delicato aspetto del controllo qualitativo. La vigente legislazione europea impone per gli oli extravergini il rispetto di numerosi parametri analitici, la maggior parte dei quali sono rivolti a rivelare la presenza fraudolenta di oli estranei (es. oli di semi negli oli d'oliva) o di minor valore merceologico (es. olio di sansa o lampante nell'olio extravergine d'oliva). Tali parametri sono ad oggi determinati attraverso costose metodologie chimico-strumentali, particolarmente lunghe, laboriose e costose.

Un altro tipo di frode che coinvolge l'olio extravergine riguarda i prodotti a marchio DOP o IGP, per i quali rigidi disciplinari di produzione impongono di utilizzare specifiche varietà di olive, coltivate in un territorio circoscritto. Nonostante numerosi studi siano stati finalizzati a definire la composizione chimica ed i caratteri sensoriali degli oli in relazione alla loro origine genetica e geografica, a tutt'oggi non si dispone di metodi analitici ufficiali deputati al controllo della tracciabilità degli oli extravergini.

In generale, i classici metodi di analisi degli oli presentano diversi svantaggi, tra cui una preparazione del campione spesso complessa, tempi lunghi di analisi, costi elevati, impiego di strumentazioni sofisticate e di personale altamente specializzato, a cui si aggiunge un alto impatto ambientale. La possibilità di verificare in modo rapido, semplice ed affidabile la qualità, la genuinità e la tracciabilità dell'olio extravergine di oliva rappresenta dunque un elemento di grande utilità pratica ed una stimolante sfida della ricerca scientifica, che si adopera per mettere a punto tecniche analitico-strumentali alternative, non distruttive, in grado di operare on-line a vari stadi del processo produttivo. Tali tecniche si differenziano in base ai principi chimico-fisici di funzionamento, che per lo più riguardano la conduttività elettrica, la spettroscopia nell'ultravioletto (UV), nel visibile (Vis) e nell'infrarosso (IR), le vibrazioni acustiche, gli ultrasuoni, la risonanza magnetica nucleare, i raggi X e l'emissione di volatili [3, 4, 5]. Tra queste tecniche la spettroscopia, specialmente nella regione nel vicino infrarosso (compresa tra 780 e 2500 nm), si presta particolarmente ad essere impiegata con successo per l'analisi degli oli vegetali.

Scopo della presente review è quello di illustrare lo stato dell'arte relativo all'applicazione della spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) per il controllo

qualitativo dell'olio extravergine di oliva, con particolare riferimento alla caratterizzazione chimica e sensoriale dell'olio, al riconoscimento delle cultivar e dell'origine geografica delle olive impiegate nella produzione, nonché all'individuazione di frodi commerciali. L'attenzione è stata ristretta agli studi degli ultimi otto anni, fornendo una disamina dei risultati della ricerca più attuali, resi possibili anche dallo sviluppo di nuovi e sofisticati sistemi computerizzati di elaborazione chemometrica dei dati spettroscopici. Per un dettagliato resoconto sulle applicazioni della spettroscopia NIR all'olio di oliva dell'ultimo ventennio, si rimanda alla interessante review di Casale e Simonetti [6].

2. Concetti base di spettroscopia

La spettroscopia NIR presenta numerosi vantaggi rispetto alle altre metodiche analitiche tradizionali, riassumibili in una minima preparazione del campione, una buona capacità penetrante dei tessuti ed un vasto campo applicativo. È inoltre una tecnica multi-analitica, in quanto più di un costituente può essere determinato a partire da un singolo spettro [7]. In aggiunta, l'implementazione on-line della strumentazione è semplice, rapida ed ecosostenibile [8].

Il principio fisico/chimico della spettroscopia NIR si basa sul fatto che qualunque sostanza organica è principalmente costituita da atomi di carbonio, ossigeno, idrogeno, azoto e zolfo, con piccole quantità di altri elementi. Gli atomi sono combinati tra loro a formare molecole mediante legami covalenti ed elettrovalenti. A causa della natura dei legami e delle cariche elettrostatiche, le molecole e gli atomi di un sistema sono allo 'stato fondamentale', ossia con il minor quantitativo di energia cinetica possibile.

Lo 'stato fondamentale' può essere alterato da una fonte energetica esterna. Quando le molecole vengono irradiate a frequenze corrispondenti alla regione infrarossa dello spettro elettromagnetico, vibrano ed effettuano dei salti energetici. I cambiamenti cinetici possono avvenire solo secondo multipli del 'quanto fondamentale' di energia, detto fotone nel caso delle radiazioni elettromagnetiche. Per motivi quanto-meccanici, l'energia stessa delle molecole è 'quantizzata' ed una generica molecola può trovarsi solo in uno dei possibili stati energetici. Perciò, quando una quantità di materia viene irradiata con radiazione infrarossa, i legami chimici assorbono energia ed effettuano un salto dallo 'stato fondamentale' al primo stato eccitato, corrispondente alle frequenze nel medio infrarosso. Un numero inferiore di legami salterà al secondo stato eccitato ed

un numero ancora minore al terzo. Le frequenze corrispondenti al secondo ed al terzo stato eccitato sono tipicamente dell'ordine di due e tre volte quella del primo stato eccitato e ricadono nel vicino infrarosso, a lunghezze d'onda comprese nell'intervallo tra 780 e 2500 nm. I principali gruppi funzionali presenti nei costituenti delle sostanze organiche, in grado di assorbire nel vicino infrarosso, sono: -CH-, -OH e -NH. In Figura 1 si riporta uno schema semplificato del principio di funzionamento della spettroscopia.

Negli strumenti NIR, l'assorbimento energetico delle molecole viene visualizzato sotto forma di uno spettro, i cui picchi consentono la quantificazione delle molecole in questione. Nonostante le relazioni qualitative esistenti tra la conformazione di uno spettro NIR e la composizione chimica degli oli siano note, l'interpretazione dei risultati non è semplice, in quanto i dati grezzi spettrali devono essere sottoposti a computazioni chemometriche.

3. Concetti base di chemometria

Per una migliore comprensione di queste note, si ritiene opportuno introdurre alcuni concetti base di chemometria, in quanto l'analisi dei dati spettrofotometrici non può prescindere dall'impiego di tale disciplina. La International Chemometrics Society definisce la chemometria (o chemiometria) come *‘la disciplina che usa metodi matematici e statistici per progettare, selezionare ed ottimizzare procedure ed esperimenti, estrarre la massima informazione dall'analisi dei dati, computare una rappresentazione grafica di tale informazione, in altre parole... fornire gli aspetti informativi dei dati’*. La chemometria nasce quindi come branca della chimica che si serve di processi matematici, statistici e logici, al fine di consentire l'interpretazione dei dati. In generale, le fasi dell'analisi chemometrica dei dati spettrali sono contraddistinte dall'impiego di metodiche atte a garantire il corretto pretrattamento dei dati ottenuti dalle scansioni, la calibrazione, la validazione e l'ottimizzazione del modello matematico, nonché l'interpretazione dei risultati ottenuti.

I campi di applicazione della chemometria per le misurazioni spettrofotometriche sull'olio di oliva sono molteplici e riguardano sia il monitoraggio ed il controllo del processo estrattivo che le analisi quali-quantitative sul prodotto. Le scelte operate durante le fasi di acquisizione dei dati e durante le computazioni chemometriche sono fondamentali per ottenere modelli matematici robusti, ossia in grado di consentire misure riproducibili anche su oli ottenuti in annate diverse o da

areali di produzione differenti. È importante tuttavia precisare che l'acquisizione di competenze in ambito chemometrico riguarda esclusivamente il settore scientifico, costantemente impegnato nella ricerca e nello sviluppo di nuove metodiche e tecnologie di analisi. I modelli matematici sviluppati durante la laboriosa e complicata fase sperimentale saranno impiegati per la progettazione di strumentazioni NIR caratterizzate da una estrema semplicità di impiego. Non sarà quindi prerogativa dell'operatore avere competenze in ambito chemometrico per eseguire misurazioni sui campioni di olio da analizzare (Figura 2).

La messa a punto di modelli matematici ha inizio con il pretrattamento dei dati. È questa una fase cruciale, che consiste nell'impiego di algoritmi atti a migliorare la qualità delle informazioni dei dati grezzi spettrali. La scelta del pretrattamento più adeguato è drasticamente condizionata dall'interazione tra cofattori specifici relativi alle caratteristiche del campione analizzato, alla tipologia di strumentazione adottata ed alla tecnica di analisi multivariata impiegata.

Il modello matematico da adottare viene selezionato in funzione delle finalità di impiego. Nel caso in cui gli intenti siano quelli di individuare la natura dell'olio extravergine, ad esempio per riconoscere frodi o difendere marchi di tutela giuridica del prodotto, si utilizzano gli algoritmi di classificazione. Tra questi, i più applicati in ambito spettrofotometrico NIR sono: la Linear Discriminant Analysis (LDA), la Quadratic Discriminant Analysis (QDA), la Canonical Discriminant Analysis (CDA), la k-Nearest Neighbors (kNN), la Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA), la Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA), la Support Vector Machines Discriminant Analysis (SVMDA) e le Artificial Neural Networks (ANN) [9, 10, 11, 12].

Nei casi in cui l'analisi spettrofotometrica NIR debba essere impiegata per quantificare uno o più analiti presenti nell'olio, le metodiche chemometriche adottate con successo sono ascrivibili alle regressioni multivariate, quali: Multiple Linear Regression (MLR), Principal Components Regression (PCR) e Partial Least Squares regression (PLS) [13]. La calibrazione dei modelli con tali algoritmi ha necessità di misurazioni eseguite con metodi analitici classici di riferimento. Tanto più è elevata la precisione di tali metodi, tanto migliore sarà la robustezza del modello predittivo non distruttivo.

È importante sottolineare che la riproducibilità dei modelli matematici impiegati per l'interpretazione degli spettri NIR è basilare, in quanto ne condiziona l'attendibilità.

Per ricavare un modello robusto dall'analisi chemometrica è necessario eseguire ripetuti esami su campioni sufficientemente numerosi e verificare l'attendibilità del modello ottenuto attraverso accurati test di validazione.

4. Spettroscopia NIR applicata alla caratterizzazione quali-quantitativa degli oli extravergini

La spettroscopia NIR associata a procedure chemometriche offre molte possibilità per valutare la qualità dell'olio extravergine di oliva. Molte ricerche hanno infatti dimostrato l'efficienza di questa tecnica per determinare in modo semplice e rapido numerosi parametri qualitativi dell'olio (acidità libera, numero di perossidi, indici spettrofotometrici UV, stabilità ossidativa), nonché per caratterizzarne la composizione chimica relativamente ai composti sia maggiori che minori. La spettroscopia NIR potrebbe dunque essere impiegata con successo sia per fini ispettivi che per i controlli di produzione, consentendo di ottimizzare in tempo reale la qualità dell'olio prodotto.

4.1 Acidità libera

L'acidità libera degli oli valuta la quantità di acidi grassi che si sono liberati dai legami esteri dei gliceridi. Costituisce un importante parametro qualitativo, la cui misurazione è utile durante la produzione (è un indicatore indiretto della qualità delle olive), la conservazione (tende ad aumentare nel tempo) e la commercializzazione (è tra i parametri utilizzati dalla legislazione europea per discriminare gli oli vergini dagli extravergini; in quest'ultimi deve essere inferiore allo 0.8%, espressa in acido oleico).

La possibilità di utilizzare efficacemente la spettroscopia NIR per determinare l'acidità libera degli oli, in tempi brevi (meno di 30 s per campione) e senza necessità di alcun pretrattamento, è stata dimostrata da molti studi. Recentemente Armenta *et al.* [14] hanno sviluppato validi modelli PLS (radice quadratica media dell'errore di predizione, RMSEP: 0.034%; limite di rilevamento della metodica: 0.03%) utilizzando i dati spettroscopici di campioni di olio d'oliva a diversa acidità, acquisiti in trasformata di Fourier (FT) nella regione spettrale NIR pari a 4541-11726 cm^{-1} . I modelli sono stati inizialmente costruiti impiegando un numero di oli piuttosto ristretto (14 in calibrazione, 10 in validazione e 9 in predizione), che presentavano valori di acidità libera, misurata per titolazione acido/base, compresa tra 0.11 e 1.66% in calibrazione e tra 0.16 e 1.05% in predizione, ma la loro validità è stata confermata l'anno successivo, con un set di oli più ampio. Risultati simili sono stati ottenuti da Bendini *et al.* [15], che

hanno acquisito gli spettri in trasmissione FT-NIR di 161 campioni di oli d'oliva, prodotti in tre frantoi dell'Emilia Romagna che utilizzavano differenti impianti estrattivi. I modelli di PLS ottenuti, per la cui costruzione sono stati impiegati i valori di acidità determinati per titolazione e i dati spettroscopici di bande comprese tra 6100 e 4600 cm^{-1} , hanno presentato un RMSECV (radice quadratica media dell'errore in cross-validazione) di 0.033% ed un RMSEP di 0.036%. I valori di acidità libera predetta sono risultati compresi tra 0.32 e 1.46%, con una deviazione standard relativa in predizione dello 0.23%.

4.2 Acidi grassi e trigliceridi

Alcuni studi hanno dimostrato la capacità dell'analisi NIR di stimare la componente acidica degli oli di oliva, in alternativa ai metodi gascromatografici di riferimento che presentano numerosi svantaggi: sono lunghi e tediosi, utilizzano solventi organici inquinanti e richiedono apparecchiature dedicate e costose.

In una ricerca condotta su oli extravergini italiani, Mignani *et al.* [16] hanno costruito modelli di regressione PLS degli acidi grassi impiegando per ognuno i dati UV-Vis-NIR di specifiche bande spettrali ed i dati acquisiti in GLC, ottenendo valori di R^2 variabili da 0.85 a 0.99. In particolare, i modelli meno efficienti ($0.85 < R^2 < 0.89$) sono stati ottenuti per gli acidi grassi presenti a concentrazioni minori. Il valore più alto di R^2 è corrisposto al modello predittivo dell'acido oleico.

Mossoba *et al.* [17] hanno utilizzato la spettroscopia FT-NIR per valutare il contenuto in acidi grassi saturi, monoinsaturi e poliinsaturi di vari oli vegetali compreso l'olio di oliva, calibrando e validando i modelli predittivi tramite regressione PLS. Lo studio è stato condotto su 30 oli e grassi edibili del commercio, tra cui oliva, colza, noce, vinaccioli, arachide, lino, cocco, girasole e cartamo. I modelli PLS ottenuti hanno presentato coefficienti di correlazione molto elevati (superiori a 0.99), dimostrando che la spettroscopia FT-NIR offre delle prestazioni eccellenti per un rapido screening delle informazioni nutrizionali riferibili in etichetta.

Nelle ricerche di Casale *et al.* [18] sono stati confrontati i risultati della spettroscopia NIR, medio infrarosso (MIR) e UV-Vis per determinare i contenuti in acido oleico e linoleico degli oli a DOP Chianti Classico, preventivamente quantificati in GLC. Gli Autori hanno riscontrato che i migliori modelli di regressione PLS sono stati ottenuti con i dati spettrali NIR, mentre i range spettrali MIR e UV-Vis hanno fallito nello scopo. I migliori modelli sono stati ottenuti impiegando l'intero set di dati

NIR, ottenendo valori di RMSEP pari a 0.269% e 0.073% per l'acido oleico e linoleico, rispettivamente.

Le risposte fornite dell'analisi FT-NIR sono state impiegate da Galtier *et al.* [19] per predire il profilo quali-quantitativo dei trigliceridi e degli acidi grassi determinato mediante i metodi cromatografici ufficiali HPLC e GLC. I modelli PLS scaturiti da questo studio, condotto su 125 oli vergini francesi a DOP, hanno evidenziato che la spettroscopia NIR è stata in grado di stimare il contenuto degli acidi grassi e dei trigliceridi presenti a concentrazioni più elevate (superiori a 0.40% e 1.50%, rispettivamente) con un errore relativo di predizione (REP) accettabile (~5%), seppure superiore a quello delle ben più lente e costose metodiche cromatografiche.

4.3 Stato ossidativo dell'olio

La spettroscopia UV-Vis-NIR ha mostrato ottime potenzialità per la valutazione della rancidità ossidativa degli oli, alterazione cui sono soggetti gli acidi grassi e principale causa di riduzione della shelf-life del prodotto, con implicazioni sia sensoriali che nutrizionali.

Nonostante l'olio extravergine di oliva sia piuttosto resistente all'irrancidimento ossidativo, grazie all'elevato rapporto tra acidi grassi monoinsaturi e poliinsaturi ed alla presenza di antiossidanti fenolici molto attivi, l'impiego di una materia prima di cattiva qualità (olive infestate, danneggiate, ecc.), errori in fase di estrazione (come ad esempio gramolature condotte ad elevata temperatura) ed una inadeguata conservazione (a caldo e/o alla luce) sono fattori da tenere rigidamente sotto controllo, in quanto aumentano l'entità delle reazioni ossidative fino a rendere l'olio inaccettabile.

Lo stato ossidativo è comunemente valutato determinando il numero di perossidi (prodotti primari di ossidazione) e gli indici spettrofotometrici K_{232} , K_{270} , ΔK (indicatori della presenza nell'olio di perossidi dienici e trienici coniugati e di prodotti ossidativi secondari aldeidici e chetonici), i cui limiti massimi sono fissati dalla vigente legislazione per tutte le categorie commerciali degli oli ricavati dall'oliva. Nello specifico, gli oli extravergini non possono avere un numero di perossidi (valutato mediante titolazione iodometrica) superiore a 20 meq O_2 kg^{-1} e valori di K_{232} , K_{270} e ΔK (determinati in assorbimento UV) superiori, rispettivamente, a 2.50, 0.22 e 0.01.

I metodi ufficiali per la determinazione dei perossidi e degli indici spettrofotometrici sono piuttosto semplici, ma utilizzano solventi organici e la loro

precisione è condizionata da diversi fattori sperimentali, come la manualità dell'operatore e l'esposizione del campione alla luce o all'ossigeno dell'aria.

Un valido modello di regressione PLS per stimare il numero di perossidi negli oli d'oliva, con un RMSEP di 1.87 meq O₂ kg⁻¹ ed un limite di rilevazione pari a 0.8 meq O₂ kg⁻¹, è stato messo a punto da Armenta *et al.* [14] utilizzando le scansioni FT-NIR a 800-2500 nm. Anche Watiez *et al.* [20], in un ampio studio che ha coinvolto vari oli vegetali (tra cui l'olio vergine d'oliva), prodotti in più annate e ottenuti da varietà diverse, hanno confermato l'efficienza della spettroscopia FT-NIR per stimare il numero di perossidi dell'olio. Da questa ricerca sono scaturiti modelli PLS i cui parametri statistici in validazione hanno indicato una buona accuratezza, oltre che per il numero di perossidi ($R^2 = 0.95$; RMSEP = 0.617 meq O₂ kg⁻¹; SEP o errore standard di predizione = 0.613 meq O₂ kg⁻¹), anche per l'acidità libera ($R^2 = 0.98$; RMSEP = 0.016%; SEP = 0.016%). Simili risultati sono stati conseguiti da Mignani *et al.* [16], che hanno costruito ottimi modelli di regressione PLS (R^2 compreso tra 0.96 e 0.99) tra i dati spettrali (acquisiti nel range UV-NIR), i parametri qualitativi K₂₃₂, K₂₇₀ ed il numero di perossidi. Gli Autori hanno anche ottenuto un discreto modello predittivo dell'acidità libera ($R^2 = 0.84$), ma non del ΔK ($R^2 = 0.43$).

Un altro parametro utile per accertare lo stato di conservazione dell'olio ed avere una stima della sua shelf-life è l'indice di stabilità ossidativa (Olive oil Stability Index - OSI), la cui determinazione risulta dispendiosa sia in termini economici (richiede l'impiego di una strumentazione dedicata) che di tempo. Cayuela Sánchez *et al.* [21] hanno ottenuto un'efficiente stima multiparametrica dell'acidità libera, dei perossidi, dei dieni coniugati (K₂₃₂) e dell'OSI, utilizzando la spettroscopia UV-Vis-NIR nel range spettrale compreso tra 300 e 1000 nm ed acquisendo gli spettri in trasmittanza. La metodica impiegata ha previsto la calibrazione e la validazione di modelli mediante regressione PLS, normalizzando i dati e testandone la trasformazione in derivata prima o seconda tramite l'algoritmo Savitzky-Golay. I migliori risultati sono stati raggiunti senza alcun pretrattamento spettrale, ottenendo modelli predittivi caratterizzati da coefficienti di regressione ottimi per ciò che concerne la determinazione dell'OSI ($R^2 = 0.93-0.94$) e discreti nel caso dell'acidità ($R^2 = 0.86$), del numero di perossidi ($R^2 = 0.87$) e del K₂₃₂ ($R^2 = 0.82$). Il SEP del miglior modello relativo all'OSI è stato di 6.68 h. L'indice RPD (Residual Predictive Deviation) è risultato pari a circa 3 in tutti i modelli, avvalorandone la robustezza e quindi la ripetibilità. Come sottolineato dagli

stessi Autori, la sperimentazione ha dimostrato la versatilità del NIR come tecnica di analisi multiparametrica degli oli.

Lo studio di Plard *et al.* [22] ha dimostrato che la spettroscopia NIR, abbinata alla PLS, può essere utilizzata anche per controllare lo stato di alterazione ossidativa dell'olio durante la sua conservazione. In questo lavoro sono stati analizzati campioni di olio vergine d'oliva conservati in recipiente chiuso per 8, 12, 16 e 20 mesi, in varie condizioni di esposizione all'ossigeno (con e senza spazio di testa), alla luce (al buio e alla luce UV, sia diretta che indiretta) e a diverse temperature (4°C, 21°C e temperatura variabile). L'avanzamento dell'autossidazione è stato seguito, oltre che acquisendo gli spettri NIR (10000-4500 cm^{-1}), anche determinando vari parametri analitici: numero di perossidi (PV), K_{232} , K_{270} , acidità libera, composizione acidica, valore di anisidina (AV) (che stima le aldeidi di derivazione ossidativa generate dalla rottura dei perossidi) e TOTOX (2PV+AV); quest'ultimo parametro, tenendo conto dei prodotti di ossidazione sia primari (perossidi) che secondari (AV), fornisce una stima globale dell'evolversi del processo ossidativo. Previa elaborazione PCA (Principal Component Analysis), sono stati quindi costruiti modelli PLS per ciascuna variabile indipendente, utilizzando in cross-validazione range spettrali ristretti (7158-5875 e 5332-4499 cm^{-1}). I modelli finali sono risultati efficienti per la determinazione di tutti i parametri considerati ad eccezione degli acidi grassi e del K_{270} ed i migliori sono stati quelli relativi al numero di perossidi, al TOTOX ed all'acidità libera (R^2 in validazione > 0.97).

La determinazione dei parametri legati all'alterazione ossidativa tramite spettroscopia NIR trova terreno fertile in varie applicazioni specifiche, tra cui il monitoraggio della qualità degli oli sottoposti a stress termico. Uno studio in tale direzione è stato condotto da Maggio *et al.* [23] ed ha riguardato la determinazione della composizione in acidi grassi, della stabilità ossidativa (OSI) e degli indici spettrofotometrici K_{232} e K_{270} in oli esposti alla temperatura di frittura (180°C) per tempi variabili (da 30 a 180 min, con incrementi di 30 min). Le analisi spettroscopiche sono state effettuate impiegando la spettroscopia Vis-NIR e MIR combinate alla regressione PLS, ottenendo una elevata correlazione ($R^2 = 0.99$) per ciò che concerne la predizione del tempo di riscaldamento dell'olio stimato sulla base dei dati spettrali NIR. Da questi risultati emerge l'interessante potenzialità di impiego delle tecniche spettroscopiche nell'industria alimentare o nella ristorazione, per monitorare in tempo reale ed in modo semplice e rapido il deterioramento ossidativo degli oli nel corso del loro utilizzo a caldo.

4.4 Antiossidanti (fenoli, tocoferoli, squalene)

Il patrimonio antiossidante dell'olio extravergine di oliva è rappresentato essenzialmente dai componenti fenolici (peculiari di questo olio e dotati di potenti attività antiossidanti, anche biologiche) e dai tocoferoli (antiossidanti naturali più o meno presenti in tutti gli oli vegetali, cui appartiene la Vitamina E o α -tocoferolo). Questi composti hanno un notevole impatto qualitativo sull'olio, in quanto associati alla stabilità ossidativa, alle proprietà salutistiche e, per quanto concerne i fenoli, anche alle caratteristiche sensoriali di amaro e piccante [24]. Negli oli extravergini di oliva si riscontra inoltre la presenza dello squalene, idrocarburo terpenico il cui ruolo antiossidante sulla stabilità dell'olio è marginale, ma che svolge importanti attività biologiche proteggendo le membrane cellulari dallo stress ossidativo e a cui sono state attribuite attività chemioprotettive nei confronti di alcune tipologie di cancro [25].

Per quanto riguarda la valutazione del patrimonio fenolico negli oli extravergini, non si dispone in letteratura di specifici studi spettrometrici NIR, ma l'interessante lavoro di Inarejos-García *et al.* [26], condotto per caratterizzare i componenti minori dell'olio extravergine di oliva della cultivar Cornicabra, evidenzia la possibilità di sfruttare questa tecnica anche a tal fine. Dall'analisi chemometrica PLS dei dati spettrali, confrontati con i classici metodi analitici (determinazione dei fenoli totali con il reattivo di Folin-Ciocalteu ed analisi HPLC del profilo fenolico), gli Autori hanno infatti ottenuto buoni modelli predittivi non solo per i fenoli totali (coefficiente di regressione, $R = 0.90$) ma anche per la maggior parte dei composti fenolici ($R > 0.70$) ed in particolare per i derivati dell'idrossitiroso ($R = 0.85$).

Anche per quanto riguarda i tocoferoli dell'olio extravergine di oliva abbiamo riscontrato la mancanza, in letteratura, di specifiche ricerche in spettroscopia NIR. Tuttavia, nel lavoro precedentemente citato [26] sono stati analizzati anche i tocoferoli dei campioni di olio Cornicabra e costruiti modelli PLS impiegando i dati spettrali e quelli ricavati dall'analisi HPLC. Il miglior modello è stato ottenuto per l' α -tocopherolo ($R = 0.71$), che negli oli extravergini rappresenta la forma isomerica nettamente prevalente (circa il 90% dei tocoferoli totali) e quella biologicamente più attiva (vitamina E). Le bande di assorbimento associate ai tocoferoli ed impiegate per elaborare l'algoritmo sono state identificate nelle regioni spettrali comprese tra 7502.3 e 6098.2 cm^{-1} , in accordo con quanto rilevato da Sinelli *et al.* [27].

La possibilità di impiegare la spettroscopia NIR per stimare lo squalene negli oli extravergini di oliva si intravede dal lavoro di Galtier *et al.* [19]. Gli Autori, attraverso trattamenti chemometrici applicati al range spettrale NIR compreso tra 10000 e 4500 cm^{-1} , hanno ottenuto un buon modello predittivo caratterizzato da valori di R^2 e SEP rispettivamente pari a 0.96 e 0.05.

4.5 Composti volatili e caratteri sensoriali

La componente volatile dell'olio extravergine è particolarmente complessa, in quanto le sostanze identificate nel suo spazio di testa sono moltissime (oltre 200) e per lo più presenti in piccolissime quantità (dell'ordine di qualche ppm o meno). La determinazione quali-quantitativa della componente odorosa degli oli extravergini è in genere condotta utilizzando sofisticate e costose metodiche gas-cromatografiche (in genere GC o GC-MS), spesso precedute da un'accurata preparazione del campione necessaria per concentrare adeguatamente gli analiti.

Nonostante le molteplici sfumature sensoriali che caratterizzano i diversi oli extravergini, finora è stata ben documentata soltanto la relazione tra il fruttato erbaceo (che costituisce il profumo di base) e le aldeidi ed alcoli (saturi e insaturi) a C_5 e C_6 che si formano enzimaticamente (via della lipossigenasi, LOX) nel corso del processo estrattivo, durante le fasi di frangitura e gramolatura delle olive [28]. Questi composti hanno odori che ricordano l'erba, le foglie ed i frutti non completamente maturi e determinano il fruttato verde che caratterizza gli oli extravergini di buona qualità. La composizione qualitativa e quantitativa dei metaboliti della via della LOX è strettamente correlata al livello ed alla attività degli enzimi coinvolti, la cui quantità è fissata dalla componente genetica (ed è quindi caratteristica di ogni cultivar) mentre

L'attività enzimatica dipende dal grado di maturazione dei frutti e dalle condizioni di frangitura e gramolatura (in particolare, tempo e temperatura) [28]. Modificando opportunamente le variabili di processo, dunque, è possibile ottenere oli sensorialmente differenti. Questa opportunità può essere sfruttata soltanto disponendo di informazioni sulla componente aromatica degli oli in tempo reale, ovvero durante lo svolgimento del processo estrattivo, in maniera da intervenire tempestivamente (ed eventualmente automaticamente) sui parametri tecnologici. Si rammenta, inoltre, che in base alla vigente regolamentazione europea il superamento dell'analisi organolettica condotto da un panel di assaggiatori esperti è necessario per la classificazione commerciale degli oli vergini ed extravergini e per la caratterizzazione degli oli a marchio DOP o IGP. In particolare, gli oli extravergini non devono presentare all'assaggio alcun difetto organolettico, neppure lieve, mentre deve essere percettibile l'aroma di fruttato. Pur essendo l'analisi sensoriale degli oli d'oliva strettamente codificata da un dettagliato regolamento europeo, l'impiego di una metodologia non strumentale per valutare i caratteri giuridici degli oli si presta a molte critiche, mostrando numerose limitazioni e forti elementi di incertezza.

Gli studi che hanno affrontato l'utilizzo della spettrometria NIR per valutare il profilo dei composti volatili ed i caratteri sensoriali degli oli extravergini sono pochi e tutti piuttosto recenti, indicando l'esistenza di ampi spazi di ricerca volti ad approfondire, con indagini dedicate, questo interessante argomento di studio.

Nell'articolato lavoro di caratterizzazione dell'olio spagnolo a DOP Cornicabra, Inarejos-García *et al.* [26] hanno valutato l'impiego della spettroscopia ad infrarossi in trasformata di Fourier per predire, tra i vari composti minori, anche i volatili a C₅ e C₆ originati dalla via della LOX, determinati mediante analisi SPME-GC. I risultati di questa ricerca hanno evidenziato alcune regioni spettrali utili per la messa a punto di modelli affidabili, tra cui i migliori sono stati quelli relativi agli alcoli a C₆ esanolo, trans-2-esenolo e cis-3-esenolo (rispettivamente, RMSEP = 0.11, 0.16 e 0.67 mg kg⁻¹; RPD=1.26, 1.15 e 1.23, in validazione), costruiti impiegando i range spettrali 7502.3-6098.2 cm⁻¹ e 5450.2-4597.8 cm⁻¹. Gli Autori hanno anche verificato con successo, seppure con una elaborazione condotta sui soli 10 campioni che all'assaggio manifestavano il difetto sensoriale di 'legno umido', la possibilità dell'analisi spettroscopica di rilevare la presenza delle aldeidi ritenute responsabili di tale difetto, quali la 2-metilbutanale e la 3-metilbutanale. È stata inoltre applicata la PLS agli attributi positivi di fruttato, amaro e pungente, ottenendo dalla validazione dei modelli

un coefficiente di determinazione ragionevole per il fruttato ($R = 0.80$) e l'amaro ($R = 0.83$), ma scarso per il pungente ($R = 0.28$).

Anche dai risultati ottenuti da Sinelli *et al.* [29] è emerso che la spettroscopia FT-NIR e FT-IR applicata alla valutazione sensoriale degli oli d'oliva produce risultati più che soddisfacenti, consentendo di discriminare gli oli difettati e di classificare gli extravergini in relazione all'intensità del sentore fruttato (lieve, medio o intenso) percepito all'assaggio. Le scansioni spettrofotometriche degli oli sono state eseguite nella regione sia del NIR ($12500\text{--}4500\text{ cm}^{-1}$) che del MIR ($4000\text{--}700\text{ cm}^{-1}$) e i dati pretrattati sono stati elaborati testando due metodi di classificazione basati su approcci chemometrici differenti: LDA e SIMCA. Per la LDA, sono state selezionate le regioni spettrali più rappresentative degli spettri NIR ($8570\text{--}4648\text{ cm}^{-1}$) e MIR ($3023\text{--}729\text{ cm}^{-1}$), mentre per lo sviluppo del modello SIMCA sono stati impiegati gli interi spettri, in quanto l'algoritmo non è affetto da problemi derivanti dalla correlazione tra variabili. I modelli LDA hanno fornito prestazioni eccellenti, assicurando un valore di accuratezza del 100% nel caso dell'impiego dei dati MIR e del 98% in quello dei dati NIR, mentre i rispettivi modelli SIMCA non hanno permesso di ottenere risultati soddisfacenti.

Gli studi fin qui riportati, relativi alla caratterizzazione chimica e sensoriale degli oli extravergini di oliva mediante analisi NIR abbinata a tecniche chemometriche di elaborazione dei dati spettrali, sono schematizzati e riassunti in Tabella I.

5. Spettroscopia NIR applicata alla valutazione dell'autenticità dell'olio extravergine

Tra tutti gli oli vegetali, l'olio extravergine non solo è il più apprezzato ma anche il più costoso e pertanto costituisce uno dei prodotti alimentari più soggetti a contraffazione. Non è raro apprendere di oli spacciati per extravergini sequestrati sui mercati nazionali ed internazionali, nei quali è stata riscontrata l'aggiunta fraudolenta di oli d'oliva/sansa raffinati o oli vegetali di altra natura. Accertare la genuinità (purezza) dell'olio extravergine di oliva tramite le classiche analisi di laboratorio è particolarmente complesso e richiede un notevole impegno economico, in quanto è necessario determinare molteplici parametri analitici, acquisiti attraverso metodologie differenti, per lo più cromatografiche (HPLC e GC). Tali parametri variano da Paese a Paese e si riferiscono a metodiche ufficiali ISO o COI (quest'ultime recepite dai vigenti regolamenti dell'Unione Europea) che, purtroppo, non sono in grado di rivelare le frodi più ingegnose e sofisticate.

Il riconoscimento degli oli adulterati non rappresenta l'unico problema che devono affrontare gli organismi deputati al controllo qualitativo degli oli extravergini di oliva. Una delle maggiori esigenze dell'industria olearia è disporre di strumenti di indagine obiettivi ed affidabili con cui individuare l'origine della materia prima e del prodotto, per assicurare la tracciabilità e tutelare la tipicità degli oli certificati a DOP o IGP. L'individuazione dei caratteri legati all'impronta varietale e geografica rappresenta dunque un aspetto rilevante del controllo qualitativo, che ancor oggi presenta notevoli difficoltà se condotto utilizzando le classiche metodiche di laboratorio.

La proprietà della spettrometria di ottenere rapide e semplici valutazioni multiparametriche ha stimolato numerosi ricercatori a verificare la possibilità di utilizzare la spettroscopia NIR come tecnica di indagine alternativa o di supporto per controllare la veridicità delle dichiarazioni riportate nelle etichette degli oli extravergini. I risultati di questi studi hanno fornito risultati molto interessanti e molteplici spunti di approfondimento per un possibile trasferimento applicativo-industriale delle metodiche proposte.

5.1. Adulterazioni dell'olio extravergine con oli di diversa natura

Le più comuni frodi cui è soggetto l'olio extravergine sono l'aggiunta di oli d'oliva di inferiore qualità e prezzo, oli estratti dai semi oleosi ed oli ottenuti da alcune tipologie di frutta secca. La ricerca di queste adulterazioni condotta utilizzando i classici metodi di laboratorio è particolarmente complessa e tediosa, in quanto non si dispone di una metodica analitica univoca e la scelta del test da impiegare è condizionato dalla tipologia di adulterante da identificare, spesso sconosciuto. In aggiunta a ciò, la composizione chimica di alcuni oli (es. oli d'oliva di minor valore economico e olio di nocciola) è molto affine a quella dell'olio extravergine, consentendo la commissione di frodi estremamente difficili da riconoscere.

L'impiego della spettroscopia NIR per identificare aggiunte fraudolente di oli estranei all'olio extravergine è stata oggetto nel tempo di numerosi studi, che hanno abbondantemente dimostrato l'utilità di questa tecnica nel rivelare varie tipologie di adulteranti vegetali (olio di soia, germe di grano, mais, cotone, riso, arachide, colza, sesamo, girasole, noce, palma, canola, ed altri), animali (burro, fegato di merluzzo, strutto) e oli ricavati dall'oliva, ma di minore qualità e prezzo (olio di sansa e di oliva raffinato) [30, 6]. La ricerca più attuale si è rivolta soprattutto a testare varie miscele di adulteranti, anche complesse, impiegando nuove strategie chemometriche per

migliorare la performance dei modelli e la loro efficienza nel fornire risposte quantitative. Alcuni gruppi di ricerca si sono anche dedicati ad ottimizzare e comparare le prestazioni degli algoritmi chemometrici, con l'intento di individuare le metodiche di elaborazione ottimali per questo specifico settore di indagine [31, 32].

Özdemir e Öztürk [33] hanno acquisito gli spettri NIR di una serie di campioni costituiti da olio d'oliva puro, miscele binarie con olio di girasole all'8-88% e miscele ternarie di olio d'oliva, girasole e mais, in cui la concentrazione dell'olio estraneo variava dal 2 all'84%. Nella costruzione dei modelli, gli Autori hanno utilizzato un particolare metodo di calibrazione basato su algoritmi GILS (Genetic Inverse Least Squares), atti a selezionare ed estrarre le informazioni più rilevanti e significative. Sono stati così ottenuti efficienti modelli, che nel caso delle miscele binarie hanno presentato un errore standard di predizione del 2.49% per l'olio di oliva e del 2.88% (v/v) per quello di girasole; nel caso delle miscele ternarie, l'errore standard di predizione per l'olio di oliva è stato pari all'1.42%. Più recentemente, lo stesso algoritmo genetico GILS è stato impiegato per elaborare i dati FT-NIR di miscele più complesse (non solo binarie e terziarie, ma anche quaternarie) costituite da olio d'oliva aggiunto di olio di soia, cotone, mais e girasole [34], con lo scopo di determinare la quantità di olio d'oliva presente nelle diverse miscele. Gli Autori hanno sottolineato che gli spettri dei vari oli di semi puri erano molto simili a quelli dell'olio di oliva, con piccole differenze nel range di 4800 e 4500 cm^{-1} che sono state utilizzate per la costruzione dei modelli. Dallo studio è emersa la possibilità di predire la quantità di olio d'oliva presente nelle varie miscele con un basso errore di predizione (SEP = 2.45% p/p), ottenendo un coefficiente di correlazione compreso tra 0.90 e 0.99. Questi risultati dimostrano che la spettroscopia NIR, abbinata ad un idoneo metodo di calibrazione multivariata, può essere efficacemente utilizzata per compiere rapidi screening di verifica della purezza dell'olio extravergine d'oliva, coprendo un ampio range di concentrazione dell'adulterante anche nei casi di miscele complesse. È stato comunque notato che l'abilità predittiva dei modelli diminuiva con l'aumentare del numero di oli vegetali presenti nelle miscele.

Weng *et al.* [35] hanno investigato la possibilità di svelare la presenza di olio di sesamo, soia e girasole, aggiunti all'olio di oliva vergine in concentrazioni variabili tra il 5 ed il 50% (p/p). I modelli PLS, ottenuti impiegando un ristretto range spettrale NIR (12000-3700 cm^{-1}), hanno discriminato accuratamente i campioni, mostrando valori di R pari a 98.77, 99.37 e 99.44 ed un RMSECV di 1.3, 1.1 e 1.0 per l'olio di sesamo, soia e girasole, rispettivamente. Anche i risultati di questo studio, dunque, hanno dimostrato

la capacità della spettroscopia NIR di discriminare e quantificare oli vergini di oliva puri e adulterati.

Come già accennato, tra le frodi più comuni che coinvolgono l'olio extravergine vi è l'aggiunta di oli derivati dall'oliva ma di minor qualità e prezzo, quali olio di oliva raffinato o olio di oliva vergine lievemente difettato, sottoposto a blando riscaldamento sotto vuoto ($<120^{\circ}\text{C}$) che rimuove i composti volatili indesiderati. Come si può immaginare queste frodi, specie l'aggiunta di olio d'oliva blandamente deodorato, sono le più difficili da svelare, data la stretta similitudine tra adulterante e adulterato. Recentemente l'UE ha inserito, tra i metodi d'analisi ufficiali, la determinazione GLC degli etil esteri, marker diretti della qualità delle olive (si formano per via enzimatica negli oli estratti da olive di cattiva qualità) e marker indiretti di avvenuta deodorazione (restano nell'olio anche dopo l'allontanamento delle sostanze maleodoranti). La presenza di questi composti nell'olio extravergine in concentrazioni superiori al limite di legge genera dunque un forte sospetto di frode ma non consente di risalire alla quantità di adulterante aggiunto. Viceversa, Wójcicki *et al.* [36] hanno dimostrato che l'analisi spettrometrica NIR abbinata all'elaborazione chemometrica dei dati potrebbe essere utilizzata non solo per identificare la frode, ma anche per determinare i quantitativi di olio d'oliva raffinato aggiunto agli extravergini. Nel loro studio, gli Autori hanno sottoposto a varie scansioni spettroscopiche (Vis, NIR, MIR e fluorescenza UV-Vis) olio extravergine d'oliva sia puro che miscelato con olio di oliva raffinato o blandamente deodorato, in concentrazioni variabili dal 2.5 al 75% (p/p). La performance dei modelli di calibrazione PLS e PCR è risultata simile per tutte le tecniche spettroscopiche testate ed i parametri di predizione hanno indicato che tutti i modelli potrebbero essere adatti per essere impiegati nei controlli qualitativi degli oli extravergini.

È opportuno sottolineare che negli studi di ricerca la natura dell'adulterante è nota, mentre in genere nei controlli ispettivi è sconosciuta. Per un possibile trasferimento applicativo della tecnologia NIR è dunque necessario che le ricerche non si esauriscano, ma proseguano in maniera da pervenire a modelli di calibrazione il più possibile ampi e completi.

5.2 Tipicità dell'olio extravergine

L'impiego della spettroscopia NIR per identificare la cultivar e il territorio di provenienza delle olive, variabili strettamente legate alla tipicità degli oli extravergini,

ha costituito negli ultimi anni un filone di ricerca molto sentito, da cui è scaturita una nutrita produzione scientifica. Vari ricercatori hanno affrontato i loro studi analizzando oli extravergini di diversa origine, applicando tecniche chemometriche sempre più sofisticate e nuove strategie di elaborazione dei dati spettrali. Tutti sono stati concordi nel ritenere la spettrometria NIR un potente mezzo di indagine per risalire all'identità genetica ed all'origine geografica degli oli extravergini di oliva.

Mignani *et al.* [16] hanno utilizzato la spettroscopia in assorbimento nel range spettrale UV-Vis-NIR (200-2800 nm) per discriminare gli oli prodotti in quattro regioni italiane a diversa latitudine (Lombardia, Toscana, Calabria e Sicilia), impiegando la regressione PCA in combinazione con la LDA per ricavare il modello di classificazione. Il test di affidabilità del modello ottenuto ha fornito un SEP del 18.8%.

Woodcock *et al.* [37] hanno combinato la spettroscopia NIR all'elaborazione chemometrica PLS-DA per verificare la provenienza geografica degli oli extravergini di oliva prodotti in diverse regioni dell'Unione Europea. Nello specifico, lo studio è stato condotto su 913 extravergini di tre annate ed ha riguardato il riconoscimento di oli liguri e non-liguri italiani, greci, spagnoli, francesi, ciprioti e turchi. Il miglior modello, con il 92.8% di classificazione corretta per gli oli liguri e l'81.5% per i non-liguri nel set di predizione, è stato costruito impiegando un ugual numero di campioni liguri e non-liguri nel set di calibrazione. I campioni di olio acquisiti in questa stessa ricerca sono stati oggetto di ulteriori studi di approfondimento da parte di Devos *et al.* [38] e di Oliveri *et al.* [39]. Quest'ultimi Autori hanno criticato l'uso delle tecniche di classificazione PLS e PLS-DA non ritenendole il miglior approccio chemometrico per identificare l'origine geografica degli oli, in quanto di solito si vuole accertare l'identità di una sola classe (ovvero, gli oli di una determinata DOP) confrontandola con oli extravergini diversi. I dati NIR acquisiti da Woodcock *et al.* [37] sono stati quindi sottoposti a tecniche di classificazione SIMCA, UNEQ (Unequal Class Spaces) e POTFUN (Potential Function Techniques), ottenendo risultati simili a quelli prodotti dalla PLS-DA ma con basi teoriche più solide. Nella ricerca di Devos *et al.* [38], invece, questo stesso set di dati NIR è stato oggetto di un confronto con le risposte fornite dalla spettroscopia MIR, applicando una strategia di pre-trattamento dei dati basata sull'algoritmo genetico (genetic algorithm, GA) per la simultanea ottimizzazione della SVM (Support Vector Machine) e la rimozione delle informazioni non utili. Per discriminare gli oli liguri dai non-liguri sono stati quindi confrontati statisticamente tre modelli NIR di classificazione (PLS-DA, SVM e GENOPT-SVM), il migliore dei quali (SVM) ha

consentito di migliorare la performance dei risultati (SVM: 86.3%; PLS-DA: 82.8%). Nel caso delle acquisizioni MIR, sono stati necessari tre step di pretrattamento per ottenere il modello ottimizzato SVM, anch'esso più efficiente di quello ricavato mediante PLS-DA (SVM: 82.2% di accuratezza, contro il 78.6% del modello PLS-DA).

Identificare l'origine geografica degli oli extravergini liguri impiegando la spettroscopia FT-NIR è stato anche lo scopo degli studi di Casale *et al.* [40]. Gli Autori hanno testato diverse tecniche di modellamento di classe (POTFUN, SIMCA, UEQ-QDA, Unequal-Quadratic Discriminant Analysis; MRM, Multivariate Range Modelling) e differenti metodi di pretrattamento dei dati, ottenendo modelli con una buona abilità predittiva tra cui il migliore è stato quello MRM. Gli oli della Liguria sono risultati ben differenziati dagli extravergini non-liguri del commercio, permettendo la costruzione di modelli di classe con buona abilità predittiva ed alta sensibilità. Utilizzando un set ristretto di 8 variabili selezionate, si è ottenuta una specificità di classificazione corretta compresa tra 72.30 e 100%; nel caso in cui gli Autori hanno impiegato tutte le variabili, la specificità del modello è risultata pari al 100%.

L'intento di discriminare l'origine geografica degli oli (nello specifico, di cinque oli extravergini a DOP francesi) è stato raggiunto da Galtier *et al.* [19] utilizzando un diverso approccio. In questo lavoro, infatti, sono stati elaborati modelli chemometrici PLS1-DA costruiti con dati analitici (composizione quali-quantitativa in trigliceridi ed acidi grassi) e spettrometrici NIR. Entrambi i modelli hanno fornito risultati soddisfacenti, dimostrando la capacità delle acquisizioni spettroscopiche di discriminare gli oli oggetto di studio con una accuratezza soddisfacente e simile a quella ottenibile con le ben più costose e laboriose analisi cromatografiche. In un successivo studio, Galtier *et al.* [41] hanno perseguito il medesimo obiettivo testando varie tecniche chemometriche (SIMCA, PLS2-DA, PLS2-DA-SIMCA e PLS1-DA) applicate ai soli dati spettrali NIR, rilevando la superiore efficienza del metodo PLS1-DA (100% di classificazione corretta (CC) nel set di predizione) rispetto agli altri; tra tutti, il metodo SIMCA è risultato il meno efficace. La selezione delle regioni spettrali nel range 5550-6500 cm^{-1} ha consentito di raggiungere un'analogia CC del 100% per il modello PLS2-DA, nonché di migliorare la performance degli altri due modelli (SIMCA e PLS2-DA-SIMCA). Questi risultati dimostrano che l'ottimizzazione dei modelli chemometrici implica un lavoro complesso, che va perseguito impiegando strategie elaborative diverse.

Individuare l'origine degli oli extravergini è stato anche l'obiettivo di Sinelli *et al.* [42], che hanno utilizzato tecniche spettroscopiche FT-NIR e FT-IR per confrontare gli oli monovarietalì estratti da olive raccolte in Lombardia (cv. Casaliva), Toscana (cv. Leccino) e Calabria (cv. Frantoio) con oli multivarietalì del commercio, prodotti nelle medesime regioni italiane. L'attendibilità dei modelli ottenuti è stata testata tramite PLS-DA e SIMCA. Dallo studio è emersa la migliore capacità discriminante dell'algoritmo PLS-DA rispetto al SIMCA e che le principali lunghezze d'onda in grado di spiegare la variazione legata all'origine geografica degli oli erano quelle, sia NIR che MIR, relative ai gruppi funzionali dei trigliceridi. È stato inoltre riscontrato che mentre la spettroscopia NIR si è rivelata più efficace per gli oli industriali, con il 90% dei campioni correttamente classificati, i dati MIR hanno discriminato meglio gli oli industriali da quelli monovarietalì, classificando correttamente oltre il 95% dei campioni. Anche in un successivo lavoro Sinelli *et al.* [27] hanno valutato la possibilità di riconoscere l'identità genetica degli oli extravergini monovarietalì Casaliva, Leccino e Frantoio, ma questa volta utilizzando la spettroscopia nei range NIR e MIR e applicando le tecniche LDA e SIMCA ad un set ristretto di dati, selezionati mediante algoritmo SELECT. È emerso così che le bande NIR con il più alto potere discriminante erano quelle associate agli acidi grassi, fenoli, trigliceridi e tocoferoli. Lo studio ha rilevato una migliore efficienza dei modelli LDA rispetto ai SIMCA e dei modelli MIR rispetto ai NIR (capacità predittiva media: MIR-LDA, 86.6%; NIR-LDA: 83%). L'opportunità di utilizzare l'algoritmo SELECT per selezionare le variabili NIR e MIR più adatte a discriminare gli oli extravergini Casaliva, Leccino e Frantoio è stata confermata da altri lavori, che hanno confrontato l'efficienza dei modelli LDA elaborati sia singolarmente (NIR e MIR) che in combinazione (NIR+MIR) [43]. I risultati di queste indagini hanno ribadito la superiorità dei modelli costruiti con le variabili MIR piuttosto che NIR, ma hanno evidenziato che la più alta capacità predittiva (compresa, a seconda del numero di variabili selezionate, tra l'87.8% ed il 90.2%) è stata raggiunta combinando i due set di dati (NIR+MIR). Il simultaneo impiego dei dati spettroscopici NIR e MIR non ha invece potenziato l'affidabilità dei modelli PLS elaborati da Dupuy *et al.* [44], in una ricerca finalizzata ad identificare le aree geografiche di provenienza di sei oli vergini DOP francesi. Anche questi Autori, inoltre, hanno riscontrato che il modello costruito sulla base dei dati MIR manifestava una migliore capacità discriminante.

La superiore capacità predittiva della spettroscopia MIR rispetto al NIR nell'identificare l'origine genetica o geografica degli oli non è tuttavia una regola, come dimostra lo studio di Bevilacqua *et al.* [45]. In questo lavoro i dati spettrali NIR e MIR ottenuti analizzando oli extravergini Sabina DOP (Lazio) e oli extravergini di altra provenienza (anche estera) sono stati abbinati alle tecniche chemometriche PLS-DA e SIMCA. Eccellenti risultati sono stati ottenuti applicando l'algoritmo PLS-DA agli spettri NIR, ottenendo un modello in grado di discriminare gli oli Sabina DOP con una accuratezza in validazione del 92.3%. I modelli SIMCA, sebbene affetti da prestazioni meno efficienti, hanno confermato le migliori prestazioni del range spettrale NIR, assicurando comunque buoni valori di specificità e sensibilità. Casale *et al.* [18], in uno studio in cui sono state comparate tecniche spettroscopiche UV-Vis, NIR e MIR, hanno costruito accurati modelli chemometrici atti a verificare l'autenticità dell'olio DOP Chianti Classico (Toscana) sulla base del profilo acidico, verificato mediante analisi gascromatografica. Gli Autori hanno rilevato che i più accurati modelli di classificazione UNEQ e SIMCA sono stati ottenuti impiegando i dati spettroscopici piuttosto che chimici, e che i migliori sono stati quelli elaborati utilizzando le informazioni NIR (UNEQ) e UV-Vis (SIMCA). Inoltre, la fusione delle informazioni fornite dalle tre tecniche strumentali (NIR, MIR e UV-Vis) ha consentito di incrementare la performance dei risultati. La migliore prestazione dei dati NIR rispetto ai MIR emerge anche dai già citati studi di Devos *et al.* [38], condotti per discriminare l'origine degli oli liguri dai non liguri.

Nell'originale lavoro di Oliveri *et al.* [46], l'intento di autenticare l'olio DOP Chianti Classico (Toscana) è stato perseguito confrontando l'efficienza della spettroscopia (FT-NIR e UV-Vis) con quella della lingua elettronica e di un particolare naso elettronico, non basato su sensori (i volatili prelevati dallo spazio di testa del campione vengono analizzati direttamente da uno spettrometro di massa, senza ricorrere a separazioni cromatografiche). Il set dei campioni era costituito da oli della DOP oggetto di studio ed oli non-DOP prodotti in una zona geografica molto vicina (Maremma). Per costruire i modelli sono state impiegate metodiche chemometriche sia classiche (SIMCA e UNEQ) che alternative (MRM, e CAMM, CAIMAN Analogues Modelling). Tutti i set di dati sono stati pretrattati mediante SNV e Mean Centering (MC). Per i dati raccolti con le tecniche spettrofotometriche, gli Autori hanno selezionato i range spettrali 4400–8900 cm^{-1} (FT-NIR) e 290-730 nm (UV-Vis). Mentre naso e lingua elettronici non sono risultati idonei, i migliori modelli spettroscopici sono

stati ottenuti con i dati FT-NIR, che hanno fornito ottime prestazioni predittive forzando l'efficienza del modello al 100%. Lo stesso naso elettronico è stato anche utilizzato, in abbinamento alle analisi spettroscopiche FT-NIR e UV-Vis, per discriminare gli oli extravergini liguri da altri oli extravergini italiani e spagnoli [47]. In questo caso, la strategia vincente è risultata quella di costruire modelli SIMCA e UNEQ-QDA utilizzando le variabili estratte dall'intero set di dati (FT-NIR + UV-Vis + naso elettronico), selezionate mediante algoritmo SELECT. In questo modo è stato possibile ottenere eccellenti modelli (100% di campioni correttamente classificati; 100% di predizione interna totale), testati mediante cross-validazione interna a 5 gruppi.

Un particolare approccio matematico di elaborazione dei dati spettrali è stato seguito da Lin *et al.* [48], che hanno abbinato la spettroscopia Vis-NIR ad un nuovo metodo di calibrazione multivariata (pre-elaborazione dei dati mediante Direct Orthogonal Signal Correction, DOSC; selezione delle variabili spettrali mediante GA; analisi di regressione PLS) per identificare l'origine geografica di oli extravergini prodotti in Italia, Spagna e Turchia. Tra i vari modelli chemometrici testati (PLS, GA-PLS, DOSC-PLS e DOSC-GA-PLS), quello DOSC-GA-PLS è risultato il migliore, con un RPD pari a 0.093 ed un coefficiente di correlazione della calibrazione (R^2 in predizione) pari 0.987.

La spettroscopia NIR associata a tecniche chemometriche ha esibito ottime potenzialità anche per rilevare l'origine varietale di oli extravergini non prodotti nell'UE, come hanno dimostrato i risultati di uno studio preliminare recentemente condotto da Laroussi *et al.* [49] su oli extravergini tunisini.

Dalla disamina degli studi recentemente condotti, dunque, emerge che l'analisi NIR combinata con adeguate tecniche multivariate di elaborazione dei dati spettroscopici costituisce un approccio analitico decisamente utile per rilevare il legame esistente tra origine genetica/geografica delle olive e caratteristiche compositive dell'olio extravergine, ma per poter impiegare efficacemente tale metodica nelle indagini di tracciabilità del prodotto è importante sottolineare l'esigenza di ulteriori studi atti a costruire modelli sufficientemente robusti ed affidabili, tali da coprire le varie fonti di variazione legate all'annata, allo stadio di maturazione delle drupe ed alla tecnologia impiegata nel processo estrattivo.

In Tabella II sono riepilogati sinteticamente i diversi impieghi della spettroscopia NIR per valutare la tipicità e degli oli extravergini di oliva e svelare frodi.

Gli sviluppi nell'ambito della messa a punto di sensori a fibra ottica evidenziano che le potenzialità della spettroscopia NIR sono ancora più ampie e non completamente espresse. Nuove tecnologie NIR basate su sensori a fibra ottica sono state recentemente testate per valutare l'origine, l'autenticità e la qualità degli oli extravergini di oliva, con risultati estremamente interessanti e promettenti [50-54]. In particolare, la miniaturizzazione dei sensori permette lo sviluppo di soluzioni utilizzabili per la progettazione di strumentazioni, anche portatili, a basso costo e facilmente implementabili nelle linee di processo [53], nonché di realizzare originali sistemi di rilevamento dei caratteri qualitativi, come sistemi di chiusura delle bottiglie in grado di monitorare, in maniera non distruttiva, il degrado olfattivo degli oli extravergini nel corso dello stoccaggio [54].

6. CONCLUSIONI

Nell'ambito del controllo analitico degli oli extravergini, la spettroscopia NIR costituisce una tecnica di indagine particolarmente versatile, utile a monitorare praticamente tutti gli aspetti qualitativi del prodotto. Il suo impiego in abbinamento ad adeguate strategie di elaborazione chemometrica consente infatti non solo di stimare i parametri chimico-fisici di legge, ma anche di compiere accurati screening della composizione chimica (relativamente alla frazione sia maggiore che minore), nonché di accertare la purezza degli oli commerciali e l'autenticità dei marchi di tutela giuridica. Tra le più recenti e stimolanti applicazioni della spettroscopia NIR vi è la possibilità di determinare, mediante una obiettiva e rapida analisi strumentale, le caratteristiche sensoriali degli oli, per definire le quali l'esame organolettico rappresenta ancor oggi il metodo per eccellenza.

Nell'industria alimentare, il monitoraggio di processo è una delle esigenze più sentite per ottimizzare i costi di produzione ed assicurare la qualità dei prodotti. Tra le caratteristiche più interessanti della spettroscopia NIR vi è la semplicità di trasferimento tecnologico, che consente l'impiego di strumentazioni portatili utilizzabili per misure rapide ed in loco o la diretta implementazione on-line nelle linee produttive. In quest'ottica, la spettroscopia NIR offre la possibilità di modificare, in tempo reale, le variabili del processo estrattivo che condizionano i caratteri salutistici e sensoriali degli oli extravergini, consentendo di pervenire ai massimi livelli qualitativi del prodotto ottenibile da ogni singola partita di olive.

I progressi della più recente ricerca scientifica dimostrano dunque che la spettroscopia NIR abbinata alla chemometria potrebbe essere efficacemente impiegata in sostituzione o in supporto alle classiche metodiche analitiche, con errori di predizione accettabili per un possibile trasferimento industriale. Va tuttavia sottolineato che il buon impiego di questa tecnica prevede alle spalle un complesso lavoro di ricerca, con cui selezionare le metodiche di pretrattamento degli spettri e valutare le migliori tecniche chemometriche di classificazione e/o regressione, da compiere in stretta collaborazione con l'industria del settore. Particolarmente importante e delicata è l'attività rivolta alla calibrazione e validazione dei modelli, che deve essere condotta utilizzando un quantitativo di dati sufficientemente rappresentativo, acquisito con campioni provenienti da differenti areali produttivi ed in condizioni climatiche ed operative variabili. Tali accorgimenti rappresentano una condizione necessaria per lo sviluppo di robusti modelli matematici, in grado di consentire misure affidabili e riproducibili anche in condizioni di indagine altamente variabili.

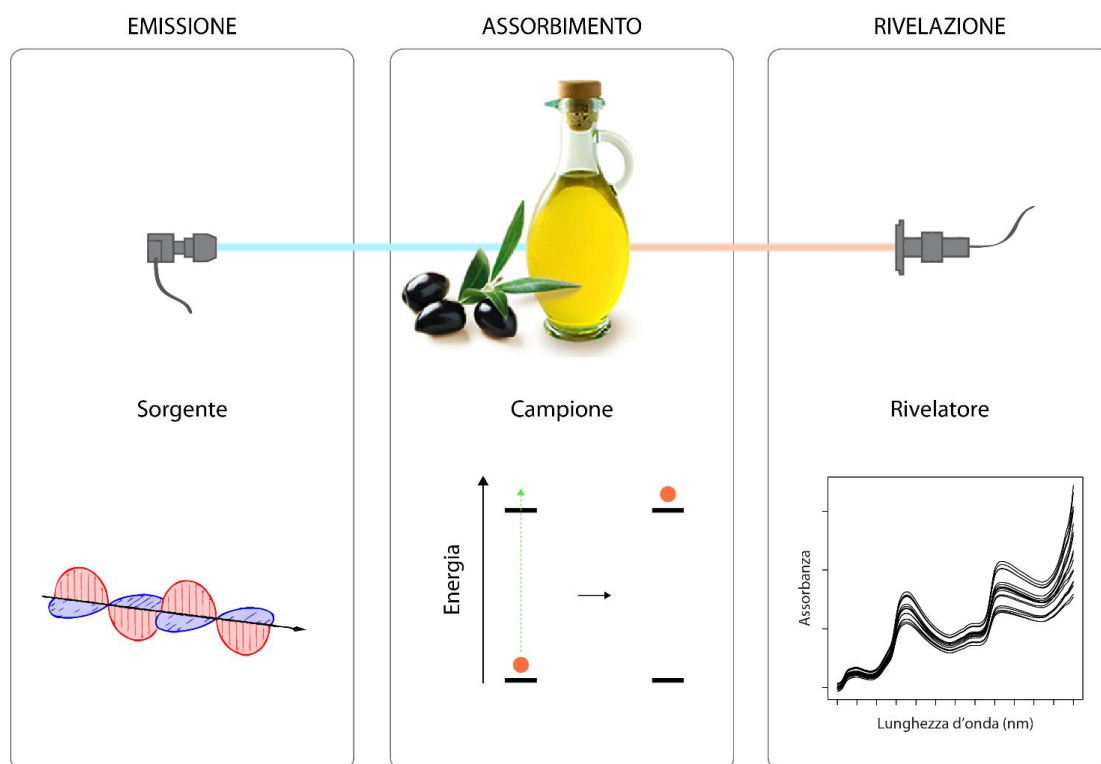


Figura 1. Schema semplificato del principio di funzionamento della spettroscopia

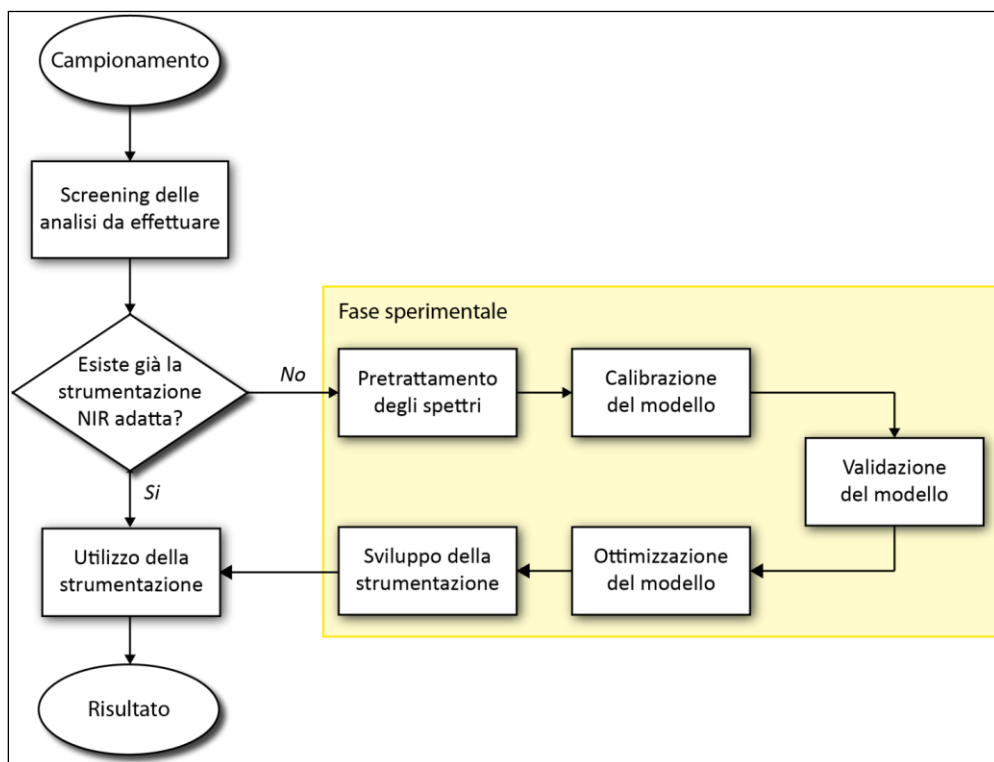


Figura 2. Diagramma delle fasi di sviluppo ed impiego di un modello predittivo basato su tecnologia NIR

Tabella I: Spettroscopia NIR applicata alla caratterizzazione quali-qualitativa degli oli extravergini

ELEMENTO DI INDAGINE	TECNICA CHEMO-METRICA	RISULTATI	RANGE SPETTRALE INVESTIGATO	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
Acidità	PLS	RMSEP: 0.034%	11726-4541 cm^{-1}	Armenta et al., 2007 [14]
		limite di rilevamento: 0.03%	(850-2200 nm)	
		$R^2_{\text{Cal}} = 0.99$		
Acidità	PLS	RMSECV: 0.033%	6100-4600 cm^{-1}	Bendini et al., 2007 [15]
		RMSEP: 0.036%	(1640-2173 nm)	
		$R^2_{\text{CV}} = 0.986$		
		$R^2_{\text{Val}} = 0.987$		
Parametri qualitativi	PCA		200-2800 nm	Mignani et al., 2008 [16]
	LDA			
<i>Acido oleico</i>	PLS	$R^2_{\text{Cal}} = 0.84$		
<i>numero di perossidi</i>		$R^2_{\text{Cal}} = 0.96$		
K_{232}		$R^2_{\text{Cal}} = 0.99$		
K_{270}		$R^2_{\text{Cal}} = 0.98$		
Parametri qualitativi	PLS		NIR	
<i>Acidi grassi</i>		$R^2_{\text{Pred}} = 0.99$		Mossoba et al., 2013 [17]
Parametri qualitativi	PLS		190–1100 nm	Casale et al., 2012 [18]
<i>Acido oleico</i>		RMSECV= 0.597; RMSEP= 0.269	10000–4000 cm^{-1}	
<i>Acido linoleico</i>		RMSECV= 0.145; RMSEP= 0.073	(1000-2500 nm)	

Parametri qualitativi	PLS1-DA		10000-4500 cm ⁻¹	Galtier et al., 2007 [19]
<i>acidi grassi e trigliceridi</i>		$REP < 10\%$	(1000-2500 nm)	
<i>ad alta concentrazione</i>		$REP < 5\%$		
<i>squalene</i>		$R^2_{Pred} = 0.96; SEP = 0.05$		
Stabilità ossidativa	PLS		12000-4000 cm ⁻¹	Watiez et al., 2013 [20]
<i>acidità</i>		$R^2_{Val} = 0.98; RMSEP = 0.016; SEP = 0.613$	(830-2500 nm)	
<i>numero di perossidi</i>		$R^2_{Val} = 0.95; RMSEP = 0.617; SEP = 0.613$		
Stabilità ossidativa	PLS		350-2500 nm	Cayuela Sánchez et al., 2013 [21]
<i>OSI</i>		$R^2_{Cal} = 0.93-0.94$		
<i>Acidità</i>		$R^2_{Cal} = 0.86; SEP = 0.35\%$		
<i>numero di perossidi</i>		$R^2_{Cal} = 0.87; SEP = 3.82\%$		
K_{232}		$R^2_{Cal} = 0.82; SEP = 0.32\%; RPD \sim 3$		
Stabilità ossidativa	PLS		10000-4500 cm ⁻¹	Plard et al., 2013 [22]
<i>numero di perossidi</i>		$R^2_{Val} = 0.97; SEP = 4.09$	(1000-2220 nm)	
<i>TOTOX</i>		$R^2_{Val} = 0.97; SEP = 7.83$		
<i>acidità libera</i>		$R^2_{Val} = 0.97; SEP = 0.09$		
Stabilità ossidativa a 180°C	PCA		33000-9000 cm ⁻¹	Maggio et al., 2011 [23]
<i>tempo di riscaldamento</i>	PLS	$R^2_{Pred} = 0.998$	(303-1110 nm)	

Componenti minori e caratteri sensoriali	PLS		12500–4000 cm ⁻¹ (835-2500 nm)	Inarejos-García et al., 2013 [26]
<i>alcoli C6</i>		$R_{Cal} = 0.69-0.80$		
<i>fenoli totali (Folin-Ciocalteu)</i>		$R_{Val} = 0.90$		
<i>composti fenolici</i>		$R_{Pred} > 0.70$		
<i>derivati idrossitirosolo</i>		$R_{Val} = 0.85$		
<i>α-tocoferolo</i>		$R_{Cv} = 0.71$		
<i>amaro</i>		$R_{Val} = 0.83$		
<i>fruttato</i>		$R_{Val} = 0.80$		
Caratteri sensoriali	PCA		12500-4500 cm ⁻¹	Sinelli et al., 2010 [29]
	SIMCA		(800-2220 nm)	
<i>oli difettati/non difettati</i>	LDA	<i>accuratezza</i> = 99.1%		
<i>fruttato (intenso, medio, leggero)</i>		<i>accuratezza</i> = 98%		

Tabella II. Spettroscopia NIR applicata alla valutazione dell'autenticità e tipicità dell'olio extravergine

ELEMENTO DI INDAGINE	TECNICA CHEMO-METRICA	OLI ANALIZZATI	RISULTATI	RANGE SPETTRALE INVESTIGATO	RIF. BIBLIOGRAFICO
Adulterazione	GILS	oliva	$SEP = 2.49\%$ (miscele binarie), 1.42% (miscele terziarie)	1000-2500 nm	Özdemir e Öztürk, 2007 [33]
		girasole	$SEP = 2.88\%$ (miscele binarie), 5.42% (miscele terziarie)		
		mais	$SEP = 6.38\%$ (miscele terziarie)		
Adulterazione	GILS, PLS	oliva	$SEP = 2.45\%$; $R^2_{val} = 0.90 \div 0.99$	$10000-4000\text{ cm}^{-1}$	Öztürk et al., 2010 [34]
		mais	$SEP = 5.09\%$	(1000-2500 nm)	
		girasole	$SEP = 3.93\%$		
		soia	$SEP = 0.94\%$		
		cotone	$SEP = 2.81\%$		
Adulterazione	PLS	vergine di oliva		$12000-3700\text{ cm}^{-1}$	Weng et al., 2009 [35]
		sesamo	$R = 98.77$; $RMSECV = 1.3$	(835-2700 nm)	
		soia	$R = 99.37$; $RMSECV = 1.1$		
		girasole	$R = 99.44$; $RMSECV = 1.0$		
Adulterazione	PCR	extravergine di oliva, olio di oliva raffinato e olio di oliva deodorato	$R^2_{Cv} > 0.97$; $R^2_{Pred} > 0.98$	NIR	Wojcicki et al., 2014 [36]
			$RMSEP = 2.7$		
	PLS		$R^2_{Cv} > 0.97$; $R^2_{Pred} > 0.96$		
			$RMSEP = 3.9$		
Tipicità	PCA	Lombardia, Toscana, Calabria e Sicilia		200-2800 nm	Mignani et al., 2008 [16]
	LDA		$SEP = 18.8\%$		

Tipicità	PCA	Liguria	<i>Sensitività</i> = 93%	1100-2500 nm	Woodcock et al., 2008 [37]
	PLS-DA	non-Liguria: Italia, Grecia, Spagna, Francia, Cipro e Turchia	<i>Specificità</i> = 82%		
Tipicità	PLS-DA	Liguria e non-Liguria (Italia)	<i>Accuratezza</i> = 82.8%	1100-2498 nm	Devos et al., 2014 [38]
	SVM		<i>Accuratezza</i> = 86.3%		
Tipicità	SIMCA	Liguria e altre regioni italiane, Spagna, Francia, Grecia, Cipro e Turchia	<i>Specificità</i> = 87.7%	1100–2498 nm	Oliveri et al., 2011 [39]
			<i>Sensitività</i> = 81.4%		
	UNEQ		<i>Sensitività</i> = 90		
			<i>Specificità</i> = 70.2%		
	POTFUN		<i>Sensitività</i> = 80%		
			<i>Specificità</i> = 86.3%		
Tipicità	MRM	extravergini Liguria/non-Liguria	<i>Specificità</i> = 72.30÷100%	10000-4000 cm ⁻¹ (1000-2500 nm)	Casale et al., 2008 [40]
	POTFUN				
	SIMCA				
	UEQ-QDA				
Tipicità	PLS1-DA	DOP francesi	<i>Accuratezza</i> = 100%	10000-4000 cm ⁻¹	Galtier et al., 2011 [41]
	PLS2-DA		<i>Accuratezza</i> = 100%	(1000-2500 nm)	
	SIMCA				
	PLS2-DA-SIMCA				
Tipicità	PCA	cv Casaliva, Leccino e Frantoio		12500-4500 cm ⁻¹	Sinelli et al., 2008 [42]
	LDA			(800-2220 nm)	
	SIMCA				
	PLS-DA		<i>Accuratezza</i> ~ 90% campioni		

Tipicità	LDA	cv Casaliva, Leccino e Frantoio	Accuratezza= 83%	12500–4500 cm ⁻¹	Sinelli et al., 2010 [27]
				(800-2220 nm)	
	SIMCA				
Tipicità	LDA	cv Casaliva, Leccino e Frantoio	Accuratezza= 87.8÷90.2%	12500–4500 cm ⁻¹	Casale et al., 2010 [43]
			Accuratezza cv Leccino= 93% (NIR+MIR)	(800-2220 nm)	
				4000-700 cm ⁻¹	
				(2500-14285 nm)	
Tipicità	PLS	DOP francesi	Errore di classificazione= 0÷7%	10000-4000 cm ⁻¹	Dupuy et al., 2010 [44]
	PLS1-DA			(1000-2220 nm)	
	PCA				
Tipicità	PLS-DA	extravergini DOP Sabina ed extravergini di diversa origine	Calibrazione:	10000-4000 cm ⁻¹ (1000-2500 nm)	Bevilacqua et al., 2012 [45]
			sensitività= 100%		
			specificità= 95.4%		
			Validazione:		
	SIMCA		sensitività= 76.92%		
			specificità= 95.45%		
Tipicità	UNEQ	DOP Chianti Classico ed extravergini toscani	Specificità forzata= 100%	10000–4000 cm ⁻¹	Casale et al., 2012 [18]
			Efficienza forzata= 100%	(1000-2500 nm)	
	SIMCA				
Tipicità	UNEQ	DOP Chianti Classico ed extravergini toscani		290-730 nm	Oliveri et al., 2011 [46]
	SIMCA		Sensitività forzata= 100%	4400-8900 cm ⁻¹	

			<i>Efficienza forzata= 100%</i>		
	CAMM			(1120-2270 nm)	
	PCA				
Tipicità	PCA	extravergini liguri (DOP/non DOP) e non liguri (Italia e Spagna)	<i>100% predizione interna totale con FT-NIR+UV-Vis+naso elettronico</i>	10000-4000 cm ⁻¹	Casale et al., 2010 [47]
	SIMCA			(1000-2500 nm)	
	UNEQ-QDA				
Tipicità	PLS	Italia, Turchia e Spagna		325-1075 nm	Lin et al., 2012 [48]
	GA-PLS				
	DOSC-PLS				
	DOSC-GA-PLS		$RPD = 0.093$		
			$R^2_{Cal} = 0.987$		
			$R^2_{Cv} = 0.99$		
			$R^2_{Pred} = 0.99$		
Tipicità	PCA	Tunisia		1000-2500 nm	Laroussi et al., 2013 [49]
	PLS2-DA	cv Chemlali	$R^2_{Cal} = 0.97$; $R^2_{Val} = 0.97$; $SEP = 0.13$		
		cv Chetoui	$R^2_{Cal} = 0.96$; $R^2_{Val} = 0.86$; $SEP = 0.24$		
		cv Oueslati	$R^2_{Cal} = 0.92$; $R^2_{Val} = 0.70$; $SEP = 0.23$		

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Tura, C. Gigliotti, S. Pedò, O. Failla, D. Bassi, A. Seraio, Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea* L.) and correlations with oxidative stability, *Sci. Hortic.* 112, 108-119(2007)
- [2] M. Servili, R. Selvaggini, S. Esposto, A. Taticchi, G.F. Montedoro, G. Morozzi, Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil, *J. Chromatogr., A.* 1054, 113-127(2004)
- [3] S. Rajendran, Detection of insect infestation in stored foods, *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 163-232(2005)
- [4] B.M. Nicolaï, K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K.I. Theron, J. Lammertyn, Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review, *Postharvest Biol. Technol.* 46, 99-118(2007)
- [5] D.A. Burn, W.E. Ciurczak, *Handbook of Near-Infrared Analysis* (3rd ed.), CRC Press, London. (2008)
- [6] M. Casale, R. Simonetti, Review: near infrared spectroscopy for analysing olive oils, *J. Near Infrared Spectrosc.* 22, 59-80(2014)
- [7] R. Massantini, P. Carlini, G. Anelli, Spettroscopia NIR nella valutazione qualitativa degli ortofrutticoli in post-raccolta, *Industrie Alimentari* 34, 321-326(1997)
- [8] C. Pasquini, Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 14, 198-219(2003)
- [9] R.A. Fisher, The goodness of fit regression formulae and the distribution of regression coefficients, *J. R. Statist. Soc.* 85, 587-612(1922)
- [10] T. Naes, T. Isaksson, T. Fearn, T. Davies, *A user-friendly guide to multivariate calibration and classification*, NIR Publications (2002)
- [11] T. Coen, W. Saeys, H. Ramon, J. De Baerdemarker, Optimizing the tuning parameters of least squares support vector machines regression for NIR spectra, *J. Chemometr.* 20(5), 184-192(2006)

- [12] H. Cen, Y. He, Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality, *Trends Food Sci. Technol.* 18, 72-83(2007)
- [13] M.K. Boysworth, K.S. Booksh, Aspects of Multivariate Calibration Applied to Near-Infrared Spectroscopy, In Burn, D. A., & Ciurczak, W. E. (Eds.), *Handbook of Near-Infrared Analysis* (3rd ed.) CRC Press, 207-229(2008)
- [14] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 596, 330-337(2007)
- [15] A. Bendini, L. Cerretani, F. Di Virgilio, P. Belloni, G. Lerker, T.G. Toschi, In-process monitoring in industrial olive mill by means of FT-NIR, *Eur J Lipid Sci Tech* 109, 498-504(2007)
- [16] A.G. Mignani, P.B. García-Allende, L. Ciaccheri, O.M. Conde, A. Cimato, C. Attilio, D. Tura, Comparative analysis of quality parameters of Italian extra virgin olive oils according to their region of origin, *Proc. SPIE: Optical Sensors* 7003, 700326-1/6 (2008)
- [17] M.M. Mossoba, H. Azizian, C. Tyburczy, J. K. G. Kramer, P. Delmonte, Kia A. Fardin, J.I. Rader, Rapid FT-NIR analysis of edible oils for total SFA, MUFA, PUFA, and trans FA with comparison to GC, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 757–770(2013)
- [18] M. Casale, P. Oliveri, C. Casolino, N. Sinelli, C. Armanino, M. Forina, S. Lanteri, Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV–visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques, *Anal. Chim. Acta* 712, 56-63(2012)
- [19] O. Galtier, N. Dupuy, Y. Le Dréau, D. Ollivier, C. Pinatel, J. Kister, J. Artaud, Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra, *Anal. Chim. Acta* 595, 136–144(2007)
- [20] M. Watiez, D. Truant, M. Verhille, A.L. Reau, F. Mougenot, S. Breton, R. Cinier, P. Oliger, A. Huertas, From seeds to oil, the use of FT-NIRS for edible oil manufacturing, *Proceeding of ‘NIR2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy’*, 2-7 Giugno, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment, 122-127(2013)

- [21] J.A. Cayuela Sánchez, W. Moreda, J.M. García, Rapid determination of olive oil oxidative stability and its major quality parameters using Vis/NIR transmittance spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 61, 8056-8062(2013)
- [22] J. Plard, C. Rébufa, Y. Le Dréau, N. Dupuy, NIR PLS prediction of quality parameters of olive oils at different stages of ageing, *Proceeding of 'NIR2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy', 2-7 Giugno, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment*, 109-113(2013)
- [23] R.M. Maggio, E. Valli, A. Bendini, A.M. Gómez-Caravaca, T. Gallina Toschi, L. Cerretani, A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress, *Food Chem.* 127, 216-221(2011)
- [24] M. Servili, S. Esposto, R. Fabiani, S. Urbani, A. Taticchi, F. Mariucci, R. Selvaggini, G.F. Montedoro, Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and sensory activities according to their chemical structure, *Inflammopharmacology* 17, 1-9(2009)
- [25] A.L. Ronco, E. De Atéfani, Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging, *Funct. Foods Health Disease* 31, 462-476(2013)
- [26] A.M. Inarejos-García, S. Gómez-Alonso, G. Fregapane, M.D. Salvador, Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy, *Food Res. Int.* 50, 250–258(2013)
- [27] N. Sinelli, M. Casale, V. Di Egidio, P. Oliveri, D. Bassi, D. Tura, E. Casiraghi, Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy, *Food Res. Int.* 43, 2126-2131(2010)
- [28] F. Angerosa, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto, G.F. Montedoro, Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, *J. Chromatogr.* 1054:17-31(2004)
- [29] N. Sinelli, L. Cerretani, V. Di Egidio, A. Bendini, E. Casiraghi, Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity, *Food Res. Int.* 43, 369-375(2010)

- [30] S. Armenta, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, The use of near-infrared spectrometry in the olive oil industry, *Crit. Rev. Food Sci* 50, 567-582(2010)
- [31] A. Latala, R. Z. Morawski, Comparison of LS-TYPE methods for determination of olive oil mixtures on the basis of NIR spectral data, *Metrology Meas. Sys.* 15, 409-420(2008)
- [32] A. Miękina, R.Z. Morawski, A calibration method, based on piecewise ridge LS estimator designed for determination of olive oil mixtures on the basis of NIR spectral data, XIX IMEKO World Congress 'Fundamental and Applied Metrology' September 6–11, Lisbon, Portugal, 2559-2563(2009)
- [33] D. Özdemir, B. Öztürk, Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil, *J. Food Drug Anal* 15, 40–47(2007)
- [34] B. Öztürk, A. Yalçın, D. Özdemir, Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration, *J Near Infrared Spectrosc.* 18, 191-201(2010)
- [35] X.X. Weng, F. Lu, C.X. Wang, Y.P. Qi, Discriminating and quantifying potential adulteration in virgin olive oil by near infrared spectroscopy with BP-ANN and PLS, *Guang Pu Xue Guang Pu Fen Xi* 29, 3283-3287(2009)
- [36] K. Wójcicki, I. Khmelinskii, M. Sikorski, F. Caponio, V.M. Paradiso, C. Summo, A. Pasqualone, E. Sikorska, Spectroscopic techniques and chemometrics in analysis of blends of extra virgin with refined and mild deodorized olive oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *In press*
- [37] T. Woodcock, G. Downey, C. O'Donnell, Confirmation of declared provenance of European extra virgin olive oil samples by NIR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 56, 11520-11525(2008)
- [38] O. Devos, G. Downey, L. Duponchel, Simultaneous data pre-processing and SVM classification model selection based on a parallel genetic algorithm applied to spectroscopic data of olive oils, *Food Chem.* 148, 124-130(2014)

- [39] P. Oliveri, V. Di Egidio, T. Woodcock, G. Downey, Application of class-modelling techniques to near infrared data for food authentication purposes, *Food Chem.* 125, 1450-1456(2011)
- [40] M. Casale, C. Casolino, G. Ferrari, M. Forina, Near infrared spectroscopy and class modelling techniques for the geographical authentication of Ligurian extra virgin olive oil, *J. Near Infrared Spectrosc.* 16, 39-47(2008)
- [41] O. Galtier, O. Abbas, Y. Le Dréau, C. Rebufa, J. Kister, J. Artaud, N. Dupuy, Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions, *Vib. Spectrosc.* 55, 132-140(2011)
- [42] N. Sinelli, E. Casiraghi, D. Tura, G. Downey, Characterisation and classification of italian virgin olive oils by near- and mid-infrared spectroscopy, *J. Near Infrared Spectrosc.* 16, 335-342(2008)
- [43] M. Casale, N. Sinelli, P. Oliveri, V. Di Egidio, S. Lanteri, Chemometrical strategies for feature selection and data compression applied to NIR and MIR spectra of extra virgin olive oils for cultivar identification, *Talanta* 80, 1832-1837(2010)
- [44] N. Dupuy, O. Galtier, D. Ollivier, P. Vanloot, J. Artaud, Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis, *Anal. Chim. Acta* 666, 23–31(2010)
- [45] M. Bevilacqua, R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, F. Marini, Tracing the origin of extra virgin olive oils by infrared spectroscopy and chemometrics: a case study, *Anal. Chim. Acta* 717, 39-51(2012)
- [46] P. Oliveri, M. Casale, C. Casolino, M.A. Baldo, F. Nizzi Grifi, M. Forina, Comparison between classical and innovative class-modelling techniques for the characterisation of a PDO olive oil, *Anal. Bioanal Chem.* 399, 2105-2113(2011)
- [47] M. Casale, C. Casolino, P. Oliveri, M. Forina, The potential of coupling information using three analytical techniques for identifying the geographical origin of Liguria extra virgin olive oil, *Food Chem.* 118, 163–170(2010)

- [48] P. Lin, Y. Chen, Y. He, Identification of geographical origin of olive oil using visible and near-infrared spectroscopy technique combined with chemometrics, *Food Bioprocess Technol.* 5:235–242(2012)
- [49] S. Laroussi, P. Vanloot, J.Molinet, N. Kamoun, H. Hammami, N. Dupuy, J. Artaud, Varietal origin determination of six Tunisian olive oils by chemometric analysis of NIR spectra, *Proceeding of 'NIR2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy'*, 2-7 Giugno, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment, 30-34(2013)
- [50] A.G. Mignani, L. Ciaccheri, H. Thienpont, H. Ottevaere, C. Attilio, A. Cimato, Toward a hyperspectral optical signature of extra virgin olive oil, *Proc. SPIE Optical Sensor*, F.Baldini, J.Homola, R.A. Lieberman, M. Miler (Eds.), 6585, 65852C1-65852C6(2007)
- [51] A.G. Mignani, L. Ciaccheri, H. Ottevaere, H. Thienpont, L. Conte, M. Marega, A. Cichelli, C. Attilio, A. Cimato, Visible and near-infrared spectral signatures for adulteration assessment of extra virgin olive oil, *Proc. SPIE Optical Sensing and Detection*, F. Berghmans, A.G. Mignani, C.A. Van Hoof (Eds.), 7726, 77262C1-77262C5(2010)
- [52] A.G. Mignani, L. Ciaccheri, H. Ottevaere, H. Thienpont, L. Conte, M. Marega, A. Cichelli, C. Attilio, A. Cimato, Visible and near-infrared absorption spectroscopy by an integrating sphere and optical fibers for quantifying and discriminating the adulteration of extra virgin olive oil from Tuscany. *Anal. Bioanal. Chem.*, 399, 1315-1324(2011)
- [53] A.G. Mignani, L. Ciaccheri, A.A. Mencaglia, A. Cimato, Optical absorption spectroscopy for quality assessment of extra virgin olive oil, In B. Dimitrios (Ed.), *Olive oil - constituents, quality, health properties and bioconversions*, InTech, 56-63(2012)
- [54] A.G. Mignani, L. Ciaccheri, C. Cucci, A.A. Mencaglia, A. Cimato, C. Attilio, H. Thienpont, H. Ottevaere, R. Paolesse, M. Mastroianni, D. Monti, G. Buonocore, A. Del Nobile, A. Mentana, C. Dall'Asta, A. Faccini, G. Galaverna, A. Dossena, Eat-by-light: fiber-optic and micro-optic devices for food safety and quality assessment, *Proc. SPIE Third European Workshop on Optical Fibre Sensors*, 66190H, 1342-1348(2008)

5.3 Impiego di tecniche non distruttive per il riconoscimento di nocciole (*Corylus avellana* L.) di cultivar diverse

Letizia Carletti^a, Elisabetta Stella^a, Roberto Moschetti^a, Danilo Monarca^a, Massimo Cecchini^a, Brunella Ceccantoni^b, Riccardo Massantini^{b*}

¹Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia (DAFNE) - Università degli Studi della Tuscia - Via S.C. De Lellis - 01100 Viterbo - Italia

²Dipartimento di Innovazione dei Sistemi Biologici, Agroalimentari e Forestali (DIBAF) - Università degli Studi della Tuscia - Via S.C. De Lellis - 01100 Viterbo - Italia

*email: massanti@unitus.it

RIASSUNTO

Il presente lavoro intende dimostrare l'efficacia dell'impiego di tecniche non distruttive per il riconoscimento dei frutti di diverse cultivar di nocciolo (*Corylus avellana* L.). A tale scopo sono state impiegate l'analisi colorimetrica e la spettroscopia nel vicino infrarosso (Near-Infrared, NIR). Le cultivar prese in esame sono state la 'Tonda di Giffoni', la 'Tonda Gentile Romana' ed il 'Nocchione'. L'analisi colorimetrica non è stata in grado di risolvere la problematica, in quanto si è verificato soltanto un parziale riconoscimento delle cultivar, con un errore di discriminazione molto elevato (47,67%). Al contrario, l'impiego della spettroscopia NIR ha rivelato che questo sistema è pienamente idoneo allo scopo prefissato. In particolare la funzione discriminante ottenuta ha distinto con un errore totale dell'1% la 'Nocciola di Giffoni' IGP dalla 'Nocciola Romana', impiegando soltanto 2 lunghezze d'onda (1.980 nm e 2.060 nm).

Parole chiave: *Corylus avellana* L., spettroscopia NIR, colorimetro, analisi non distruttiva

Use of non destructive techniques for different hazelnut (*Corilus avellana* L.) cultivar kernel identification

SUMMARY

This research deals with the possibility of selecting different hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties using non destructive means. For this purpose colorimetric analysis and Near Infrared spectroscopy (NIR) were used. The examined varieties were 'Tonda di Giffoni', 'Tonda Gentile Romana' and 'Nocchione'. The colorimetric analysis did not solve the problem as it can only split partially the cultivar, with a very big discriminant error (47,67%). NIR Spettroscopy seems to be very effective and the discriminant function found can split with a very small total error (1%), the 'Tonda di Giffoni' PGI cultivar from the 'Romana Hazelnut' PDO cultivar, using through only two wavelengths (1.980 nm and 2.060 nm).

Keywords: *Corylus avellana* L., NIR spectroscopy, colorimeter, non destructive analysis

INTRODUZIONE

Uno dei principali scopi che la filiera corilicola persegue è l'ottenimento di prodotti di alta qualità, per soddisfare le richieste del mercato dei paesi sviluppati (Massantini *et al.*, 2009a). Per quanto concerne l'industria agro-alimentare, ai produttori è sempre più spesso richiesta una partita omogenea e di ottima qualità. Le industrie dolciarie preferiscono nocciole con caratteristiche chimico-fisiche, nutraceutiche ed organolettiche idonee alle caratteristiche del prodotto finito (Monarca *et al.*, 2009). Le principali caratteristiche merceologiche che devono avere i semi, secondo gli standard qualitativi dell'industria dolciaria, in relazione alla lavorazione e l'utilizzazione del prodotto sono: la sfericità del frutto, la percentuale in umidità, l'uniformità, l'elevata resa alla sgusciatura, la calibratura, il grado dei difetti del prodotto (male non occulto, cimiciato e marcio) nonché la rimozione del perisperma dopo la tostatura.

La resa alla sgusciatura ha particolare importanza in quanto viene utilizzata come parametro per la valutazione commerciale della merce al momento del

conferimento; il prezzo infatti è stabilito per punto-resa, ovvero viene valutata la percentuale di semi aventi ‘male occulto’ su 1 kg di nocciole intere.

In relazione alla morfologia, una forma sferoidale oltre a conferire un aspetto migliore al prodotto, fa sì che venga preferita dall’industria, in quanto può essere facilmente utilizzata per il confezionamento di praline o tavolette di cioccolato. Questa è una delle caratteristiche che fa preferire le cultivar coltivate in Italia per la produzione di alimenti dolciari, rispetto a quelle coltivate in altre parti del mondo (es. Turchia), soprattutto quando viene richiesto l’uso del seme nella sua interezza. L’industria dolciaria ed il mercato di alta qualità richiedono nella maggior parte dei casi nocciole intere di certe cultivar per enfatizzare il prodotto tradizionale e garantire produzioni di pregio (Massantini *et al.*, 2009b).

L’applicazione di tecniche non distruttive impiegate per il riconoscimento delle diverse cultivar potrebbe costituire un notevole vantaggio per l’industria stessa nel caso in cui si siano verificati errori umani durante il conferimento delle nocciole, sia stata persa la tracciabilità durante l’intera filiera di lavorazione o venga richiesta una specifica varietà. La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) e l’analisi colorimetrica rientrano tra le tecniche più adatte a questo scopo anche grazie alla loro potenziale applicabilità su macchine selezionatrici.

Precedenti studi, utilizzando la spettroscopia NIR, hanno permesso di osservare il diverso contenuto di umidità ed il tenore di acidità in varie cultivar di nocciolo quali la ‘Romana’, la ‘Ackakoca’, la ‘Mortarella’, la ‘Azerbaijan’, ed altre ancora, e di analizzare le relazioni tra di esse (Bellincontro *et al.*, 2005). Successive ricerche hanno analizzato la qualità delle nocciole durante la loro conservazione con il fine di valutare la capacità di discriminazione tra le nocciole di ‘buona’ o di ‘cattiva’ qualità (Bellincontro *et al.*, ‘ 2009). Recentemente, Moscetti *et al.* (2013) hanno identificato il male occulto delle nocciole attraverso l’uso della spettroscopia Vis/NIR.

La misurazione del colore è un importante indicatore per la valutazione della qualità dei prodotti alimentari. Valentini *et al.* (2003) hanno evidenziato come grazie alle analisi colorimetriche, strutturali e sensoriali, sia possibile una discriminazione delle varietà di nocciole. Tuttavia questo non è applicabile su macchine selezionatrici, in quanto basato su tecniche distruttive.

Lo scopo del seguente lavoro è quello di utilizzare tecniche non distruttive per il riconoscimento di diverse cultivar di nocciolo ('Tonda Gentile Romana', 'Nocchione' e 'Tonda di Giffoni') durante la selezione on-line. Ciò permette non solo di giungere ad una corretta valutazione qualitativa della materia prima, ma anche di ottemperare al disciplinare di produzione della 'Nocciola Romana' DOP (G.U. n 186 del 12-08-2009). Tale disciplinare prevede una presenza minima del 90% di 'Tonda Gentile Romana' e 'Nocchione' ed una misura massima del 10% di 'Tonda di Giffoni' e 'Barrettona'.

MATERIALI E METODI

Le nocciole utilizzate per l'analisi colorimetrica e la spettroscopia NIR sono state fornite dagli stabilimenti della Stelliferi & Itavex spa e della COPRONT (Caprarola, Viterbo). L'umidità media di tutti i campioni era pari al $4,4 \pm 0,1\%$. Le misurazioni, sia colorimetriche che allo spettroscopio NIR, sono state eseguite su 3 gruppi di nocciole delle varietà 'Tonda di Giffoni' (GIF), 'Nocchione' (NOC) e 'Tonda Gentile Romana' (TGR). Un quantitativo di 300 nocciole è stato selezionato da ciascun gruppo, allo scopo di eseguire le misurazioni su classi contraddistinte da nocciole dalle caratteristiche omogenee.

Analisi colorimetriche

L'analisi colorimetrica è stata condotta impiegando il colorimetro mod. CM-2600d (Konica Minolta, Osaka, Giappone), acquisendo i dati nello spazio di colore CIE 1976 o CIELAB. Su ogni nocciola le misurazioni sono state eseguite in 2 repliche. I dati colorimetrici sono stati acquisiti configurando il colorimetro secondo le impostazioni standard: CIE Standard Illuminant pari a D65 (Daylight), angolo di acquisizione (Observer) di 10° e diametro ottico di 6 mm (Small Area View, SAV). Le misurazioni sono state espresse nello spazio colorimetrico CIELAB (L^* , a^* e b^*). Le coordinate di colore sono state impiegate per determinare l'Angolo di colore o Tinta ($h = \tan^{-1} b^* a^{*-1}$) ed il Croma o Saturazione ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) di ciascuna replica, nonché la Differenza di Colore CIE 1976 ($\Delta E^* = [L^{*2} + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$) tra campioni. L'Analisi della Varianza ad una via (One-Way ANOVA) è stata eseguita per ogni parametro analizzato ed a seguito del test Post-Hoc è stata determinata la corrispondente Differenza Minima Significativa (o Least Significant Difference, LSD) per un appropriato livello di significatività ($P \leq 0,01$). Inoltre, sono stati determinati l'indice Cohen's d e la corrispondente area di overlap, al fine di valutare la significatività

statistica pratica (Stevens, 2001). Le variabili responsabili di una differenza significativa tra campioni sono state impiegate per la messa a punto di un modello predittivo di classificazione, ottenuto mediante la Linear Discriminant Analysis (LDA). I risultati sono stati espressi in termini percentuali, quali singoli errori commessi dalla funzione predittiva nell'assegnare per ciascun campione la rispettiva classe di appartenenza e quale errore globale di classificazione. L'elaborazione dei dati colorimetrici, l'analisi statistica e la LDA sono stati eseguiti mediante l'impiego del software statistico R ver. 2.30.0 (R Developer Core Team, 2013).

Analisi spettroscopiche nel vicino infrarosso

Le misurazioni nel vicino infrarosso sono state eseguite mediante l'impiego di uno spettrofotometro Acousto-Optic Tunable Filter-Near Infrared (AOTF-NIR) mod. Luminar 5030 Miniature 'Hand-held' Analyzer (Brimrose Corp., Baltimora, Stati Uniti). Lo strumento, dotato di un sensore Indio-Gallio-Arseniuro (InGaAs), è stato impiegato per eseguire acquisizioni nello spettro elettromagnetico compreso tra 1.100 nm e 2.300 nm (Yildiz *et al.*, 2001; USDA, 2009), ad una risoluzione di 2 nm ed una velocità di scansione di 60 ms. I dati ottenuti sono stati impiegati per la messa a punto di un modello statistico mediante LDA, seguendo la stessa metodica precedentemente descritta per l'analisi colorimetrica ed è stato testato per il riconoscimento di 2 classi ('Tonda di Giffoni' e 'Nocciola Romana' DOP). Al fine di incrementare le prestazioni del modello, gli spettri sono stati opportunamente pre-trattati ed il numero di lunghezze d'onda impiegate è stato ridotto alle variabili più rappresentative delle differenze tra classi. Le metodiche di pre-trattamento sono state utilizzate per ridurre fenomeni di fluttuazione della linea di base.

L'estrapolazione delle variabili rappresentative è stata eseguita mediante un algoritmo di Simulated Annealing (SA), selezionando da un minimo di 2 ad un massimo di 6 lunghezze d'onda per ogni singolo pre-trattamento e per ciascuna combinazione di pre-trattamenti. Il tetto massimo delle 6 lunghezze d'onda è stato fissato con l'intento di ridurre al minimo la complessità del modello statistico ed evitare fenomeni di 'overfitting'.

È stata eseguita un'analisi preliminare per l'elaborazione di un modello predittivo a 3 classi (GIF, TGR e NOC). Tuttavia, la funzione non è risultata sufficientemente performante nel discriminare le tre cultivar, evidenziando un alto

errore (22,9%) nel riconoscimento varietale tra ‘Nocchione’ e ‘Tonda Gentile Romana’. Conseguentemente, il modello LDA è stato sviluppato per 2 classi: l’una composta per intero da ‘Noccioline di Giffoni’ IGP (GIF) e l’altra costituita da frutti di ‘Nocciolina Romana’ DOP (NRM). Le prestazioni delle funzioni a 2 classi sono state espresse in termini percentuali, riportando l’errore globale di classificazione ed i singoli errori di attribuzione di classe (falso positivo e falso negativo). Al falso positivo (fp) è corrisposta l’erronea classificazione di noccioline GIF in NRM; viceversa per ciò che concerne il falso negativo (fn). Le prestazioni delle funzioni discriminanti a 2 classi sono state ulteriormente testate mediante l’analisi Receiver Operating Characteristics (ROC), ricavando la corrispondente curva ROC e calcolando l’area sottintesa alla curva in questione (Area Under the ROC Curve, AUC).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Analisi colorimetriche

L’analisi nello spazio CIELAB ha evidenziato l’esistenza di una forte differenza significativa ($P \leq 0,01$) tra le variabili colorimetriche delle diverse varietà di noccioline sgusciate. Tramite il test Post-Hoc, tali differenze sono state imputate principalmente alle coordinate L^* ed a^* , ed in minor misura alla b^* . Tra le risultanti variabili h e C , all’angolo di colore sono corrisposti valori diversi per tutti i campioni, mentre il croma è risultato statisticamente differente soltanto nella varietà ‘Tonda Gentile Romana’. Le noccioline della cultivar in questione erano contraddistinte da una più elevata luminosità e da tenori di rosso e di giallo di minore intensità. Rispetto alle altre varietà, le noccioline della ‘Tonda Gentile Romana’ avevano una tinta meno rossastra ed una minore saturazione del colore. Attraverso un’analisi visiva, i campioni della ‘Tonda Gentile Romana’ hanno presentato una ‘forte’ differenza di colore rispetto alle noccioline della ‘Tonda di Giffoni’. A dimostrazione di ciò, il ΔE^* è risultato 6,93. Inoltre si è verificata una ‘percettibile’ differenza di colore rispetto ai frutti della cultivar ‘Nocchione’ ed ancora una volta il valore del ΔE^* (3,21) ha confermato quanto asserito. Tuttavia, occorre precisare che la Differenza di colore CIE 1976 è stata calcolata a partire dai soli valori medi delle coordinate CIELAB, senza tener conto della variabilità dei dati, rendendo necessaria la valutazione della significatività pratica.

Poiché i test statistici condotti avevano una elevata potenza ($n = 300$), lo studio sperimentale si è avvalso del calcolo del Cohen’s d che, insieme all’area di overlap, ha

evidenziato una significatività pratica soltanto tra le varietà ‘Tonda Gentile Romana’ e ‘Tonda di Giffoni’ per le coordinate L^* ed a^* (Tab.1). Diversamente, la cultivar ‘Nocchione’ non è risultata ben distinguibile dalle altre due. Le ampie aree di overlap per i parametri L^* , h e C^* inducono ad ipotizzare l’esistenza di una elevata difficoltà da parte dell’occhio umano nell’operare una classificazione delle 3 varietà basandosi solo sulla colorazione.

Sebbene per alcuni variabili sia possibile escludere una significatività di tipo pratico, è stata comunque testata la messa a punto di un modello LDA, utilizzando le variabili statisticamente significative. Allo scopo sono state impiegate le coordinate colorimetriche misurabili tramite sensore ottico (L^* , a^* e b^*), escludendo le variabili descrittive del colore dal punto di vista della percezione dell’occhio umano (h e C^*).

La LDA (Fig.1), ottenuta impiegando i soli dati colorimetrici, non è riuscita a discriminare con una soglia di errore accettabile le 3 varietà. L’errore totale è risultato troppo alto per poter giustificare la validità economica di una macchina selezionatrice che operi unicamente tramite acquisizione colorimetrica. L’errore minimo, pari all’8%, è stato ottenuto nella discriminazione delle varietà ‘Tonda di Giffoni’ e ‘Tonda Gentile Romana’. Infatti, il modello statistico ha messo in risalto quanto già osservato mediante le considerazioni di significatività pratica precedentemente esposte: le differenze colorimetriche più evidenti sono riscontrabili tra varietà ‘Tonda Gentile Romana’ e ‘Tonda di Giffoni’. Tuttavia, l’errore in predizione è risultato troppo elevato per poter considerare efficiente l’impiego della funzione discriminante anche per la sola selezione delle due varietà in questione.

Analisi spettroscopiche nel vicino infrarosso

La regione spettrale più ricorrente nei modelli aventi le migliori prestazioni discriminatorie, pari ad un errore minimo del 1%, è stata quella compresa tra i 1.980 nm ed i 2.060 nm, comunemente associata a stretching e bending del gruppo funzionale N-H di amminoacidi e proteine. In aggiunta, in alcuni di tali modelli, la regione spettrale in questione è stata frequentemente affiancata da lunghezze d’onda selezionate tra i 2.120 nm ed i 2.180 nm, associate a vibrazioni dei gruppi funzionali C-H/C=O dei lipidi e N-H/C-N/C=O di proteine ed amminoacidi (Workman e Weyer, 2008).

In altri modelli predittivi sono state selezionate lunghezze d'onda nella regione spettrale 1.150-1.650 nm, la quale rappresenta il primo overtone delle vibrazioni di stretching del gruppo O-H (acqua, acidi grassi liberi e monogliceridi), nonché overtone e combination di stretching e deformation del gruppo -CH (CH_3- , $-\text{CH}_2-$ and cis $\text{R}_1\text{CH}=\text{CHR}_2\text{CH}_3-$) (Yildiz *et al.*, 2001; Christy *et al.*, 2004). Anche lunghezze d'onda della regione attorno ai 1.800 nm, contenenti informazioni riguardo al grado di insaturazioni degli acidi grassi (Bewig *et al.*, 1994), sono state impiegate come variabili nella messa a punto di funzioni discriminanti dalle prestazioni eccellenti.

Al solo scopo di ottimizzare i valori dell'errore minimo di classificazione e della AUC, la migliore combinazione di pre-trattamenti è corrisposta al Test 1. Purtroppo però, tra i pre-trattamenti, l'impiego del Multiplicative Scatter Correction comporterebbe lo sviluppo di una macchina selezionatrice dai costi particolarmente elevati, poiché sarebbe indispensabile acquisire l'intero spettro compreso tra i 1.100-2.100 nm. Tenendo in considerazione tale aspetto, il Test 10 si è dimostrato il più funzionale (Tab.2), in considerazione della economicità di un'eventuale apparecchiatura on-line da utilizzare. La buona funzionalità risiede nel fatto che è stato applicato un filtro Savitzky-Golay a 45 punti di smoothing e sono state impiegate solo 2 lunghezze d'onda, entrambe appartenenti alla regione spettrale caratteristica della composizione amminoacidica e proteica delle nocciole (Workman e Weyer, 2008).

I risultati ottenuti NIR richiedono di essere avvalorati da analisi chimiche che vadano a confermare le potenziali differenze composizionali osservate per mezzo della spettroscopia NIR.

Tabella 1: Valori medi di L* ed a*. La variabilità del dato è riportata come deviazione standard. La differenza statistica è riportata con differenti lettere. La significatività pratica è stata espressa mediante l'indice di Cohen's d e la relativa area di overlap. In grassetto la maggiore differenza tra classi.

Coordinata	Varietà	Media	Dev.st.	Cohen's d			Area di Overlap (%)		
				GIF	NOC	TGR	GIF	NOC	TGR
L	GIF	45,23 c	4,63	-	0,58	1,42	-	75,65	47,88
	NOC	48,25 b	5,72	0,58	-	0,67	75,65	-	72,13
	TGR	51,71 a	4,52	1,42	0,67	-	47,88	72,13	-
	LSD	1.60							
	(P≤0.01)			-	-	-	-	-	-
a*	GIF	15,37 a	1,1	-	0,94	1,72	-	63,69	38,84
	NOC	14,34 b	1,8	0,94	-	0,94	63,69	-	61,58
	TGR	13,11 c	1,5	1,72	0,94	-	38,84	61,58	-
	LSD								
	(P≤0.01)	0,40	-	-	-	-	-	-	-

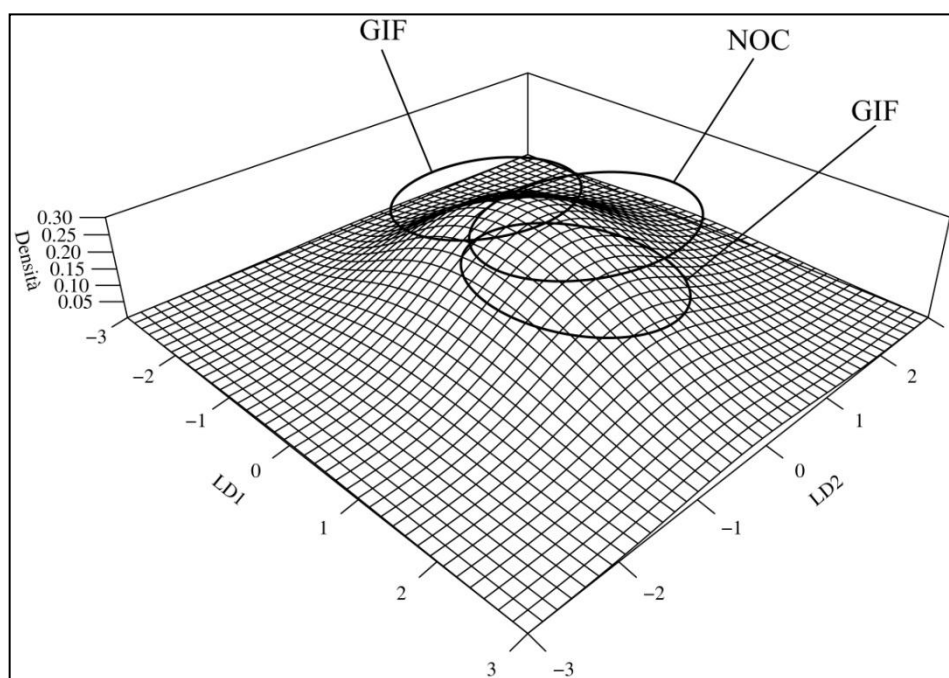


Figura 1: Distribuzione normale cumulativa delle 3 varietà ottenute dai risultati della funzione discriminante LDA. Le circonferenze tratteggiate definiscono l'area descritta dalla deviazione standard di ciascuna gaussiana.

Tabella 2: Migliori risultati dal punto di vista delle prestazioni e dello sviluppo di una macchina selezionatrice, contraddistinti da un errore totale del 1% e un errore di classificazione della ‘Nocciola Romana’ DOP del 2%.

Test #	Set di dati				Lunghezze d'onda (nm)						Errori totali (%)			AUC
	Scatt, C,	Norm,	SG*	Deriv,	1	2	3	4	5	6	GIF	NRM	Totale	
01	MSC	-	45	1a	1136	1822	1848	2026	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
02	-	MC	41	1a	1138	1822	1852	2034	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
03	MSC	-	25	-	2000	2070	-	-	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
04	-	-	41	1a	1138	1822	1852	2034	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
05	rMC	-	41	1a	1138	1822	1852	2034	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
06	rMC	MC	41	1a	1138	1822	1852	2034	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,98%
07	MSC	-	9	-	2004	2062	-	-	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,97%
08	MSC	-	17	-	2010	2064	-	-	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,95%
09	-	MC	45	-	2000	2060	-	-	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,94%
10	-	-	45	-	2000	2060	-	-	-	-	0,00%	2,00%	1,00%	99,94%

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti dalla Linear Discriminant Analysis (LDA) è deducibile come non sia economicamente giustificabile la messa a punto di una macchina selezionatrice che operi utilizzando i soli dati colorimetrici, in quanto l'errore totale di predizione tra le varietà risulta troppo elevato.

Dalla funzione discriminante dei dati NIR a 3 classi (‘Tonda Gentile Romana’, ‘Nocchione’, Tonda di Giffoni) è stato osservato come il ‘Nocchione’ risulti essere quello più erroneamente classificato sia come ‘Tonda Gentile Romana’ che come ‘Tonda di Giffoni’.

Le analisi spettroscopiche e conseguentemente la elaborazione di un modello predittivo a 2 classi (‘Nocciola di Giffoni’ IGP e ‘Nocciola Romana’ DOP), mediante LDA, hanno mostrato come sia possibile effettuare un riconoscimento ed una discriminazione varietale. Tale riconoscimento viene effettuato utilizzando due sole lunghezze d'onda, rendendo pertanto possibile un applicazione on-line, caratterizzata da elevate velocità di computazione.

RINGRAZIAMENTI

La ricerca è stata finanziata dal MIPAAF attraverso il progetto ‘Miglioramento della filiera corilicola laziale’ – Mi.F.CO.L. D.D. 17304 del 14-09-2011 rappresentato da AOP Nocciola Italia Soc. Cons. s.r.l e CeFAS - Azienda speciale CCIAA Viterbo. Si ringraziano inoltre per la collaborazione il dottor Francesco Fabrizi ed il professor Valerio Cristofori.

BIBLIOGRAFIA

- Bellincontro A., Fracas A., Anelli G., Mencarelli F., Di Natale C., Esposito G., 2005. Use of NIR technique to measure the acidity and water content of hazelnuts. Proc. VI Intl. Congress on Hazelnut edito Tous J., Rovira M. e Romero A. Acta Hort. ISHS 686: 499-503.
- Bellincontro A., Mencarelli F., Forniti R., Valentini M., 2009. Use of NIR-AOTF spectroscopy and MRI for quality detection of whole hazelnuts. Proc. VII Intern. Congress on Hazelnut edito Varvaro L. e Franco S. Acta Hort. ISHS 845: 593-597.
- Bewig K.M., Clarke A.D., Roberts C., Unklesbay N., 1994. Discriminant analysis of vegetable oils by near-infrared reflectance spectroscopy. JAOCS, 2 (71), 195-200.
- Christy A.A., Kasemsumran S., Du, Y., Ozaki Y., 2004. The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics. Analytical sciences, 20, 935-940.
- Cohen J., 1992. A power primer. Psychological Bulletin 112, 155-159.
- Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana (GURI), 2009. Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta 'Nocciola Romana' DOP. Serie generale n. 186 del 12-8-2009.
- Massantini R., Contini M., Alfani M.L.M., Guerrieri M., Monarca D., Cecchini M., 2009a. The consumption of fresh hazelnuts: Quality and storage. Acta Hort. 845: 635-640.
- Massantini R., Moscetti R., Monarca D., Cecchini M., Contini M.-M., Alfani L.M., 2009b. The influence of cover crops and double harvest on storage of fresh hazelnuts (*Corylus Avellana* L.). Advances in Horticultural Science 23 (4): 231-237.
- Monarca D., Cecchini M., Guerrieri M., Santi M., Colopardi F., 2009. The evolution of the hazelnut harvesting technique. Acta Hort. 845: 353-358.
- Moscetti R, Haff R P, Aernouts B, Saeys W, Monarca D, Cecchini M, Massantini R, 2013. Feasibility of Vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. J Food Eng 118:1-7.

R Development Core Team, (2013). <http://www.r-project.org>.

Stevens J.P., 2001. Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences, IV Edizione. Routledge Academic.

United States Department of Agriculture (USDA), 2009. National Nutrient Database for Standard Reference - Release 22. URL <http://ndb.nal.usda.gov/>

Valentini N., Zeppa G., Rolle L., 2003. Applicazione della colorimetria, della 'Texture Analysis' e dell'analisi sensoriale nella caratterizzazione delle nocciole italiane. Frutticoltura 10: 54-57.

Workman J. Jr., Weyer L., 2008. Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, 51-69.

Yildiz G., Wehling R.L., Cuppett S.L., 2001. Method for Determining Oxidation of Vegetable Oils by Near-Infrared Spectroscopy. Journal of the American Oil Chemists' Society 5 (78), 495-502.

5.4 Altre pubblicazioni

Stella E., Moscetti R., Monarca D., Cecchini M., Massantini R., 2013. Il trattamento degli ortofrutticoli con radiazioni ionizzanti. *Industrie Alimentari* 532:21-28

Moscetti R., Carletti L., Monarca D., Cecchini M., Stella E., Massantini R., 2013. Effects of alternative postharvest control treatments on Golden Delicious. *JSFA* 93:2691-2697

Cecchini M., Monarca D., Carletti L., Stella E., Massantini R., Moscetti R. Effects of controlled atmosphere and novel antifungal pre-treatments on quality and storability of Golden Delicious apple. *CAMA 2013 (Trani 3-7/06)* *In press*

Carletti L., Botondi R., Moscetti R., Stella E., Monarca D., Cecchini M., Massantini R., 2013. Use of ozone in sanitation and storage of fresh fruit and vegetables. *JFAE* 11(3-4):585-589

Stella E., Moscetti R., Carletti L., Menghini G., Fabrizi F., Cristofori V., Monarca D., Cecchini M., Massantini R. Near-infrared spectroscopy is feasible to discriminate hazelnut cultivars. *JAE* *In press*

Carletti L., Cecchini M., Colantoni A., Colopardi F., Cristofori V., Fabrizi F., Gasbarra S., Manzo A., Massantini R., Menghini G., Monarca D., Moscetti R., Stella E. Identificazione di alcune cultivar viterbesi di nocciolo attraverso la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR). Near infrared spectroscopy (NIR) for different hazelnuts cultivar identification. *Corylus*. *In press*

Monarca D., Moscetti R., Carletti L., Cecchini M., Colantoni A., Stella E., Menghini G., Speranza S., Massantini R., Contini M., Manzo A., 2014. Quality maintenance and storability of chestnuts manually and mechanically harvested. *Acta Horticulturae* 1043:145-152

6 Conclusioni

I risultati ottenuti dalla sperimentazione sulla spettroscopia NIR per indagare la presenza della mosca dell'olivo su drupe destinate alla molitura, affiancati da una ricerca bibliografica approfondita sulle tematiche riguardanti l'industria olearia e questa metodologia non distruttiva, mettono in evidenza l'efficacia di questa tecnica riguardo agli aspetti indagati dalle diverse ricerche scientifiche condotte.

In questo lavoro oltre a studiare la capacità della spettroscopia NIR per lo scopo preposto, si è cercato di rendere affidabili i risultati cercando di ridurre al minimo le lunghezze d'onda necessarie alla discriminazione delle drupe per ridurre i costi di un'eventuale applicazione della tecnica su scala industriale, destinata anche alle piccole realtà produttive del territorio viterbese in cui è stata svolta la ricerca.

I buoni risultati ottenuti promettono quindi di poter continuare la ricerca in questo ambito, applicando questa tecnologia in campo per indagare la presenza della mosca sulle olive prima della raccolta o investigare nel frantoio l'incidenza dei danni da grandine su un'intera partita di olive da molire.

Nonostante vi siano già numerosi studi sull'industria olearia e la spettroscopia NIR, su olive da olio e da tavola, nonché sull'olio di oliva, questa metodologia permette ancora ampi spazi di indagine, legati soprattutto ai vantaggi di questa metodologia rispetto alle analisi tradizionali.

7 Bibliografia

Angerosa F, Servili M, Selvaggini R., Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. Review. J Chromatography A 2004;1054:17-31.

Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M. Determination of edible oil parameters by near infrared spectrometry. Anal. Chim. Acta 2007;596:330-337.

Armenta S, Moros J, Garrigues S, de la Guardia M. The use of near-infrared spectrometry in the olive oil industry, Crit. Rev. Food Sci 2010;50:567-582.

Bellincontro A, Caruso G, Mencarelli F, Gucci R. Oil accumulation in intact olive fruits measured by near infrared spectroscopy-acousto-optically tunable filter. J Sci Food Agric 2013; 93:1259-1265.

Bellincontro A, Fracas A, Anelli G, Mencarelli F, Di Natale C, Esposito G.. Use of NIR technique to measure the acidity and water content of hazelnuts. Proc. VI Intl. Congress on Hazelnut, 2005. Ed. Tous J, Rovira M, Romero A. Acta Hort. ISHS 686:499-503.

Bellincontro A, Taticchi A, Servili M, Esposto S, Farinelli D, Mencarelli F. Feasible application of a portable NIR-AOTF tool for on-field prediction of phenolic compounds during the ripening of olives for oil production. J. Agric. Food Chem. 2012;60:2665–2673.

Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. Molecules 2007;12:1679-1719.

Bendini A, Cerretani L, Di Virgilio F, Belloni P, Lerker G, Toschi TG. In-process monitoring in industrial olive mill by means of FT-NIR. Eur J Lipid Sci Tech 2007;109-498-504.

Benelli G. Aggressive behavior and territoriality in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae): role of residence and time of day. J Insect Behav 2014;27(2):145-161.

Bevilacqua M, Bucci R, Magrì AD, Magrì AL, Marini F. Tracing the origin of extra virgin olive oils by infrared spectroscopy and chemometrics: a case study. Anal. Chim. Acta 2012;717:39-51.

Bewig KM, Clarke AD, Roberts C, Unklesbay N. Discriminant analysis of vegetable oils by near-infrared reflectance spectroscopy. JAOCS 1994;2(71):195-200.

Boysworth MK, Booksh KS. Aspects of Multivariate Calibration Applied to Near-Infrared Spectroscopy, In: Burn, D. A., & Ciurczak, W. E. (Eds.), Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd ed.) CRC Press; 2008; 207-229.

Burks C, Dowell F, Xie F. Measuring fig quality using near-infrared spectroscopy. J. Stored Prod. Res. 2000;36:289-296.

Burn DA, Ciurczak WE. Handbook of Near-Infrared Analysis (3rd ed.), CRC Press, London. 2008

Butz P, Hofmann C, Tauscher B. Recent developments in noninvasive techniques for fresh fruit and vegetable internal quality analysis. J. Food Sci. 2005;70:131-141.

Casale M, Casolino C, Ferrari G, Forina M. Near infrared spectroscopy and class modelling techniques for the geographical authentication of Ligurian extra virgin olive oil. J. Near Infrared Spectrosc. 2008;16:39-47.

Casale M, Casolino C, Oliveri P, Forina M. The potential of coupling information using three analytical techniques for identifying the geographical origin of Liguria extra virgin olive oil. Food Chem. 2010;118:163-170.

Casale M, Oliveri P, Casolino C, Sinelli N, Armanino C, Forina M, Lanteri S. Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques, Anal. Chim. Acta 2012;712:56-63.

Casale M, Simonetti R. Review: near infrared spectroscopy for analysing olive oils. J. Near Infrared Spectrosc. 2014; 22:59-80

Casale M, Sinelli N, Oliveri P, Di Egidio V, Lanteri S. Chemometrical strategies for feature selection and data compression applied to NIR and MIR spectra of extra virgin olive oils for cultivar identification. Talanta 2010;80:1832-1837.

Casale M, Zunin P, Cosulich ME, Pistarino E, Perego P, Lanteri S. Characterisation of table olive cultivar by NIR spectroscopy. Food Chem 2010;122:1261-1265.

Cayuela JA, Camino MP. Prediction of quality of intact olives by near infrared spectroscopy. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010;112:1209-1217.

Cayuela JA, García JM, Caliani N. NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. Grasas Aceites 2009;60(2):194-202.

Cayuela Sánchez JA, Moreda W, García JM. Rapid determination of olive oil oxidative stability and its major quality parameters using Vis/NIR transmittance spectroscopy. J. Agric. Food Chem. 2013;61:8056-8062.

Cayuela, JA, Weiland C. Intact orange quality prediction with two portable NIR spectrometers. Postharvest Biol. Technol. 2010;58, 113-120.

Cecchi L, Migliorini M, Cherubini C, Giusti M, Zanoni B, Innocenti M, Mulinacci N. Phenolic profiles, oil amount and sugar content during olive ripening of three typical Tuscan cultivars to detect the best harvesting time for oil production. *Food Res Int* 2013;54(2):1876-1884.

Cen H, He Y. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends Food Sci. Technol.* 2007;18:72-83.

Cerdeita JO, Silva PD, Cardima J, Mihoto M. 2013. Package 'Subselect' 0.12–3 for use with R. Selecting variable subsets, <http://cran.r-project.org/web/packages/subselect/> (accessed 04.28.14).

Christy AA, Kasemsumran S, Du Y, Ozaki Y. The detection and quantification of adulteration in olive oil by near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Anal Sci* 2004;20:935-940.

Coen T, Saeys W, Ramon H., De Baerdemarker J. Optimizing the tuning parameters of least squares support vector machines regression for NIR spectra, *J Chemometr.* 2006;20(5):184-192.

Conde C, Delrot S, Gerós H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J Plant Phys* 2008;165:1545-1562.

CRAN, 2014. Comprehensive R Archive Network. CRAN, [_http://cran.r-project.org/_](http://cran.r-project.org/) (accessed 04.28.14).

Daane KM, Johnson MW. Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annu. Rev. Entomol.* 2010;55:151–169.

Devos O, Downey G, Duponchel L. Simultaneous data pre-processing and SVM classification model selection based on a parallel genetic algorithm applied to spectroscopic data of olive oils, *Food Chem.* 2014;148:124-130.

Dupuy N, Galtier O, Le Dréau Y, Pinatel C, Kister J, Artaud J. Chemometric analysis of combined NIR and MIR spectra to characterize French olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010;112,463-475.

Dupuy N, Galtier O, Ollivier D, Vanloot P, Artaud J. Comparison between NIR, MIR, concatenated NIR and MIR analysis and hierarchical PLS model. Application to virgin olive oil analysis, *Anal. Chim. Acta* 2010;666:23-31.

Fisher RA. The goodness of fit regression formulae and the distribution of regression coefficients, *J. R. Statist. Soc.* 1922;85:587-612.

Fregapane G, Salvador MD. Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Res Int* 2013;54(2):1907-1914.

Galtier O, Abbas O, Le Dréau Y, Rebufa C, Kister J, Artaud J, Dupuy N. Comparison of PLS1-DA, PLS2-DA and SIMCA for classification by origin of crude petroleum oils by MIR and virgin olive oils by NIR for different spectral regions, *Vib. Spectrosc.* 2011;55:132-140.

Galtier O, Dupuy N, Le Dréau Y, Ollivier D, Pinatel C, Kister J, Artaud J. Geographic origins and compositions of virgin olive oils determined by chemometric analysis of NIR spectra, *Anal. Chim. Acta* 2007;595:136-144.

Gazzetta Ufficiale Della Repubblica Italiana (GURI), 2009. Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta 'Nocciola Romana' DOP. Serie generale n. 186 del 12-8-2009.

Ghaedian A, Wehling RL. Discrimination of sound and granary-weevil-larva-infested wheat kernels by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *J. AOAC Int.* 1997;80:1997-1005.

Gómez-Caravaca AM, Cerretani L, Bendini A, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Del Carlo M, Compagnone D, Cichelli A. Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 2008;56:4577-4583.

Gracia A, León L. Non-destructive assessment of olive fruit ripening by portable near infrared spectroscopy. *Grasas Aceites* 2011;62(3):268-274.

Gucci R, Caruso G, Canale A, Loni A, Urbani S, Taticchi A, Esposto S, Servili M. Qualitative changes of olive oils obtained from fruits damaged by *Bactrocera oleae* (Rossi). *Hortic Sci* 2012;47(2):301-306.

Guzmán E, Baeten V, Pierna J, García-Mesa J. Infrared machine vision system for the automatic detection of olive fruit quality. *Talanta* 2013;116:894-898.

Guzmán E, Baeten V, Pierna J, García-Mesa JA. A portable Raman sensor for the rapid discrimination of olives according to fruit quality. *Talanta* 2012;93:94-98.

Haff RP, Saranwong S, Thanapase W, Janhira A, Kasemsumran S, Kawano S. Automatic image analysis and spot classification for detection of fruit fly infestation in hyperspectral images of mangoes. *Postharvest Biol. Technol.* 2013;86:23-28.

Inarejos-García AM, Gómez-Alonso S, Fregapane G, Salvador MD. Evaluation of minor components, sensory characteristics and quality of virgin olive oil by near infrared (NIR) spectroscopy. *Food Res. Int.* 2013;50:250-258.

Istat, 2011. Disponibile: <http://www.istat.it/> (ultimo access 25/02/2015)

Jiménez-Jiménez F, Castro-García S, Blanco-Roldán G, Agüera-Vega J, Gil-Ribes J. Non-destructive determination of impact bruising on table olives using Vis-NIR spectroscopy. *Biosystems engineering* 2012;113:371-378.

Jiménez-Jiménez F, Castro-García S, Blanco-Roldán G, Ferguson L, Rosa U, Gil-Ribes J. Table olive cultivar susceptibility to impact bruising. *Postharvest Biol Technol* 2013;86:100-106.

Jolliffe IT. *Principal Component Analysis*. Springer, New York, NY; 2002.

Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem* 2007;100:273-286.

Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995;61:1368-1373.

Kavdir I, Buyukcan MB, Lu R, Kocabiyik H, Seker M. Prediction of olive quality using FT-NIR spectroscopy in reflectance and transmittance modes. *Biosyst Eng* 2009;103:304-312.

Koprivnjak O, Dminić I, Kosić U, Majetić V, Godena S, Valenčič V. Dynamics of oil quality parameters changes related to olive fruit fly attack. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2010;112:1033-1040.

Kyriakidis NB, Dourou E. Effect of storage and dacus infection of olive fruits on the quality of the produced virgin olive oil. *J Food Lipids* 2002;9:47-55.

Laroussi S, Vanloot P, Molinet J, Kamoun N, Hammami H, Dupuy N, Artaud J. Varietal origin determination of six Tunisian olive oils by chemometric analysis of NIR spectra. *Proceeding of NIR 2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy*, 2013 Giugno 2-7, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment, 30-34.

Latala A, Morawski RZ. Comparison of LS-TYPE methods for determination of olive oil mixtures on the basis of NIR spectral data, *Metrology Meas. Sys.* 2008;15:409-420.

León-Moreno L. Usefulness of portable near infrared spectroscopy in olive breeding programs. *Spanish J Agric Res* 2012;10(1):141-148.

Lin P, Chen Y, He Y. Identification of geographical origin of olive oil using visible and near-infrared spectroscopy technique combined with chemometrics, *Food Bioprocess Technol.* 2012;5:235-242.

Luo X, Takahashi T, Kyo K, Zhang S. Wavelength selection in vis/NIR spectra for detection of bruises on apples by ROC analysis. *Journal of Food Engineering* 2012;109:457-466

Maggio RM, Valli E, Bendini A, Gómez-Caravaca AM, Toschi TG, Cerretani L. A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chem.* 2011;127:216-221

Massantini R, Carlini P, Anelli G. Spettroscopia NIR nella valutazione qualitativa degli ortofrutticoli in post-raccolta. *Ind Aliment Italy* 1997;34:321-326.

Massantini R, Moschetti R, Monarca D, Cecchini M, Contini M, M Alfani LM. The influence of cover crops and double harvest on storage of fresh hazelnuts (*Corylus Avellana* L.). *Adv. Hortic Sci* 2009;23(4):231-237.

Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, Kaufman L. Chemometrics: a textbook. In: *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier Science Publishers B.V., The Netherlands; 1998 pp. 339-355(373-378).

Menesatti P. Innovazioni biofotoniche in agricoltura: analisi iperspettrale della forma per immagini. Tesi di dottorato di ricerca in meccanica agraria XXIII ciclo, Università degli studi della Tuscia; 2010.

Miękina A, Morawski RZ. A calibration method, based on piecewise ridge LS estimator designed for determination of olive oil mixtures on the basis of NIR spectral data. XIX IMEKO World Congress 'Fundamental and Applied Metrology', 2009 September 6–11, Lisbon, Portugal, pp. 2559-2563.

Mignani AG, Ciaccheri L, Cucci C, Mencaglia AA, Cimato A, Attilio C, Thienpont H, Ottevaere H, Paolesse R, Mastroianni M, Monti D, Buonocore G, Del Nobile A, Mentana A, Dall'Asta C, Faccini A, Galaverna G, Dossena A. Eat-by-light: fiber -optic and micro-optic devices for food safety and quality assessment, *Proc. SPIE Third European Workshop on Optical Fibre Sensors*, 66190H, 2008, pp.1342-1348.

Mignani AG, Ciaccheri L, Mencaglia AA, Cimato A, Optical absorption spectroscopy for quality assessment of extra virgin olive oil, In: B. Dimitrios (Ed.), *Olive oil - constituents, quality, health properties and bioconversions*, InTech; 2012 pp.56-63.

Mignani AG, Ciaccheri L, Ottevaere H, Thienpont H, Conte L, Marega M, Cichelli A, Attilio C, Cimato A, Visible and near-infrared spectral signatures for adulteration assessment of extra virgin olive oil, *Proc. SPIE Optical Sensing and Detection*, 2010. Ed. F. Berghmans, A.G. Mignani, C.A. Van Hoof , 7726, 77262C1-77262C5.

Mignani AG, Ciaccheri L, Ottevaere H, Thienpont H, Conte L, Marega M, Cichelli A, Attilio C, Cimato A. Visible and near-infrared absorption spectroscopy by an integrating sphere and optical fibers for quantifying and discriminating the adulteration of extra virgin olive oil from Tuscany. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011;399:1315-1324.

Mignani AG, Ciaccheri L, Thienpont H, Ottevaere H, Attilio C, Cimato A. Toward a hyperspectral optical signature of extra virgin olive oil, *Proc. SPIE Optical Sensor*, 2007. Ed. F.Baldini, J.Homola, R.A. Lieberman, M. Miler, 6585, 65852C1-65852C6.

Mignani AG, García-Allende PB, Ciaccheri L, Conde OM, Cimato A, Attilio C, Tura D. Comparative analysis of quality parameters of Italian extra virgin olive oils

according to their region of origin, *Proc. SPIE: Optical Sensors*, 2008. 7003, 700326-1/6.

Monarca D, Cecchini M, Guerrieri M, Santi M, Colopardi F. The evolution of the hazelnut harvesting technique. *Acta Hort.* 2009;845:353-358.

Morales-Sillero A, Fernández-Cabanás V, Casanova L, Jiménez M, Suárez M, Rallo P. Feasibility of NIR spectroscopy for non-destructive characterization of table olive traits. *J Food Eng* 2011;107:99-106.

Moros J, Garrigues S, de la Guardia M. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. *Trends Anal Chem.* 2010;29(7):578-590.

Moscetti R, Haff RP, Stella E, Contini M, Monarca D, Cecchini M, Massantini R. Feasibility of NIR spectroscopy to detect olive fruit infested by *Bactrocera oleae*. *Postharvest Biol. Technol* 2015;99:58-62.

Moscetti R, Haff RP, Saranwong S, Monarca D, Cecchini M, Massantini R. Nondestructive detection of insect infested chestnuts based on NIR spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 2014a;87:88-94.

Moscetti R, Monarca D, Cecchini M, Haff RP, Contini M, Massantini R. Detection of mold-damaged chestnuts by near-infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* 2014b;93:83-90.

Moscetti R, Haff RP, Aernouts B, Saeys W, Monarca D, Cecchini M, Massantini R. Feasibility of vis/NIR spectroscopy for detection of flaws in hazelnut kernels. *J. Food Eng* 2013;118:1-7.

Mossoba MM, Azizian H, Tyburczy C, Kramer JK. G., Delmonte P, Fardin KA, Rader JI. Rapid FT-NIR analysis of edible oils for total SFA, MUFA, PUFA, and trans FA with comparison to GC, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2013; 90:757-770.

Mraicha F, Ksantini M, Zouch O, Ayadi M, Sayadi S, Bouaziz M. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food Chem Toxicology* 2010;48:3235–3241.

Naes T, Isaksson T, Fearn T, Davies T. *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications, Chichester, UK; 2004.

Nicolaï BM, Beullens K, Bobelyn E, Peirs A, Saeys W, Theron KI, Lammertyn J. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biol. Technol.* 2007;46:99-118.

Oliveri P, Casale M, Casolino C, Baldo MA, Nizzi Grifi F, Forina M. Comparison between classical and innovative class-modelling techniques for the characterisation of a PDO olive oil. *Anal. Bioanal Chem.* 2011;399:2105-2113.

Oliveri P, Casolino MC, Casale M, Medini L, Mare F, Lanteri S. A spectral transfer procedure for application of a single class-model to spectra recorded by different near-infrared spectrometers for authentication of olives in brine. *Anal Chim Acta* 2013;761:46-52.

Oliveri P, Di Egidio V, Woodcock T, Downey G. Application of class-modelling techniques to near infrared data for food authentication purposes. *Food Chem.* 2011;125:1450-1456.

Opara UL, Pathare PB. Bruise damage measurement and analysis of fresh horticultural produce. A review. *Postharvest Biol Technol* 2014;91:9-24.

Ozaki Y, Morita S, Du Y. Near infrared spectroscopy in food science and technology. Ed Wiley T& sons, Inc. Hobeden 2007.

Özdemir D, Öztürk B. Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil, *J. Food Drug Anal* 2007;15: 40-47.

Öztürk B, Yalçın A, Özdemir D. Determination of olive oil adulteration with vegetable oils by near infrared spectroscopy coupled with multivariate calibration. *J Near Infrared Spectrosc.* 2010;18:191-201.

Pasquini C. Near infrared spectroscopy: fundamentals, practical aspects and analytical applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 2003;14:198-219.

Pereira JA, Alves MR, Casal S, Oliveira MBPP. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal Transmontana. *Ital. J. Food Sci.* 2004;3(16):355-365.

Peshlov B, Dowell F, Drummond F, Donahue D. 2009. Comparison of three near infrared spectrophotometers for infestation detection in wild blueberries using multivariate calibration models. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2009;17(4)203-212.

Plard J., Rébua C., Le Dréau Y., Dupuy N., NIR PLS prediction of quality parameters of olive oils at different stages of ageing, *Proceeding of 'NIR2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy'*, 2013 Giugno 2-7, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment, 109-113.

R Development Core Team, (2013). <http://www.r-project.org>.

Rajendran S. Detection of insect infestation in stored foods. *Adv. Food Nutr. Res.* 2005;49:163-232.

Rasco BA, Miller CE, King TL. Utilization of NIR spectroscopy to estimate the proximate composition of trout muscle with minimal sample pretreatment. *J. Agric. Food Chem.* 1991;39:67-72.

Rice R. Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. *Univ. Calif. Plant Prot. Q.*, 10. Univ. Calif., California, 2000 pp. 1-5.

Riquelme MT, Barreiro P, Ruiz-Altisent M, Valero C. Olive classification according to external damage using image analysis. *J Food Eng* 2008;87:371-379.

Rizzo R, Caleca V, Lombardo A. Relation of fruit color, elongation, hardness, and volume to the infestation of olive cultivars by the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Entomol Exp Appl* 2012;145:15-22.

Ronco AL, De Atéfani E. Squalene: a multi-task link in the crossroads of cancer and aging, *Funct. Food Health Disease* 2013;31:462-476.

Ruiz-Altisent M, Ruiz-Garcia L, Moreda GP, Lu R, Hernandez-Sanchez N, Correa EC, Diezma B, Nicolai B, Garcia-Ramos J. Sensors for product characterization and quality of specialty crops-A review. *Comput Electronics Agric.* 2010;74:176-194.

Salguero-Chaparro L, Baeten V, Fernández-Pierna J, Peña-Rodríguez F. Near infrared spectroscopy (NIRS) for on-line determination of quality parameters in intact olives. *Food Chem* 2013a;139:1121-1126.

Salguero-Chaparro L, Gaitán-Jurado A, Ortiz-Somovilla V, Peña-Rodríguez F. Feasibility of using NIR spectroscopy to detect herbicide residues in intact olives. *Food Control* 2013b;30:504-509.

Salguero-Chaparro L, Peña-Rodríguez F. On-line versus off-line NIRS analysis of intact olives. *Food Sci Technol* 2014;56:363-369.

Savitzky, A., Golay, M.J.E., 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* 36, 1627–1639.

Segovia-Bravo K.A., Jarén-Galán M., García-García P., Garrido-Fernández A. Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts. *Food Chem* 2010;123:741–746.

Segovia-Bravo KA, Jaren-Galan M, García-García P, Garrido-Fernández A. Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved. *Food Chem* 2009;114:1380-1385.

Segovia-Bravo KA, Jarén-Galán M, García-García P, Garrido-Fernández A. Treatments to inhibit the browning reactions in model solutions of olive fruit extracts. *Food Chem* 2010;123:741-746.

Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and sensory activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 2009;17:1-9.

Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro GF, Morozzi G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A.* 2004;1054:113-127.

- Sinelli N, Cerretani L, Di Egidio V, Bendini A, Casiraghi E. Application of near (NIR) infrared and mid (MIR) infrared spectroscopy as a rapid tool to classify extra virgin olive oil on the basis of fruity attribute intensity. *Food Res. Int.* 2010a;43:369-375.
- Sinelli N, Casale M, Di Egidio V, Oliveri P, Bassi D, Tura D, Casiraghi E. Varietal discrimination of extra virgin olive oils by near and mid infrared spectroscopy. *Food Res. Int.* 2010b;43:2126-2131.
- Sinelli N, Casiraghi E, Tura D, Downey G. Characterisation and classification of Italian virgin olive oils by near- and mid-infrared spectroscopy. *J. Near Infrared Spectrosc.* 2008;16:335-342.
- Sirisomboon P, Hashimoto Y, Tanaka M. Study on non-destructive evaluation methods for defect pods for green soybean processing by near-infrareds pectroscopy. *J. Food Eng.* 2009;93:502-512.
- Stevens JP. *Applied Multivariate Statistics for the Social Sciences*, IV Edizione. Routledge Academic, 2001.
- Tallada JG, Wicklow DT, Pearson TC, Armstrong PR. Detection of fungus infected corn kernels using near infrared reflectance spectroscopy and color imaging. *Trans. ASABE* 54, 2011, 1151–1158.
- Tamendjari A, Angerosa F, Mettouchi S, Bellal MM.,. The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas Aceites*, 2009;60(5):507-513.
- Tamendjari A, Angerosa F, Bellal MM. Influence of *bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of Chemlal olives. *Ital. J. Food Sci* 2004;3(16):343-354.
- Teixeira CA, Lopo M, Páscoa R. N.M.J.,. Lopes J.A. A review on the applications of portable near-infrared spectrometers in the agro-food industry. *Applied Spectrosc.* 2013;67(11):1215-1233.
- Tigabu M, Odén PC, Shen TY. Application of near-infrared spectroscopy for the detection of internal insect infestation in *Picea abies* seed lots. *Can. J. For.Res.* 2004; 34:76-84.
- Tigabu M, Odén PC. Simultaneous detection of filled, empty and insect-infested seeds of three *Larix* species with single seed near-infrared transmittance spectroscopy. *New For.* 2004;27:39-53.
- Tigabu M, Odén, P. Multivariate classification of sound and insect-infested seeds of a tropical multipurpose tree, *Cordia africana*, with near infrared reflectance spectroscopy. *Near Infrared Spectrosc.* 2002;10(1),45-51.

Topuz H, Durmusoglu E. The effect of early harvest on infestation rate of *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae) as well as yield, acidity and fatty acid composition of olive oil. J Plant Dis Prot, 2008;115(4):186-191.

Tsuchikawa S. Sampling techniques. In: Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A.A. Ed. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. John Wiley& Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2007 pp. 133-144.

Tura D, Gigliotti C, Pedò S, Failla O, Bassi D, Seraio A, Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea* L.) and correlations with oxidative stability, Sci. Hortic. 2007;112:108-119.

United States Department of Agriculture (USDA), 2009. National Nutrient Database for Standard Reference - Release 22. URL <http://ndb.nal.usda.gov/>.

USDA, 2014. National Nutrient Database for Standard Reference—Release 26. USDA, http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list_ (accessed 03.12.14).

Valentini N, Zeppa G, Rolle L. Applicazione della colorimetria, della ‘Texture Analysis’ e dell’analisi sensoriale nella caratterizzazione delle nocciole italiane. Frutticoltura 2003;10:54-57.

Wang J, Nakano K, Ohashi S, Takizawa K, He JG. Comparison of different modes of visible and near-infrared spectroscopy for detecting internal insect infestation in jujubes. J. Food Eng. 2010;101:78–84.

Wang J, Nakano K, Ohashi S. Nondestructive detection of internal insect infestation in jujubes using visible and near-infrared spectroscopy. Postharvest Biol. Technol. 2011;59:272–279.

Watiez M, Truant D, Verhille M, Reau AL, Mougnot F, Breton S, Cinier R, Oliger P, Huertas A, From seeds to oil, the use of FT-NIRS for edible oil manufacturing, Proceeding of ‘NIR2013- 16th International Conference on Near Infrared Spectroscopy’, 2013 Giugno 2-7, La Grande-Motte, Francia. A1-Agriculture and Environment, 122-127.

Weng XX, Lu F, Wang CX, Qi YP. Discriminating and quantifying potential adulteration in virgin olive oil by near infrared spectroscopy with BP-ANN and PLS, Guang Pu Xue Guang Pu Fen Xi 2009;29:3283-3287.

Wilkin DR, Cowe IA, Thind BB, McNicol JW, Cuthbertson DC. The detection and measurement of mite infestation in animal feed using near infra-redreflectance. J. Agric. Sci. 1986;107:439-448.

Wójcicki K, Khmelinskii I, Sikorski M, Caponio F, Paradiso VM, Summo C, Pasqualone A, Sikorska E. Spectroscopic techniques and chemometrics in analysis of

blends of extra virgin with refined and mild deodorized olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2015;117(1):92-102.

Woodcock T, Downey G, O'Donnell C. Confirmation of declared provenance of European extra virgin olive oil samples by NIR Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 2008;56: 1520-1525.

Workman J Jr, Weyer L, 2008. *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*. CRC Press, 2008 pp.51-69.

Wu W, Mallet Y, Walczak B. Comparison of regularized discriminant analysis linear discriminant analysis and quadratic discriminant analysis applied to NIR data. *Anal. Chim. Acta* 1996;2670:257–265.

Xiaobo Z, Jiewen Z, Povey M.J.W., Holmes M, Hanpin M. Variables selection methods in near-infrared spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2010;667:14-32.

Xing J, Guyer D, Ariana D, Lu R. Determining optimal wavebands using genetic algorithm for detection of internal insect infestation in tart cherry. *Sens. Instrum. Food Qual. Saf.* 2008;2:161-167.

Xing J, Guyer D. Comparison of transmittance and reflectance to detect insect infestation in Montmorency tart cherry. *Comput. Electron. Agric.* 2008;64:194–201.

Yildiz G, Wehling RL, Cuppett SL. Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 2001;5(78):495-502.

Yorulmaz A, Erinc H, Tekin A. Changes in olive and olive oil characteristics during maturation. *J Am Oil Chem Soc* 2013;90:647-658.

Ringraziamenti

Un sincero ringraziamento al Prof. Riccardo Massantini per la fiducia e il supporto continuo durante lo svolgimento del dottorato. Ringrazio anche il Prof. Danilo Monarca e il Prof. Massimo Cecchini per la loro costante collaborazione.

Un sentito grazie lo devo a Roberto Moschetti, sempre disponibile e molto preparato, e a Letizia Carletti, da subito amica e collega d'appetito!

E alla mia famiglia...