



## **NIR ITALIA 2016**

**7° Simposio italiano di Spettroscopia NIR**  
Milano, 12 – 14 Ottobre 2016

## **ATTI DEL SIMPOSIO**

ISBN 9788894115314

**NIR ITALIA 2016**

**7° Simposio italiano di Spettroscopia NIR**

*Light for life*

**Atti del simposio**

*Milano, 12 – 14 Ottobre 2016*

Editore: Società Italiana di Spettroscopia NIR

Copyright:

Società Italiana di Spettroscopia NIR

## Partner



## Soci sostenitori



## Sponsor



**COMITATO SCIENTIFICO -----**

ALAMPRESE C., Università degli Studi di Milano  
BARZAGHI S., CREA-FLC  
BERZAGHI P., Università degli Studi di Padova  
CASALE M., SISNIR, Università degli Studi di Genova  
CASIRAGHI E., SISNIR, Università degli Studi di Milano  
CATTANEO T., SISNIR, CREA-IAA  
COCCHI M., SISNIR, Università di Modena e Reggio Emilia  
MARINI F., SISNIR, Università La Sapienza  
TAMBURINI E., T&ATech Università di Ferrara  
TARONI P., Politecnico di Milano

**COMITATO ORGANIZZATIVO -----**

**Università degli Studi di Milano, Milano**

ALAMPRESE Cristina  
CASIRAGHI Ernestina  
GRASSI Silvia  
MALEGORI Cristina

**CREA – Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria**

BARZAGHI Stefania (Lodi)  
CATTANEO Tiziana (Milano)  
CREMONESI Katia (Lodi)  
GIANGIACOMO Roberto

## NIR ITALIA 2016 – LIGHT FOR LIFE

La Settima Edizione del Simposio Nazionale di Spettroscopia nel Vicino Infrarosso viene realizzata quest'anno in Milano: una delle città italiane più attive, anche scientificamente, a livello europeo e mondiale.

Una splendida cornice all'evento ci viene offerta dalla possibilità di aggregare la comunità scientifica NIR in pieno centro, all'interno di uno dei Palazzi storici della città, grazie all'ospitalità dell'Università degli Studi di Milano presso la Sala Napoleonica di Palazzo Greppi.

La validità della ricerca italiana in questo settore è ormai riconosciuta nel contesto internazionale e provata da diversi premi ricevuti, in particolare da giovani ricercatori, per i lavori presentati e le pubblicazioni scientifiche prodotte su riviste *peer reviewed*.

Come nelle precedenti edizioni, lo scopo di questo Simposio è quello di favorire il confronto e lo scambio di idee a livello nazionale sullo stato della ricerca e delle applicazioni della spettroscopia NIR nei diversi settori. Il Simposio spazia da temi di interesse generale ad applicazioni specifiche con contributi scientifici che toccano tutte le novità del settore presenti in Italia, inserendole in un contesto più ampio, grazie alla presenza di ospiti internazionali. Le due giornate di Simposio affrontano temi relativi all'agro-alimentare, al monitoraggio di processo, alle recenti metodologie chemiometriche, alla strumentazione portatile e all'imaging.

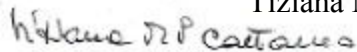
Accogliamo, con un atteggiamento di riconoscenza e stima, tutti coloro che contribuiranno ad incrementare lo scambio di informazioni ed i contatti nella sede di Milano.

Un ringraziamento particolare agli ospiti stranieri di questa edizione: il Prof. Tom Fearn, President elect del Comitato Internazionale NIR (ICNIRS) ed il Prof. Søren Balling Engelsen, organizzatore della prossima conferenza internazionale che si svolgerà a Copenhagen dal 11 al 15 giugno 2017.

Un grazie particolare alle aziende che sostengono da sempre l'Associazione e a tutti gli sponsor ed espositori presenti in questa edizione che hanno scelto di sostenere l'iniziativa e d'intervenire con il loro significativo contributo tecnico-scientifico.

Auguro infine a tutti gli intervenuti di poter tornare arricchiti da questa esperienza ed affrontare le nuove sfide con una marcia in più.

Tiziana M.P. Cattaneo



(Presidente SISNIR – Direttore inc. CREA-IAA, Milano)

## INDICE DELLE COMUNICAZIONI

NIRS: NEW TRENDS AND CHALLENGES T. Fearn .....	10
LA TECNICA NIR APPLICATA AL CONTROLLO QUALITÀ PER LA PRODUZIONE DI PASTA DI SEMOLA, PASTA ALL’UOVO E. Tamburini, M. Battaglia, L. Suma, M. G. Marchetti.....	11
ANALISI NIRS NELLA SELEZIONE VARIETALE DEL GRANO DURO M. Paolini.....	17
SPERIMENTAZIONE DI UN SISTEMA NIR PER LA VALUTAZIONE DELLO STATO SANITARIO DI UVA AL CONFERIMENTO IN CANTINA V. Giovenzana, R. Beghi, L. Brancadoro, R. Guidetti.....	23
MONITORAGGIO IN TEMPO REALE DEL GRADO DI TOSTATURA DEL CAFFÈ MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR E. Bertone, A. Giraud, F. Savorani, F. Geobaldo .....	29
SPETTROSCOPIA NIR: UNA TECNICA VERSATILE PER RISOLVERE PROBLEMI DIVERSI M. Casale, P. Oliveri, M.C. Casolino, M.C. Cavallero, D. Toselli, N. Sitta, M. Zotti .....	30
POTENZIALITÀ DELLA SPETTROSCOPIA NIR DI DISCRIMINARE TRA DIVERSI SISTEMI PRODUTTIVI E DI PREDIRE LA QUALITÀ ALLA RACCOLTA: CASO STUDIO SU FRAGOLE M.L. Amodio, F.Ceglie, M. A Chaudhry, F. Piazzolla, G. Colelli.....	34
USO DELLA SPETTROSCOPIA DI RIFLETTANZA RISOLTA NEL TEMPO PER DISTINGUERE MELE CON DIVERSA <i>TEXTURE</i> A. Rizzolo, M. Vanoli, F. Lovati, M. Grassi, M. Buccheri, N. Sadar, A. Torricelli, A. Zanella, L. Spinelli .....	35
NIRS – A UNIQUE WINDOW OF OPPORTUNITIES FOR THE FOOD INDUSTRY S.B. Engelsen .....	41
MONITORAGGIO DI PROCESSO NELLA PRODUZIONE DI POLIMERI: FUSIONE DI DATI SPETTROSCOPICI NIR E VARIABILI DI PROCESSO L. Strani, E. Mantovani, F. Bonacini, F. Marini, M. Cocchi .....	42
CONFRONTO TRA TECNOLOGIA UV-VIS E NIR PER LA DETERMINAZIONE IN CONTINUO DEI TEMPI DI RESIDENZA IN ESTRUSORE A. Corradini, F. Bonacini, E. Mantovani .....	43
SPETTROSCOPIA NIR PER IL MONITORAGGIO DEI PROCESSI ALIMENTARI C. Alamprese, S. Grassi, E. Casiraghi .....	44

APPROCCI CHEMIOMETRICI AVANZATI PER L'AUTENTICAZIONE DI ALIMENTI E FARMACI ATTRAVERSO LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO F Marini.....	45
METODI CHEMIOMETRICI PER L'ASSOCIAZIONE FRA PREFERENZE DEI CONSUMATORI E NIR FINGERPRINT DI CAMPIONI DI BIRRA N. Cavallini, H. da Silva Friis, R. Bro, M. Cocchi .....	49
SVILUPPO E CONFRONTO DI TECNICHE DI CALIBRAZIONE LOCAL SU SPETTRI NIR DI FORAGGI UTILIZZANDO MODELLI BAYESIANI E PLS IMPLEMENTATI NEL SOFTWARE GRATUITO R A. Ferragina, F. Benozzo, P. Berzaghi.....	50
DAI PORTATILI AI DRONI: APPLICAZIONI DELL'INFRAROSSO VICINO IN AGRICOLTURA P. Berzaghi.....	56
SPERIMENTAZIONE DI UN SISTEMA OTTICO SEMPLIFICATO PER LA VALUTAZIONE RAPIDA DELLA MATURAZIONE DI UVA BIANCA DA VINO R. Beghi, V. Giovenzana, R. Civelli, R. Oberti, R. Guidetti .....	57
SPETTROSCOPIA NIR PER LA VALUTAZIONE E IL MONITORAGGIO DELL' INVECCHIAMENTO NATURALE DEL LEGNO A. Sandak, J. Sandak, A.s Dimitriou, I. Burud .....	63
UTILIZZO DEL MICRO-NIR PER LA VALUTAZIONE DELLA MATURAZIONE DELL'ACEROLA C. Malegori,E.J.N. Marques E.J.N., M.F. Pimentel , S.T. de Freitas, F. de França Souza, C. Pasquini, E. Casiraghi .....	64
CARATTERIZZAZIONE DI CAMPIONI DI CAFFÈ VERDE MEDIANTE IMAGING IPERSPETTRALE E TECNICHE DI DATA REDUCTION R. Calvini, G. Orlandi, G. Foca, A. Ulrici .....	65
MAPPATURA DELLA VITAMINA C IN IMMAGINI HS-NIR DI ACEROLA MEDIANTE CLS C. Malegori, S. Grassi, E. Marquez, S. Tonetto de Freitas,E. Casiraghi .....	71
DALL'IMAGING IPERSPETTRALE ALL'IMAGING MULTISPETTRALE: IDENTIFICAZIONE DEI CANALI SPETTRALI UTILI PER LA COSTRUZIONE DI SISTEMI MULTISPETTRALI NIR CON ELEVATE PRESTAZIONI R. Calvini, J. M. Amigo, A. Ulrici.....	72
USO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER RILEVARE IL CONTENUTO DI CROSTA IN FORMAGGIO PARMIGIANO-REGGIANO GRATTUGIATO S. Barzaghi, S. Michelini, K. Cremonesi, M. Nocetti, L. Marinoni, G. Cabassi .....	78
POTENZIALE DELLA TECNICA NIR PER LA CLASSIFICAZIONE DI DIVERSI TRATTAMENTI DELIGNIFICANTI SU BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE: IL CASO STUDIO DEL RACHIDE DI BANANA G. Dedenaro, C. F. Larenas Uria, S. Costa, P. Pedrini, E. Tamburini.....	83

ANALISI MULTIVARIATA E SPETTROSCOPIA NIR PER LA DETERMINAZIONE DEL GRADO DI CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA M1 IN LATTE BOVINO M. Li Vigni, C. Durante, J.M. Amigo, N. Cavallini, M. Cocchi, N. Rizzi.....	88
SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO E ANALISI MULTIVARIATA DEI DATI COME SUPPORTO PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DEL PELLET M. Mancini, A.Pizzi, A. Rinnan, C. Mengarelli, D. Duca, G. Rossini, E. Foppa Pedretti, A. Ilari , G. Toscano .....	89
UN APPROCCIO IPERSPETTRALE NIR PER IL RILEVAMENTO AUTOMATICO DI DIFETTI NEL CAFFÈ VERDE P. Oliveri, R. De Pellegrini, E. Tartacca, G. Salvatori, M.C. Casolino, M. Casale .....	95
RAPIDA STIMA DEL METODO DI CONSERVAZIONE MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR IN PETTI DI POLLO L.Serva, S.Balzan, M. Mirisola, E. Garbin, S. Tenti, E. Novelli, L. Fasolato,G. Marchesini, I. Andighetto, S. Segato .....	101
QUANTIFICAZIONE DI <i>Fusarium proliferatum</i> IN BULBILLI DI AGLIO INTERI E. Tamburini, E. Mamolini, M. De Bastiani, M. G Marchetti.....	105
QUANTIFICAZIONE NON DISTRUTTIVA DEL CONTENUTO DI CAROTENOIDI IN COCOMERI INTERI ( <i>Citrullus lanatus</i> ) ATTRAVERSO LA TECNICA NIR-on line E. Tamburini, G. Ferrari, P. Pedrini, V. Donegà, M. Malavasi, M. G. Marchetti. ....	110
MODELLI PREVISIONALI PER LA VALUTAZIONE DELLO STADIO DI MATURAZIONE DI BANANITO MEDIANTE HYPERSPECTRAL IMAGING Y.-Y. Pu,T.M. P. Cattaneo, M. Buccheri, M. Grassi, A. Gowen.....	115
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL CONTENUTO DI FLUORO IN MISCELE DI POLILATTIDE (PLA) E TALCO UTILIZZANDO LA TECNICA NIR C. Tagliati, T. Bonato, S. Costa, P. Pedrini, E. Tamburini .....	120
VALUTAZIONE RAPIDA DELLO STATO IDRICO DI FOGLIE DI VITE MEDIANTE SPETTROSCOPIA NEL VISIBILE E VICINO INFRAROSSO: IL CASO STUDIO DELL'ISOLA DI ISCHIA R. Beghi, V. Giovenzana, R. Guidetti.....	126
PREDIZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DI FORMAGGIO GRANA PADANO DOP CON NUOVI STRUMENTI NIR PORTATILI. L. Marinoni , A. Stroppa , S. Barzaghi , K. Cremonesi , N. Pricca, A. Meucci, G. Cabassi.....	132
UTILIZZO DI UNO STRUMENTO PORTATILE (MICRONIR) PER L'AUTENTICAZIONE DI SPECIE ITTICHE S. Grassi, E. Casiraghi, C. Alamprese .....	137
USO DI UNO STRUMENTO NIR PORTATILE PER LA VALUTAZIONE DELL'OMOGENEITÀ DELL'UNIFEED DISTRIBUITO IN MANGIATOIA. L. Serva, G.Marchesini, E. Garbin, S. Tenti, M. Mirisola, S. Segato, G. Gerardi, I. Andighetto..	138



UTILIZZO DI IMAGING IPERSPETTRALE PER LA DISCRIMINAZIONE VARIETALE E DI RACCOLTO DI CARCIOFI M.L.Amodio, A. Berardi, I. Ricci, G. Colelli .....	143
IMAGING IPERSPETTRALE IN AGRICOLTURA: STIMA DEGLI EFFETTI DEGLI STRESS IDRICO E NUTRIZIONALE SULLE VARIABILI COLTURALI ATTRAVERSO UN SENSORE VIS-NIR M. Corti, D. Cavalli, P. Marino Gallina, G. Cabassi .....	144
MONITORAGGIO DEL GRADO DI MATURAZIONE DEL TARTUFO BIANCO MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR L. Mandrile, R. Balestini, A. Mello, G. Martra, A. M. Rossi .....	149
HYPERSPECTRAL REFLECTANCE SPECTROSCOPY AS RAPID TOOLS FOR BIOTIC AND ABIOTIC STRESS DETECTION ON TWO CROP SPECIES: CEREAL AND BIO-ENERGETIC PLANTS D.Masci, D.Bersan, L. Blasi, F.Borfecchia, P.Crino, L. De Cecco, A.Farneti, D. Iantosca, C. Micheli, A. Correnti .....	155

## **NIRS: NEW TRENDS AND CHALLENGES**

Tom Fearn

*UCL, London, UK*

Of the many interesting trends and challenges in NIRS today, the talk will focus on two. The first of these is the increasing availability of low-cost portable instruments. The possibility of taking the instrument to the sample means that we have the opportunity to take many more measurements and thus significantly reduce the sampling errors. In many situations this will more than compensate for the greater variability in the instrumental measurement compared with that from a laboratory instrument. It is important that the portable instrument actually works though – some recent offerings in the healthcare area seem rather worrying. The second topic is the need for better chemometric methods, or at least a better understanding of how to employ the ones we have, for deriving calibrations from very large sets of training data. The main problem for chemometrics in NIRS used to be how to cope with small numbers of training samples. How to make the best use of a large and heterogeneous training set is a more recent problem, and one that I would see as increasing in importance. The possibility of pooling measurements from large numbers of portable instruments to make a training set is an exciting one, though we need to beware of the hype that surrounds cloud computing. Pooling large quantities of extremely low quality data will not be a recipe for success.

## LA TECNICA NIR APPLICATA AL CONTROLLO QUALITÀ PER LA PRODUZIONE DI PASTA DI SEMOLA, PASTA ALL'UOVO

Elena Tamburini<sup>1</sup>, Michele Battaglia<sup>2</sup>, Lucia Suma<sup>2</sup>, Maria Gabriella Marchetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie – Università di Ferrara – Via L. Borsari, 46  
44121 Ferrara*

<sup>2</sup> *Pastificio Andalini Spa – Via Martiri di Belfiore, 13 – 44042 Cento (Ferrara)*

Elena Tamburini

\*Corresponding email

### Riassunto

Il mercato mondiale della pasta è in continua crescita, per ragioni riconducibili a bisogni dei consumatori in termini di facilità di consumo e convenienza, e per ragioni di salute e benessere. Oggigiorno l'insieme delle analisi chimico-fisiche necessarie per la garanzia di qualità ha un impatto economico notevole sulle aziende produttrici e, comunque, i risultati sono spesso disponibili solo diverse settimane dopo il campionamento. Metodi basati sulla spettroscopia NIR in combinazione con metodi chemiometrici multivariati sono stati impiegati nel settore pasta da tempo, grazie alla rapidità di analisi e alla misura simultanea di diversi parametri. In questo studio, la spettroscopia NIR *at-line* è stata applicata al controllo di qualità complessivo, fornendo risultati immediati e simultanei su tutti i parametri richiesti dall'azienda per la caratterizzazione dei loro campioni, dalla semola in ingresso (umidità, ceneri, proteine, glutine, indice di glutine, amido danneggiato), alla pasta secca (umidità, ceneri, proteine, glutine, indice di glutine, amido danneggiato, resa in cottura), alla pasta secca all'uovo (in aggiunta ai parametri per la pasta secca, contenuto di grassi e steroli, numero di uova, acido lattico e pigmenti naturali), e ad ingredienti aggiunti come uovo intero o tuorlo (umidità, grassi, steroli, acido lattico e pigmenti naturali). In seguito, è stato costruito un modello di calibrazione quantitativa su campioni di pasta secca di differenti origine per valutare e classificare la diversa resa in cottura come parametro qualitativo distintivo. Tutti i modelli di calibrazione hanno  $R^2 > 0.99$ . Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$  utilizzando uno strumento NIRFlex® N-500 (Buchi, Svizzera), così come tutte le elaborazioni chemiometriche, inclusi i pretrattamenti, sono state eseguite con NIRCal® 5.4 (Buchi, Svizzera).

### Introduzione

La pasta rappresenta uno dei principali e tradizionali prodotti alimentari italiani, molto apprezzati anche all'estero. L'Italia, infatti, non solo è il principale produttore mondiale di pasta secca alimentare, con oltre 3.0 milioni di tonnellate, ma ne è anche il principale consumatore (circa 28 kg/anno pro capite) ed esportatore (circa 1.5 milioni di tonnellate) [1]. In particolare, negli ultimi anni l'enorme flusso di vendite all'estero, corrispondente ormai a più della metà della produzione nazionale di pasta, corrisponde ad un valore complessivo di circa 1,6 miliardi di euro, per un miliardo circa imputabile al mercato comunitario e per il restante importo ai paesi extra-UE, con particolare e crescente rilevanza di paesi del medio ed estremo oriente [2]. A questo deve aggiungersi la produzione di pasta fresca industriale, che contribuisce per ulteriori 150.000 tonnellate.

Come è noto, gli unici ingredienti per la produzione di pasta di semola sono la semola di grano duro e l'acqua, mentre la pasta all'uovo prevede l'aggiunta di uova, in quantità minima definita dalla normativa di riferimento [3,4]. In entrambi i casi è possibile aggiungere altri ingredienti in polvere

per il conferimento di particolari caratteristiche organolettiche e di colore (i.e., pomodoro, ortica, nero di seppia).

La globalizzazione e l'aumento di competitività del settore ha fatto della qualità un criterio sempre più stringente per la produzione, spinta anche dalla pressione del mercato e dalle esigenze dei consumatori più attenti. Perciò l'intero processo di produzione della pasta è soggetto a severi aspetti regolatori, non solo per gli ingredienti utilizzati, ma anche per il processo e per le caratteristiche dei prodotti finiti. Oggigiorno l'insieme delle analisi chimico-fisiche necessarie per la garanzia di qualità ha un impatto economico notevole sulle aziende produttrici e, comunque, i risultati sono spesso disponibili solo diverse settimane dopo il campionamento. Inoltre, in alcuni casi, come la determinazione del numero di uova, non sono disponibili metodi diretti e il valore viene ricavato indirettamente a partire da altri parametri analizzati come la concentrazione di steroli totali [5]. La spettroscopia NIR in combinazione con metodi chemiometrici multivariati è ormai tradizionalmente impiegata da anni per il controllo di qualità dell'intera filiera, a partire dal grano [6] e dalla semola [7], fino al prodotto finito [8], grazie alla rapidità di analisi e alla misura simultanea di diversi parametri. In questo studio, la spettroscopia NIR *at-line* è stata applicata al controllo di qualità complessivo delle materie prime e dei prodotti finiti, fornendo risultati immediati e simultanei su tutti i parametri richiesti dall'azienda per la caratterizzazione dei campioni, dalla semola in ingresso (umidità, ceneri, proteine, glutine, indice di glutine, amido danneggiato), alla pasta secca (umidità, ceneri, proteine, glutine, indice di glutine, amido danneggiato, resa in cottura), alla pasta secca all'uovo (in aggiunta ai parametri per la pasta secca, contenuto di grassi e steroli, numero di uova, acido lattico e pigmenti naturali), e ad ingredienti come tuorlo d'uovo (umidità, grassi, steroli, acido lattico e pigmenti naturali) e additivi come polvere di pomodoro, ortica e spinacio, per i quali è stata determinata la qualità microbiologica.

## Materiali e Metodi

*Materie prime e pretrattamenti.* Tutti i campioni utilizzati in questo studio provengono dai lotti di materie prime in ingresso al Pastificio Andalini Spa di Cento, in provincia di Ferrara. I campioni di semola arrivano allo stabilimento già macinati e pronti per l'utilizzo, corredati con un certificato di analisi. L'azienda effettua controlli analitici esterni aggiuntivi per tutti i parametri di interesse. I risultati di tali controlli sono stati presi come analisi di riferimento. Analogamente per tutti gli altri ingredienti, tuorlo d'uovo pastorizzato, polvere di pomodoro, ortica e spinacio essiccate, i cui campioni sono stati prelevati direttamente dai lotti in ingresso. In totale sono stati raccolti: 90 campioni di semola di grano duro, 113 campioni di pasta secca (linea 4minuti® e linea tradizionale, 36 campioni di pasta all'uovo linea AnticaTradizione®), 20 campioni di tuorlo d'uovo pastorizzato e 1 campione per ciascuna polvere. I campioni di semola e di uovo sono stati sottoposti all'analisi NIR senza alcun pretrattamento, mentre la pasta di semola secca e all'uovo è stata sminuzzata grossolanamente con un pestello in teflon. Ai campioni di polveri è stato aggiunto un quantitativo di acqua necessario alla creazione di una pasta densa (dil. 1 → 3 w/v).

Le prove di resa in cottura sono state realizzate secondo il protocollo utilizzato in azienda, e misurando l'aumento di peso di 100g di pasta dopo cottura per 10 minuti.

*Analisi NIR.* Gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento NIRFlex N-500 (Büchi, Svizzera), dotato di un sistema portacampioni per piastre Petri in vetro di 7,5 cm di diametro. Per ciascun campione è stato acquisito un solo spettro, nell'intervallo 1000-2500 nm, a intervalli di 8 nm. Per ottimizzare il rapporto segnale/rumore, lo spettro finale è il risultato della media di 16 scansioni.

*Elaborazioni chemiometriche.* Tutte le elaborazioni statistiche e chemiometriche sono state realizzate con NIRCal 5.0 (Büchi, Svizzera). La selezione delle lunghezze d'onda, la regressione PLS e tutti i parametri statistici sono stati ottenuti dalla procedura automatica Calibration Wizard® inclusa nel software. Gli spettri sono stati pretrattati prima della regressione (Tabella 1) i modelli di regressione sottoposti a cross-validation e validazione esterna.

## Risultati e Discussione

Durante il periodo di studio sono state messe a punto le curve di calibrazione per tutti i parametri riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Elenco delle matrici e dei parametri

Matrice	Parametro
SEMOLA di grano duro	Umidità
	Ceneri
	Proteine
	Glutine
	Indice di glutine
	Colore b+
PASTA DI SEMOLA	Umidità
	Proteine
	Ceneri
	Amido danneggiato
PASTA ALL'UOVO	Resa in cottura
	Umidità
	Proteine
MISTO UOVO (tuorlo)	Ceneri
	Estratto etereo
	Umidità
	Proteine
	Lipidi
	Steroli
POMODORO DISIDRATATO	Pigmenti naturali ( $\beta$ -carotene)
	Carica microbica totale
	Batteri
	Lieviti
	Muffe
SPINACIO DISIDRATATO	Carica microbica totale
	Batteri
	Lieviti
	Muffe
ORTICA DISIDRATATA	Carica microbica totale
	Batteri
	Lieviti
	Muffe

Gli spettri ottenuti dall'acquisizione dei campioni per le varie matrici sono riportati in Figura 1. Su di essi, a seconda del parametro di interesse, sono stati elaborati opportuni pretrattamenti matematici (dati non riportati).

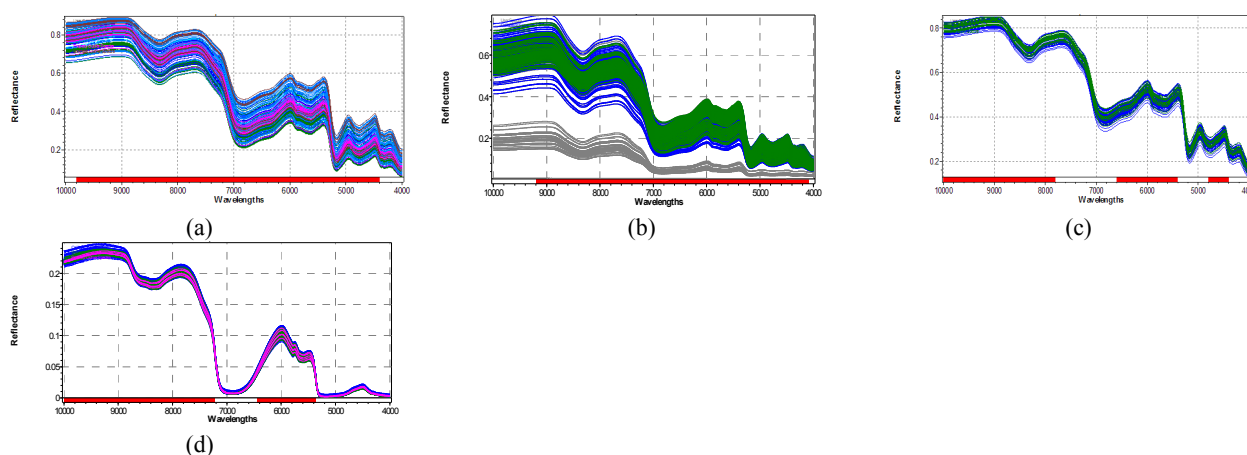


Figura 1. Spettri non pretrattati di campioni di semola di grano duro (a), pasta di semola (b), pasta all'uovo (c), misto uovo (d), polveri disidratate di pomodoro, ortica e spinacio (e).

Per alcuni parametri relativi alle matrici semola e pasta di semola, sono stati utilizzati come base di calibrazione i dati già presenti nel data base dello strumento, derivanti da campioni estranei all'azienda. A titolo di esempio, si mostrano le rette di calibrazione per alcuni parametri di interesse per la semola (Figura 2) e la pasta di semola (Figura 3).

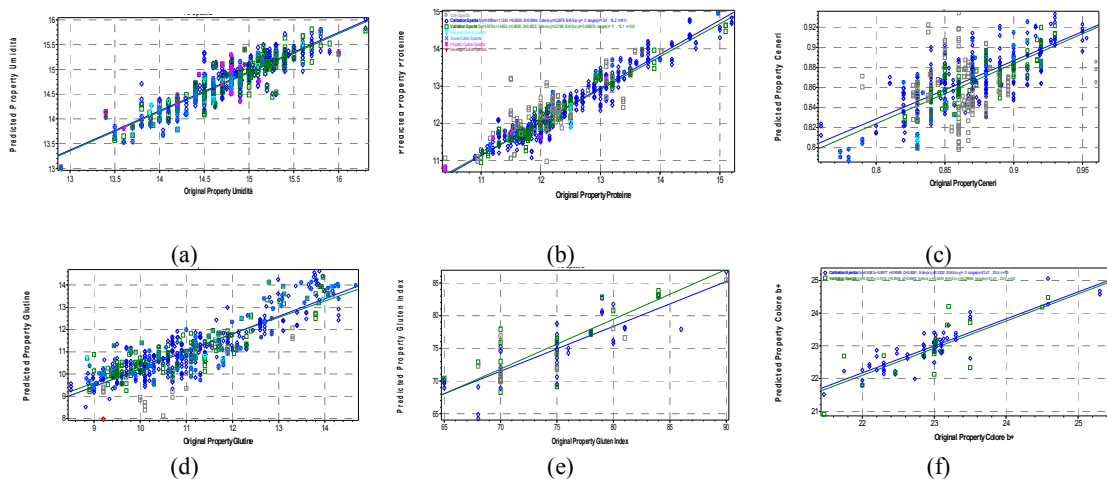


Figura 2. Rette di calibrazione e validazione per i parametri umidità (a), proteine (b), ceneri (c), glutine (d), indice di glutine (e) per la matrice semola di grano duro.

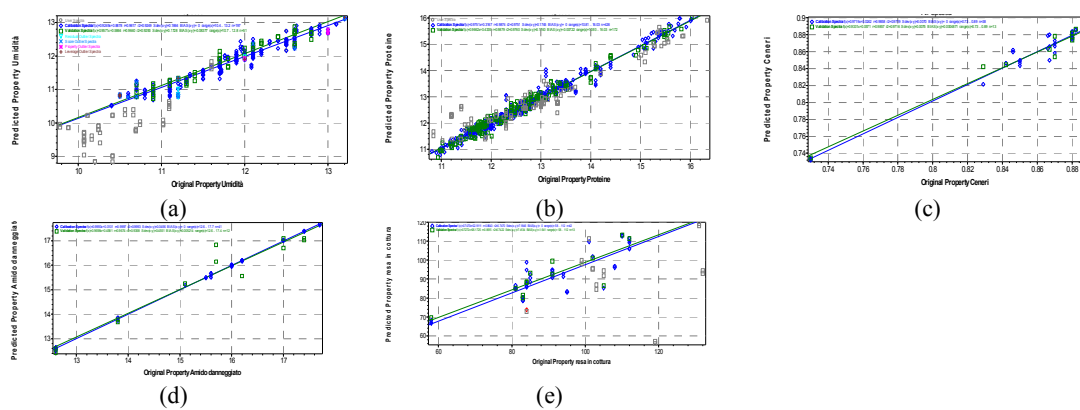


Figura 3. Rette di calibrazione e validazione per i parametri umidità (a), proteine (b), ceneri (c), amido danneggiato (d), resa in cottura (e) per la matrice pasta di semola.

Alcuni dati delle elaborazioni statistiche dei modelli PLS dei parametri analizzati sono riportati in Tabella 2.

Parametro	#samples	WL	Factors	#outliers	range	R <sup>2</sup>	SEC	SEP
<b>SEMOLA</b>								
Umidità	340	953/1501	13	3	12.9-16.3	0.942	0.23	0.24
Ceneri	314	1251/1501	2	67	0.76-0.95	0.763	0.02	0.02
Proteine	317	1187/1501	5	0	10.4-15.1	0.954	0.26	0.22
Glutine	317	953/1501	3	20	8.5-14.67	0.627	0.98	1.11
Gluten Index	78	1187/1501	5	15	65-90	0.827	3.33	3.02
Colore b+	90	953/1501	12	0	21.47-25.5	0.908	0.33	0.54
<b>PASTA SEMOLA</b>								
Umidità	303	1187/1501	7	25	9.53-13.47	0.967	0.17	0.18
Proteine	319	1276/1501	13	21	10.81-16.03	0.972	0.18	0.26
Ceneri	51	1251/1501	13	0	0.73-0.92	0.985	0.007	0.007
Amido danneggiato	51	1501/1501	13	0	12.6-17.7	0.999	0.015	0.035
Resa in cottura	67	953/1501	7	11	66.87-134.67	0.789	6.53	7.74
<b>PASTA UOVO</b>								
Umidità	113	1251/1501	6	17	9.08-12.05	0.953	0.16	0.21
Proteine	36	953/1501	4	0	13.8-16.3	0.983	0.15	0.19
Ceneri	36	953/1501	3	0	1.00-1.42	0.957	0.035	0.028
Estratto etereo	82	953/1501	9	2	3.34-5.92	0.992	0.07	0.08
<b>MISTO UOVO</b>								
Umidità	156	1217/1501	4	0	72.63-78.67	0.957	0.29	0.31
Proteine	144	1351/1501	5	0	10.00-13.22	0.798	0.33	0.35
Lipidi	123	1137/1501	9	0	7.88-13.02	0.969	0.21	0.22
Steroli	120	1148/1501	12	12	0.34-0.56	0.939	0.01	0.01
β-carotene	144	964/1501	11	0	11.5-19.8	0.817	1.20	1.25

I modelli di regressione sono stati tutti utilizzati per il monitoraggio di qualità, anche se in alcuni casi possono essere ulteriormente migliorati. In un solo caso è stato utilizzato tutto lo spettro (1501/1501 lunghezze d'onda), mentre negli altri sono state selezionate in automatico dal software NIRCal le zone dello spettro maggiormente correlate all'informazione analitica (dati non riportati). Alcuni parametri come le ceneri hanno un piccolo range di calibrazione, cosa che influenza le performance statistiche delle calibrazioni.

Una volta calibrati tutti i parametri di interesse e validati attraverso l'acquisizione di campioni indipendenti per verificare la robustezza dei modelli di regressione, il NIR è stato impiegato per il monitoraggio di materie prime in ingresso e prodotti finiti finalizzato al controllo qualità dell'azienda. Attualmente infatti, la procedura utilizzata all'arrivo dei lotti di materie prime prevede il prelievo di un campione e l'invio ad un laboratorio di analisi esterno, che rende al termine della caratterizzazione, un certificato di analisi. Il principale svantaggio di questa procedura sono i tempi di attesa dei risultati analitici, che possono arrivare fino a 15-20 giorni. Sostituire il controllo qualità con uno strumento NIR ha permesso all'azienda di ottimizzare, non solo i tempi per l'ottenimento dei risultati e quindi l'attestazione di conformità ai requisiti delle materie prime, ma anche i costi complessivi di analisi, riducendo la necessità di analisi tradizionali solo a qualche campione di controllo.

In particolare, l'Azienda Andalini ha scelto di utilizzare i dati ottenuti dal NIR come base informativa per la messa a punto di un progetto di marketing che prevede l'inserimento di un codice QR su alcune linee di pasta, attraverso cui il consumatore può accedere ad un portale che in tempo reale, ed in dipendenza del numero di lotto del prodotto, fornisce la caratterizzazione analitica puntuale del prodotto.

### **Conclusioni**

La sperimentazione ha permesso di verificare che la tecnica NIR può essere vantaggiosamente utilizzata per il controllo qualità in azienda di tutte le materie prime in ingresso e dei prodotti finiti. La costruzione dei modelli di calibrazione ha permesso di confermare l'esistenza di correlazioni lineari per tutti i parametri considerati, in tutte le matrici.

### **Ringraziamenti**

Il lavoro è stato realizzato grazie al contributo del Pastificio Andalini Spa di Cento (Ferrara), nell'ambito del progetto PG/2014/355366 finanziato dalla Regione Emilia Romagna.

### **Bibliografia**

1. ISTAT 2013
2. a cura del centro studi economici PASTARIA 1/2014 PG 57-62
3. Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari DPR 187/2001 - Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali
4. European Commission (1989). Council Directive 89/395/EEC. The Official Journal of the European Communities, L187, 17–20.
5. Marta Bevilacqua, Remo Bucci, Stefano Materazzi, Federico Marini Application of near infrared (NIR) spectroscopy coupled to chemometrics for dried egg-pasta characterization and egg content quantification. Food Chemistry 140 (2013) 726–734
6. Cocchi, M., Durante, C., Foca, G., Marchetti, A., Tassi, L., & Ulrici, A. (2006). Durum wheat adulteration detection by NIR spectroscopy multivariate calibration. Talanta, 68(5), 1505-1511.
7. Sinelli, N., Pagani, M. A., Lucisano, M., D'Egidio, M. G., & Mariotti, M. (2011). Prediction of semolina technological quality by FT-NIR spectroscopy. Journal of Cereal Science, 54(2), 218-223.

8. Menesatti, P., Antonucci, F., Pallottino, F., Bucarelli, F. M., & Costa, C. (2014). Spectrophotometric qualification of Italian pasta produced by traditional or industrial production parameters. *Food and bioprocess technology*, 7(5), 1364-1370.



## ANALISI NIRS NELLA SELEZIONE VARIETALE DEL GRANO DURO

Marilena Paolini\*

Società Produttori Sementi S.p.A. – Via Macero, 1 40050 Argelato (BO) Italia

Presenting Author

\*Corresponding email: marilena.paolini@syngenta.com

### **Riassunto**

Dal 1985 la Società Produttori Sementi (in seguito: PSB) impiega le analisi NIRS per lo screening precoce delle linee di frumento in selezione; inizialmente si utilizzò un apparecchio a filtri, per passare poi agli strumenti con monocromatore e più recentemente iniziare a lavorare con gli apparecchi FT-NIR. Impiegando campioni aziendali, sono state sviluppate calibrazioni specifiche per predire i principali caratteri qualitativi del frumento; velocità, semplicità e basso costo della tecnica NIR hanno consentito di analizzare migliaia di campioni derivanti dai cicli di selezione in tempo utile per fornire i necessari feedback ai breeder per l'avanzamento delle linee e la scelta delle varietà. Molte varietà PSB sono state costituite mirando alla qualità elevata e stabile (contenuto proteico, hardness, colore della semola, ecc.), insieme con l'indispensabile buon valore agronomico. Dal 2014 la PSB è entrata a far parte del Gruppo Syngenta, con l'obiettivo specifico di contribuire al miglioramento delle varietà di grano duro destinate a soddisfare la crescente domanda globale per la pasta di alta qualità. L'attività di analisi NIRS è stata quindi orientata negli ultimi due anni alle caratteristiche qualitative del duro per l'industria pastaria: calibrazioni per contenuto proteico, vitrosità, indice di giallo (NIR+visibile), peso specifico, sono verificate e migliorate per fornire predizioni rapide ed affidabili per la selezione; calibrazioni particolarmente robuste sono state sviluppate per il contenuto proteico della granella e per l'indice di giallo della semola. I risultati qualitativi delle linee selezionate sono la verifica più importante dell'efficacia predittiva delle analisi NIRS: il regolare screening delle successive generazioni ha condotto alla registrazione di varietà attualmente impiegate nelle filiere produttive per assicurare semola di alta e altissima qualità all'industria pastaria. In particolare Svevo ed Aureo sono note per il loro contenuto elevato e stabile di proteina (14% sul peso secco), Levante, Normanno e Pigreco per l'indice di giallo molto elevato (b 26 CIELab).

### **Introduzione**

L'applicazione delle analisi NIRS sui cereali, in particolare sul frumento, allo scopo di predire la composizione della granella è iniziata circa 50 anni fa, con la determinazione dell'umidità e del contenuto proteico [1], ed ha registrato da allora una diffusione sempre maggiore, associata ad una costante evoluzione degli strumenti e dei software di calibrazione e gestione [2]. I consistenti e ben noti vantaggi della spettroscopia NIR impiegata nell'analisi e classificazione dei lotti di produzione, e cioè l'economicità, la semplicità e la velocità di esecuzione, risultano ancora più evidenti nel lavoro di selezione varietale, dove l'elevato numero di campioni da processare e la quantità ridotta di granella disponibile per ciascun campione rendono le analisi NIR l'unica soluzione sostenibile per iniziare già a partire dalle generazioni precoci la selezione basata su caratteri correlati alla qualità del prodotto destinato all'industria molitoria e di trasformazione.

La PSB, attiva fin dalla sua fondazione (1911) nella costituzione di varietà di frumento tenero (*Triticum aestivum* L.) ed ora focalizzata sulla selezione di varietà di frumento duro (*Triticum durum* Desf.), ha iniziato dal 1985 ad utilizzare estesamente le analisi NIR come supporto alla

selezione varietale finalizzata a profili qualitativi stabili e orientati a soddisfare le richieste dell'industria agroalimentare.

## Materiali e Metodi

Le scansioni NIRS sono state eseguite con:

- Nirssystem 6500 FOSS, monocromatore 400 – 2500 nm = 25000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  (1° intervallo 400 – 1100 nm; 2° intervallo 1100 – 2500 nm), modulo di lettura spinning cup 50 mm.; sfarinato integrale ottenuto con macinello Cyclotech (FOSS) griglia 0,5 mm
- Thermo Scientific Nicolet FT Antaris II, FT 9000 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ , modulo di lettura sfera di integrazione con coppa rotante 60/120 mm; granella intera.

Le analisi di riferimento, nell'ambito del grano duro, sono state eseguite:

- presso il Laboratorio A.G.E.R. di Bologna per il contenuto di proteina con metodo Kjeldahl;
- presso il laboratorio analitico R&D della PSB per peso specifico e umidità con GAC 2100, per le misure colorimetriche con Colorimetro Minolta, per lo scoring visivo della vitrosità.

Le calibrazioni sono state effettuate a cura del laboratorio analitico R&D PSB, con il supporto tecnico delle aziende fornitrici, tramite i software dedicati:

- per il NIRSystem 6500: WINISI II (FOSS), metodo PLS modificato;
- per il FT Antaris II: TQ Analyst (Thermo Scientific), metodo PLS.

## Risultati e Discussione

L'attività di calibrazione è stata avviata su Nirssystem 6500 nel 1998 e su FT Antaris nel 2013, impiegando campioni di sfarinato o granella provenienti dalla selezione varietale, la cui composizione è influenzata, oltre che da fattori genetici, da numerosi fattori agronomici ed ambientali, quali la località, l'andamento stagionale dell'anno, la gestione della fertilizzazione, la densità di allevamento (piante spaziate, file, parcelle).

I campioni presentano perciò una elevata variabilità sia come analisi di riferimento sia come spettri di riflessione (Figura 1 e Tabella 1 per Nirssystem 6500, sfarinato integrale; Figura 2 e Tabella 2 per FT Antaris II, granella intera)

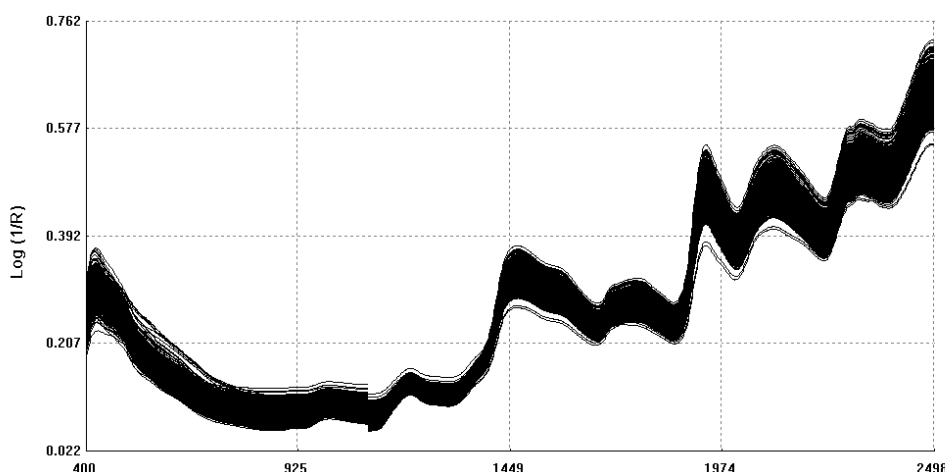


Figura 1- Spettri dei campioni di sfarinato integrale impiegati per la calibrazione su NIRSystems 6500; in ascissa le lunghezze d'onda (400 nm = 25000  $\text{cm}^{-1}$ ; 2498 nm = 4000  $\text{cm}^{-1}$ )

Tabella 1- Numerosità (N), valori medi (Mean) e deviazioni standard (SD) dei campioni impiegati come set di calibrazione su apparecchio NIRSystems 6500; statistiche delle equazioni predittive elaborate con software WINISI II metodo PLSMod sull'intero spettro; protPSB = proteina % ss, colPSB = indice di giallo Minolta misurato su sfarinato integrale, colsem = indice di giallo Minolta misurato su semola (macinazione su mulino per piccoli volumi)

**Edit - C:\DATINIR\DURO\DURO14.EQA**

File Name: C:\DATINIR\DURO\DURO14.EQA Equation File File Date: Wed Jun 17 21:17:39 2015 Last Update: Wed  
 File ID: colore proteina gd campioni1996-2014 Master No: 25009409 Instrument Model: NIRSystem 6500  
 Constituents: 3 Calculated Equations: 0 Number of Variables: 1050 Lab Basis: Dry Matter  
 Segment 1 400 - 1098,2 Segment 2 1100 - 2498,2

Constituent	Type	N	Mean	SD	Est. Min	Est. Max	SEC	RSQ	SECV	1-VR	#
protPSB	1	607	14.6130	2.5339	7.0112	22.2148	0.2978	0.9862	0.3099	0.9850	259
colPSB	1	1081	14.5967	1.4561	10.2284	18.9650	0.2986	0.9579	0.3179	0.9524	259
colsem	1	789	24.1380	2.3890	16.9710	31.3050	0.6932	0.9158	0.7207	0.9090	259

Figura 2- Spettri dei campioni di granella impiegati per la calibrazione del contenuto % di proteine ss su FT Antaris II (9000 - 4000 cm<sup>-1</sup>)

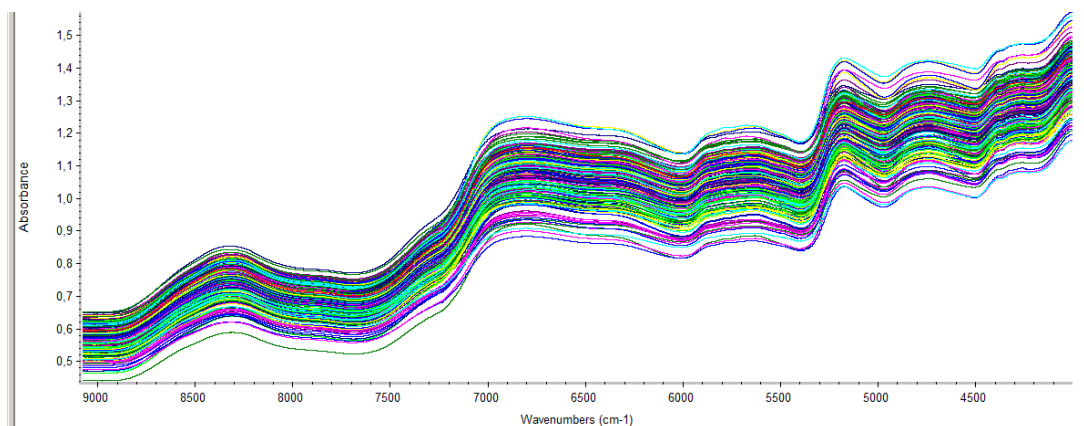


Tabella 2 – Campioni di granella impiegati come set di calibrazione su apparecchio FT Antaris II

Variabile	Numero campioni	Media	Min	Max	Dev St
Proteine % ss	277	14,78	9,4	22,5	2,63
Peso specifico kg/hl	341	81,07	73,8	86,6	2,28
Vitrosità	240	5,87	2	9	2,04

Le calibrazioni sono verificate annualmente con un set di validazione esterno, che viene quindi, se opportuno, integrato nel set di calibrazione.

E' risultata sempre molto affidabile e robusta la calibrazione per contenuto di proteina sia su sfarinato integrale (NIRSSystem 6500) (Tabella 1 e Figura 3), sia su granella intera (FT Antaris II) (Figura 6).

Si sono dimostrate idonee come strumenti di supporto alla selezione varietale le calibrazioni per indice di giallo (sfarinato e semola) su NIRSSystem 6500 (Tabella 1, Figura 4 e 5); sono già in uso, e in corso di perfezionamento, le calibrazioni per peso specifico e vitrosità della granella su FT Antaris II (Figure 7 e 8).

Figura 3 – Validazione dell'equazione per proteina % ss (NIRSSystem 6500, software WINISI II, sfarinato integrale) con set esterno di 40 campioni della raccolta 2015 analizzati con metodo di riferimento

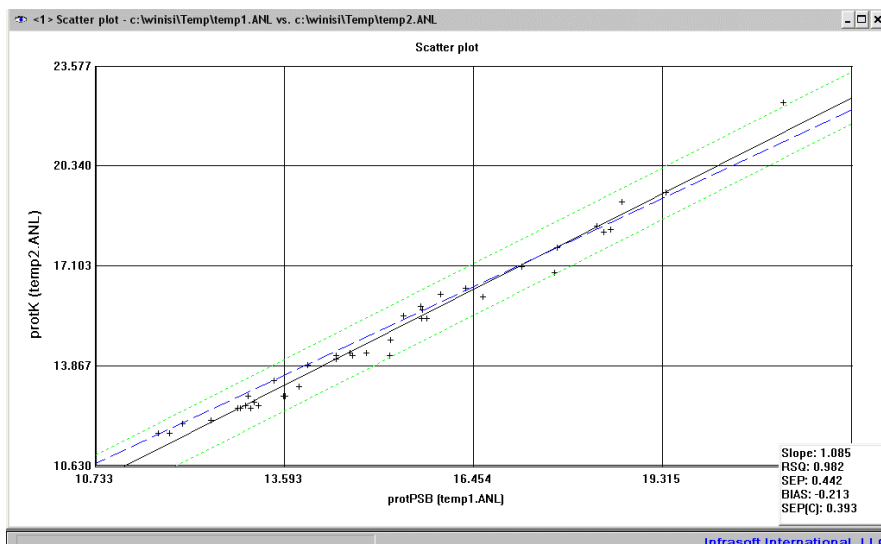


Figura 4 – Validazione dell’equazione per indice di giallo dello sfarinato (NIRSSystem 6500, software WINISI II, letture su sfarinato integrale) con set esterno di 100 campioni della raccolta 2014 analizzati con metodo di riferimento su sfarinato e successivamente integrati nel set di calibrazione (colPSB)

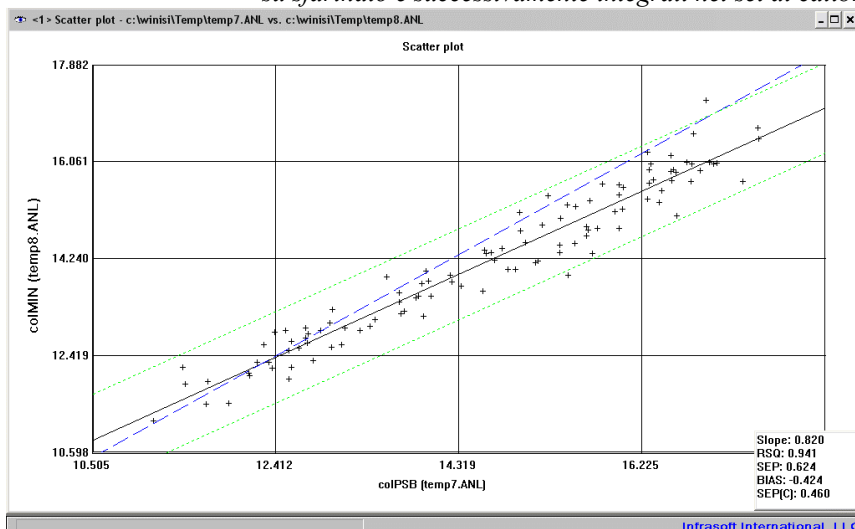


Figura 5 – Come Figura 6 per indice di giallo della semola (colsem)

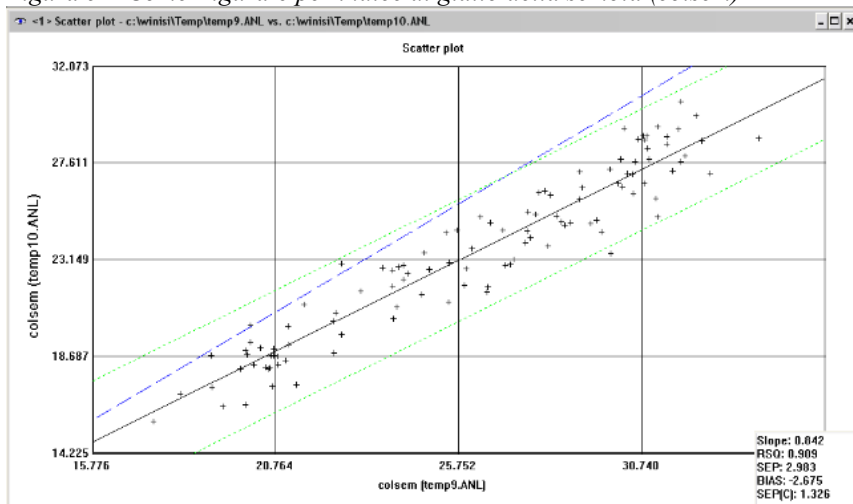


Figura 6 – Validazione dell’equazione per proteina % ss (FT Antaris II, software TQ Analyst, letture su granella intera) con set esterno di 40 campioni della raccolta 2015 analizzati con metodo di riferimento su sfarinato integrale e successivamente integrati nel set di calibrazione

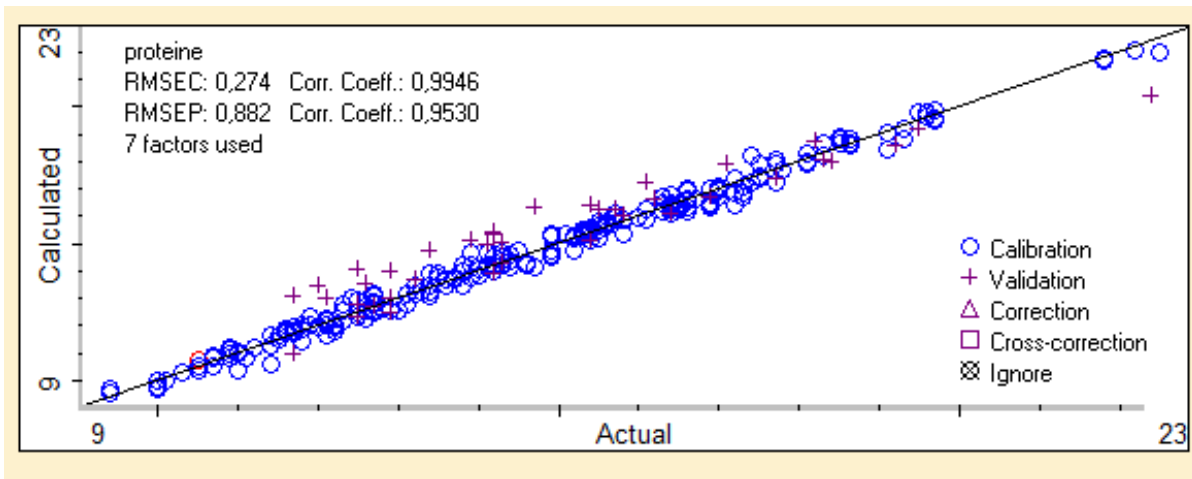


Figura 7 – Validazione dell'equazione per peso specifico (Kg/hl) (FT Antaris II, software TQ Analyst, letture su granella intera) con set esterno di 299 campioni

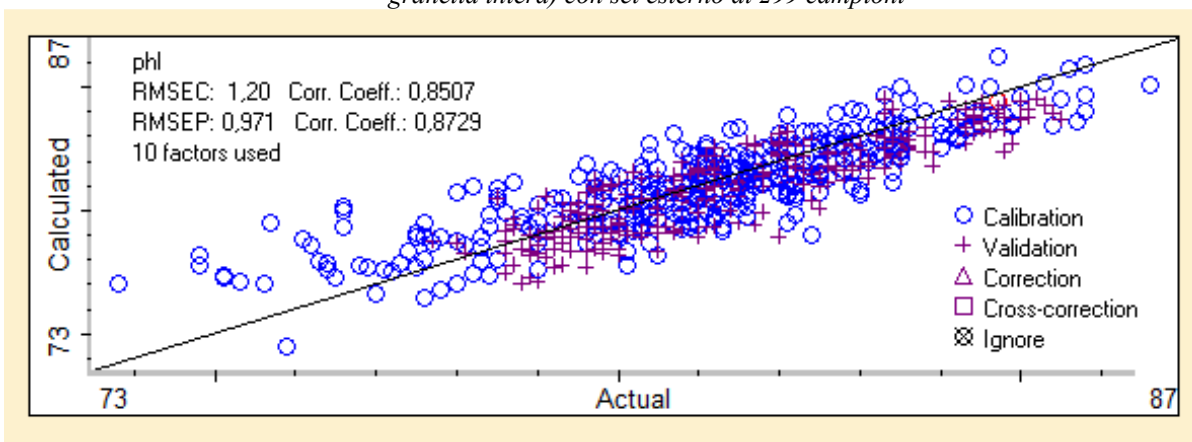
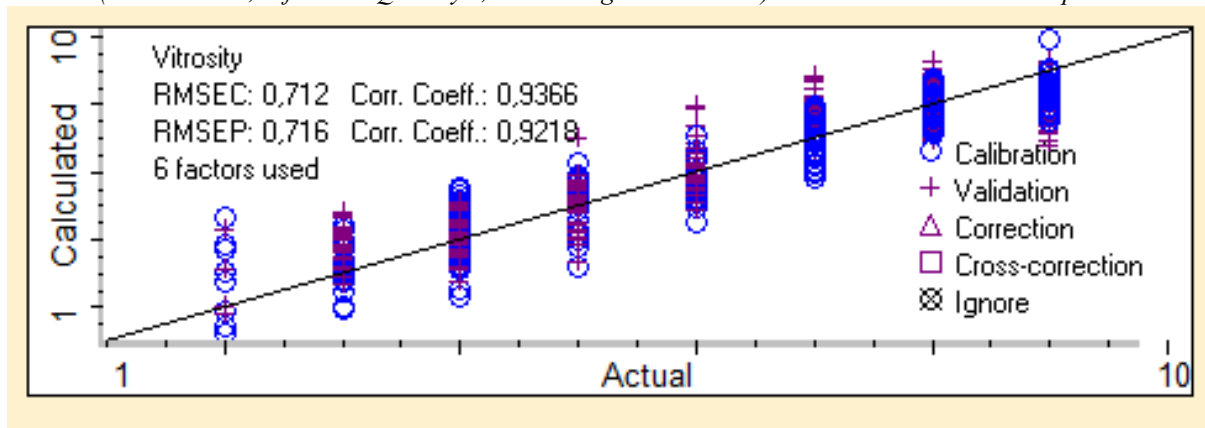


Figura 8 – Validazione dell'equazione per vitrosità (scala visiva 1-9, 1=totalmente bianconato, 9=totalmente vitreo) (FT Antaris II, software TQ Analyst, letture su granella intera) con set esterno di 400 campioni



La costante applicazione delle analisi NIR ad ogni ciclo della selezione, su linee scelte in campo per valore agronomico e produttività, ha consentito alla PSB di ottenere varietà con le caratteristiche qualitative ricercate, in particolare varietà che presentano stabilmente un contenuto elevato di proteine (Tabella 3) o un elevato indice di giallo (Tabella 4).

Tabella 3 – Contenuto proteico medio nelle ultime cinque raccolte (coltivazione convenzionale) per le varietà PSB ad alta proteina Aureo e Svevo, a confronto con varietà standard (Simeto, varietà storica tuttora molto diffusa; Iride e Saragolla, varietà PSB ad alta produttività), con le varietà PSB ad alto indice di giallo e buon livello proteico Levante e Pigreco (elaborazione da dati monitoraggio qualitativo CREA disponibili su banche dati qce.entecra.it)

Varietà / Anno di raccolta	Media annuale	Aureo	Svevo	Simeto	Iride	Saragolla	Levante	Pigreco
2016	12,27	14,20	14,05	10,61	11,45	11,99	13,50	13,50
2015	12,49	13,70	13,68	11,30	12,35	11,99	12,55	13,60
2014	12,16	13,02	13,00	11,78	12,01	11,88	12,64	-
2013	12,32	15,00	14,39	11,81	11,59	11,76	13,42	-
2012	12,69	14,05	14,04	11,45	12,11	12,25	13,48	-

Tabella 4 – Indice di giallo medio nella rete di prove nazionali per le varietà PSB ad alto indice di giallo Levante e Normanno, a confronto con varietà standard (Simeto, varietà storica tuttora molto diffusa; Iride e Saragolla, varietà PSB ad alta produttività), con le varietà PSB ad alta proteina Svevo e Aureo (elaborazione da dati monitoraggio qualitativo CREA disponibili su banche dati qce.entecra.it)

Varietà / Anno di raccolta	Media annuale	Levante	Normanno	Simeto	Iride	Saragolla	Aureo	Svevo
2014	24,31	27,30	-	23,17	22,52	24,37	25,80	26,83
2013	24,68	27,55	-	22,52	22,61	24,88	24,92	26,45
2012	26,11	28,60	27,78	23,62	23,77	26,54	25,57	27,61
2011	23,77	26,68	26,06	22,12	21,66	24,32	24,44	26,76
2010	24,69	27,65	27,27	23,46	22,78	24,55	25,80	26,96

### Conclusioni

L'introduzione delle analisi NIRS nel processo di costituzione varietale del grano duro presso PSB ha reso fattibile ed efficace la selezione per caratteristiche di qualità della granella (in particolare contenuto proteico e indice di giallo della semola) a partire dalle generazioni precoci. Grazie all'applicazione della tecnica NIR, sono state selezionate ed iscritte al Registro Nazionale varietà che rispondono in modo stabile alle richieste dell'industria pastaria per la materia prima di alta qualità, e vengono caratterizzate dal punto di vista qualitativo tutte le linee e varietà PSB.

### Bibliografia

1. D. R. Massie, K. H. Norris (1965) *Spectral reflectance and transmittance properties of grain in the visible and near infrared*. Transaction of ASAE, 8, 598 - 600.
2. M. M. Pojic, J. S. Mastilovic (2013) *Near Infrared Spectroscopy – Advanced Analytical Tool in Wheat Breeding, Trade and Processing*. J.S. Food Bioprocess Technol 6 (2) : 330 - 352.

## SPERIMENTAZIONE DI UN SISTEMA NIR PER LA VALUTAZIONE DELLO STATO SANITARIO DI UVA AL CONFERIMENTO IN CANTINA

Valentina Giovenzana\*, Roberto Beghi, Lucio Brancadoro, Riccardo Guidetti

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio, Agroenergia (DiSAA),  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy.

Presenting Author: Valentina Giovenzana

\*Corresponding email: [valentina.giovenzana@unimi.it](mailto:valentina.giovenzana@unimi.it)

### Riassunto

La selezione dell'uva al conferimento è una fase particolarmente delicata per ottenere un prodotto qualitativamente valido, in particolar modo per grandi realtà come le cooperative in cui il numero dei soci è elevato. Mettere a punto un metodo oggettivo e tempestivo per la misura dello stato sanitario dell'uva al conferimento, grazie a tecnologie già ampiamente utilizzate nel settore agroalimentare, potrebbe sgravare gli esperti della cantina dalle decisioni di declassamento del prodotto.

La sperimentazione è stata condotta in collaborazione con Cantine Settesoli e le acquisizioni spettrali sono state effettuate su grappoli di differenti varietà di uva bianca (Chardonnay, Grillo, Inzolia, Viognier) e rossa (Alicante, Nero d'Avola, Syrah), prelevati dai carri al conferimento. È stato utilizzato un sistema spettrofotometrico (Corona Process, Zeiss, Germania) per l'analisi di flussi e/o partite di prodotto non omogenei in grado di effettuare misure in riflessione a distanza (intervallo di distanza utile tra strumento e campione 80-600 mm), nel campo spettrale vis/NIR (400-1650 nm). Il campionamento è stato effettuato considerando uve sane, affette da botrite, oidio e marciume acido.

È stata eseguita un'analisi qualitativa mediante *Principal Component Analysis* (PCA) e un'analisi quantitativa che ha permesso la costruzione di un modello di classificazione in grado di separare gli spettri sani da quelli malati, utilizzando la tecnica *Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (PLS-DA). In questo modo grazie al modello di classificazione viene valutato e quindi classificato ogni spettro acquisito.

Per tutti i modelli di classificazione realizzati, sia considerando la singola cultivar che uve bianche o rosse o addirittura considerando un modello di classificazione unico sia per le cultivar bianche che rosse, le percentuali di corretta classificazione (in validazione) sono risultate comprese tra 89,8 % e 94,0 %.

I risultati ottenuti sono incoraggianti: il sistema sperimentato ha permesso di quantificare le porzioni dei grappoli che presentano sintomi di attacchi fungini in maniera veloce, permettendo all'operatore di avere a disposizione un indicatore oggettivo per definire l'accettabilità del prodotto in funzione dell'entità dei marciumi.

### Introduzione

La selezione dell'uva al conferimento è una fase particolarmente delicata per ottenere un prodotto qualitativamente valido, in particolar modo per grandi cooperative vinicole in cui il numero dei soci è elevato, le vigne dislocate su ampi spazi caratterizzati da terreni con proprietà pedologiche differenti, la cura, le tecniche e i metodi di coltivazione diversi. Tutto ciò può portare a produrre uva della stessa varietà con caratteristiche qualitative e stato sanitario differenti. Soprattutto in queste realtà è importante pertanto mettere a punto metodi per una valutazione oggettiva e tempestiva (senza rallentare le frenetiche movimentazioni logistiche durante la vendemmia, tipiche del conferimento in grosse cantine) delle caratteristiche qualitative e dello stato sanitario dell'uva al

conferimento in modo da ottimizzare la fase di selezione per le diverse vinificazioni. In alcune realtà, come quella delle Cantine Settesoli, con 2000 soci, lo stato sanitario dell'uva gioca un ruolo fondamentale nel determinare il valore economico e quindi il guadagno del socio stesso. Attualmente, la misura di tale parametro è affidata all'esperienza e all'occhio esperto di agronomi ed enologi della cantina [1, 2]. Mettere a punto un metodo oggettivo e tempestivo per la misura dello stato sanitario dell'uva al conferimento, grazie a tecnologie già ampiamente utilizzate nel settore agroalimentare [3, 4], potrebbe sgravare gli esperti della cantina dalle decisioni di declassamento del prodotto. Questo permetterebbe di ridurre al minimo eventuali contenziosi con i soci e di standardizzare, in modo più incisivo rispetto all'uso dei soli parametri qualitativi, la qualità dell'uva e quindi del vino.

Il lavoro ha lo scopo di studiare l'applicazione di sistemi ottici che utilizzano la tecnica della spettroscopia nel visibile (vis) e vicino infrarosso (NIR) per la quantificazione dello stato sanitario di uva al momento del conferimento in cantina.

### Materiali e Metodi

L'attività sperimentale si è svolta durante la vendemmia agosto/settembre 2015 presso Cantine Settesoli (Menfi, AG). Durante la vendemmia, le acquisizioni spettrali sono state effettuate su grappoli di differenti varietà di uva bianca (*Chardonnay, Grillo, Inzolia, Viognier*) e rossa (*Alicante, Nero d'Avola, Syrah*), prelevati dai carri al conferimento; il sistema di misura è stato sperimentato in condizioni di laboratorio che simulassero le misure sui carri in ingresso in cantina (Figura 1); il campionamento è stato effettuato considerando uve sane, affette da botrite, oidio e marciume acido, come indicato in tabella 1. Sono stati poi acquisiti spettri su campioni sani ma colpiti da scottatura (falso positivo alla malattia). Inoltre sono stati acquisiti spettri su campioni costituiti esclusivamente da raspi e da foglie in modo da definirne uno spettro medio, da eliminare in fase applicativa in modo tale che la valutazione dello stato sanitario avvenga solo su campioni di uva.



Figura 1 Metodologia di acquisizione degli spettri di grappoli di uva in condizioni di laboratorio

Tabella 1 Dettaglio del campionamento

Varietà	Uva	Sano	Falso positivo alla malattia (Scottatura)	Malattia			Campioni totali
				Botrite	Oidio	Marciume acido	
Alicante	rossa	15	0	10	0	0	25
Chardonnay	bianca	158	44	125	182	21	530
Grillo	bianca	143	66	45	23	50	327
Inzolia	bianca	10	0	10	0	0	20
Nero d'Avola	rossa	287	5	137	168	86	683
Syrah	rossa	333	6	243	20	65	667
Viognier	bianca	150	18	114	2	23	307



Uva bianca	461	128	294	207	94	1184
Uva rossa	635	11	390	188	151	1375
Totale	1096	139	684	395	245	2559
Totale %	43	5	27	15	10	100
	48		52			

### Strumentazione

Lo strumento Corona Process (Zeiss, Germania) è un sistema spettrofotometrico destinato ad applicazioni nel settore *food* per l'analisi di flussi e/o partite di prodotto non omogenei (dimensioni 40 x 30 x 30 cm, peso circa 15 kg), in grado di effettuare misure in riflessione a distanza nel campo spettrale vis/NIR (400-1650 nm). Lo strumento è caratterizzato da un'ottica complessa in grado di effettuare misure a distanza ed è dotato da un sistema automatico di messa a fuoco e compensazione delle variazioni di distanza tra strato d'uva e sensore di misura (intervallo di distanza utile tra strumento e campione 80-600 mm). Lo strumento risulta pertanto ideale per essere applicato in fase di conferimento dell'uva per identificare marciumi o per caratterizzarne la qualità.

### Elaborazione dati

In questa prima fase di calibrazione dello strumento, gli spettri acquisiti sono riferiti a uva sana o uva malata. Con l'obiettivo di identificare lo stato sanitario dell'uva è stato utilizzato un approccio multivariato nell'elaborazione dei dati. È stata eseguita un'analisi qualitativa mediante *Principal Component Analysis* (PCA) e un'analisi quantitativa che ha permesso la costruzione di un modello di classificazione in grado di separare gli spettri sani da quelli malati, utilizzando la tecnica *Partial Least Squares – Discriminant Analysis* (PLS-DA) [5].

In questo contesto, PLS-DA è stata effettuata per valutare la possibilità di distinguere campioni sani da quelli malati. Le performance di classificazione dei modelli sono state valutate utilizzando la procedura di cross-validazione *leave-more-out*, utilizzando cinque gruppi di cancellazione. Il valore di *cut-off* dei modelli PLS-DA per la classificazione dei campioni è stato fissato a 0,5.

Per valutare l'efficienza del modello è stata calcolata l'accuratezza del modello:

$$\text{Accuratezza (\%)} = \frac{TP+TN}{TP+FP+FN+TN} \quad (1)$$

Dove TP e TN corrispondono a campioni correttamente classificati, rispettivamente, come malati e sani; FP sono invece campioni sani erroneamente classificati come malati; FN sono campioni malati erroneamente classificati come sani.

## Risultati e Discussione

### Risultati analisi qualitativa

L'analisi qualitativa ha riguardato l'interpretazione degli spettri (analisi visiva degli spettri) e l'analisi delle componenti principali (PCA), tecnica fondamentale per l'analisi multivariata dei dati mediante la quale è possibile trasformare le numerose variabili (in questo caso lunghezze d'onda, nm) in nuove variabili, chiamate componenti principali, che permettono di visualizzare i campioni (in questo caso gli spettri) su un nuovo piano, con lo scopo di definire gruppi di campioni simili e *outliers*.

In figura 2 sono mostrati gli spettri medi acquisiti su grappoli di uva sana, foglia e raspo di una varietà di uva a bacca bianca, cultivar Chardonnay (Figura 2A), e a bacca rossa, Nero d'Avola (Figura 2B). Dall'analisi visiva degli spettri si possono individuare le lunghezze d'onda che permettono di distinguere lo spettro dell'uva da quello della foglia e del raspo. Per quanto riguarda la varietà a bacca bianca (Figura 2A), il confronto dei tre spettri medi mostra importanti differenze

sia in corrispondenza dell'intervallo 550-680 nm, in corrispondenza del picco di assorbimento della clorofilla (670 nm), che in tutto il NIR (700-1650 nm). Tali differenze sono ancora più nette se si considerano le varietà a bacca rossa (Figura 2B). Queste informazioni vengono utilizzate per calibrare lo strumento al riconoscimento dei soli spettri di uva (sia varietà a bacca bianca che rossa) e all'eliminazione di quelli riguardanti foglia e raspo non soggetti a valutazione dello stato sanitario.

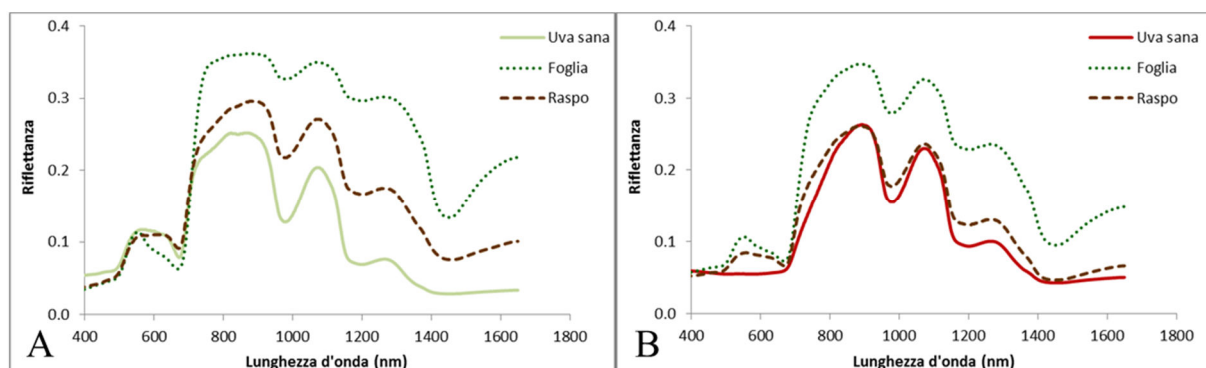


Figura 2- Spettri medi acquisiti su grappoli di uva sana, foglia e raspo cultivar A) Chardonnay e B) Nero d'Avola

L'analisi visiva degli spettri permette anche di mettere in luce le differenze tra spettri medi di uva sana, malata di botrite, oidio, marciume acido e scottatura sia per la cultivar a bacca bianca che a bacca rossa.

Per meglio mettere in risalto le differenze spettrali è stata utilizzata la PCA con la quale tutte le lunghezze d'onda dello spettro sono state considerate contestualmente permettendo di visualizzare gli spettri dei differenti gruppi di campioni. In Figura 3A è evidente come gli spettri di uva sana, cultivar Chardonnay, abbiano tutti valori negativi di PC1 (asse orizzontale), mentre gli spettri di uva malata si collochino per lo più a valori positivi di PC1. Anche la PC2 (asse verticale) ha un ruolo importante nella separazione dei campioni: è infatti possibile individuare i campioni di grappoli affetti da marciume acido nel quadrante caratterizzato da valori negativi di PC1 e positivi di PC2, mentre la maggior parte dei grappoli affetti da botrite e oidio si trovano in corrispondenza di valori positivi di PC1 e negativi di PC2. Per quanto riguarda i campioni soggetti a scottatura, potrebbero essere confusi con campioni malati anche se tali spettri sono presenti sia nella zona dei campioni sani che in quella dei campioni malati. Tale confusione potrebbe essere risolta, almeno parzialmente, aumentando la numerosità degli spettri di grappoli soggetti a scottatura per meglio calibrare lo strumento. Per quanto riguarda la cultivar Nero d'Avola (Figura 3B) è visibile una buona separazione tra gli spettri di uva sana, che mostra valori negativi di PC1 (asse orizzontale), e gli spettri di uva malata che invece si collocano per lo più a valori positivi di PC1. In questo caso la PC2 (asse verticale) contribuisce in modo marginale alla differenziazione delle classi di campioni permettendo solo una lieve separazione dei campioni malati.

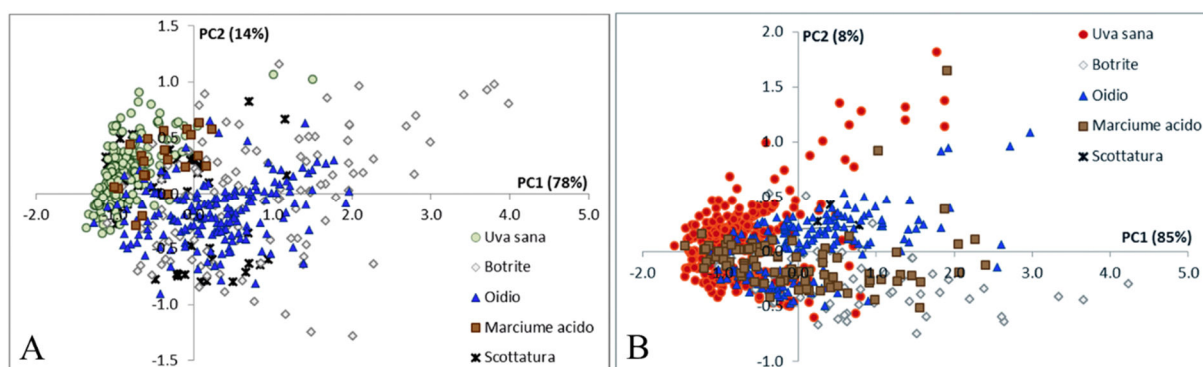


Figura 3- PCA di spettri acquisiti su grappoli A) Chardonnay e B) Nero d'Avola; distinzione tra uva sana, uva affetta da scottatura e malata di botrite, oidio e marciume acido.

### Risultati analisi quantitativa

I dati spettrali sono stati utilizzati per l'elaborazione di modelli di classificazione in grado di classificare gli spettri come sani o malati. In Tabella 2 sono indicati i risultati derivanti dai differenti gruppi di campioni che sono stati analizzati ottenendo in totale 8 modelli di classificazione differenti: un modello per ogni varietà di uva bianca (*Chardonnay*, *Grillo* e *Viognier*); un modello per ogni varietà di uva rossa (*Nero d'Avola* e *Syrah*); un modello tenendo separate le cultivar bianche; un modello tenendo separate le cultivar rosse; un modello unico ottenuto considerando tutte le uve analizzate. Per ogni modello è stata calcolata la percentuale di campioni correttamente classificati (Tabella 2). Per tutti i modelli analizzati, sia considerando la singola cultivar che uve bianche o rosse o addirittura considerando un modello di classificazione unico sia per le cultivar bianche che rosse, le percentuali di corretta classificazione (in validazione) non sono mai inferiori al 90%, con un errore massimo del 10%. Porep et al. [6] hanno studiato l'applicazione *on-line* di uno spettrofotometro vis/NIR per la quantificazione del marciume su grappoli di uva al conferimento ottenendo modelli con  $R^2$  tra 0,57 e 0,78.

Tabella 2 Performance dei modelli di classificazione PLS-DA effettuati sui differenti gruppi di campioni di uva

Modelli di classificazione PLS-DA		Calibrazione		Cross-validation	
	n° campioni	$R^2_{cal}$	Accuratezza <sub>cal</sub> (%)	$R^2_{cv}$	Accuratezza <sub>cv</sub> (%)
Chardonnay	530	0,75	95,7	0,72	94,0
Grillo	327	0,67	92,4	0,65	91,7
Viognier	307	0,75	93,2	0,72	91,9
Uva bianca	1184	0,67	91,6	0,66	91,1
Nero d'avola	683	0,68	92,1	0,65	90,8
Syrah	667	0,69	91,2	0,67	90,9
Uva rossa	1375	0,62	90,0	0,61	89,8
Uva	2559	0,63	90,2	0,62	89,9

Il dato relativo alla percentuale di campioni correttamente classificati è un dato aggregato. Per ogni modello di classificazione è presente una matrice di confusione (dati non mostrati) che, tramite un'analisi più approfondita, permette ulteriori considerazioni. L'analisi dei campioni FP (campioni sani che lo strumento vede come malati) e FN (campioni malati che lo strumento vede come sani) che ogni modello mostra, potrebbe essere determinante per capire la scelta del modello da applicare. In caso di un elevato numero di FP, lo strumento riconosce come malati campioni realmente sani e questo può portare alle seguenti considerazioni:

**Vantaggi** – un modello con molti FP tenderà a declassare in parte anche uva sana. Ne consegue che verrà salvaguardata la qualità del vino, con un possibile contestuale vantaggio economico per la cantina che difficilmente si troverà ad accettare uve con problematiche fitosanitarie;

**Svantaggi** – declassando potenzialmente anche una parte di uva sana potrebbero innescarsi fenomeni di sfiducia nel sistema di selezione da parte del socio insoddisfatto, che subisce un potenziale declassamento ingiustificato dell'uva.

In caso di FN, lo strumento riconosce come sani campioni realmente malati e questo può portare alle seguenti conseguenze:

**Vantaggi** (per il socio) – socio soddisfatto da un modello per lui garantista, grazie al quale porzioni di uva malata non vengono declassate;

**Svantaggi** (per tutti) – rischio di alterare la qualità del vino accettando partite di uva con un numero eccessivo di focolai di infezione, con una possibile perdita economica per la cantina.

## Conclusioni

Il sistema di misura permette di individuare e quantificare le porzioni dei grappoli che presentano sintomi di attacchi fungini in maniera veloce e automatica, permettendo all'operatore di definire la soglia di accettabilità del prodotto in funzione dell'entità dei marciumi e di avere a disposizione un indicatore oggettivo sulla base del quale classificare le partite d'uva al conferimento in cantina. Il sistema ottico potrebbe essere montato in una postazione intermedia tra zona ricevimento carri e

tramoggia, appositamente dedicata e dotata di nastro trasportatore prima dello scarico in tramoggia. Il vantaggio principale di questa soluzione consiste nella possibilità di misurare tutta la massa d'uva (trasportata in strato sottile sul nastro) ottenendo una valutazione meno approssimata del grado di infezione complessivo della partita in conferimento. Inoltre, questa soluzione permetterebbe di individuare diverse classi qualitative e di procedere con un'eventuale separazione delle stesse in funzione delle esigenze della produzione.

### **Bibliografia**

1. G.N. Hill, K.J. Evans, R.M. Beresford, R.G. Damberg (2014). *Comparison of methods for the quantification of botrytis bunch rot in white wine grapes*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 20(3), 432-441.
2. G.N. Hill, K.J. Evans, R.M. Beresford, R.G. Damberg (2013). *Near and mid-infrared spectroscopy for the quantification of botrytis bunch rot in white wine grapes*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 21, 467-475.
3. R., Guidetti, R. Beghi, V. Giovenzana (2012). *Chemometrics in Food Technology*. In: Chemometrics (InTech, eds.), Rijeka, Croatia, (pp. 217-252).
4. V. Giovenzana, R. Beghi, R. Civelli, R. Guidetti (2015). *Optical techniques for rapid quality monitoring along minimally processed fruit and vegetable chain*. Trends in Food Science & Technology, 46(2), 331-338.
5. S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson (2001). *PLS-regression: a basic tool of chemometrics*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 58, 109-130.
6. J.U. Porep, A. Mattes, P. Nikfardjam, D.R. Kammerer, R. Carle (2015). *Implementation of an on-line near infrared/visible (NIR/VIS) spectrometer for rapid quality assessment of grapes upon receipt at wineries*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 21(1), 69-79.

## MONITORAGGIO IN TEMPO REALE DEL GRADO DI TOSTATURA DEL CAFFÈ MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR

E. Bertone, A. Girauda, F. Savorani, F. Geobaldo

*Department of Applied Science and Technology – Polytechnic of Turin – C.so Duca degli Abruzzi 24 - 10129 Torino*

### Riassunto

La principale trasformazione del caffè prima della commercializzazione è rappresentata dalla tostatura, processo che influenza pesantemente le caratteristiche organolettiche della bevanda. A livello industriale, per soddisfare le aspettative dei consumatori legate ad una qualità costante, il processo richiede un controllo molto attento. Il monitoraggio del colore del caffè durante la tostatura potrebbe costituire uno strumento molto importante per valutare in tempo reale le performance del processo e garantirne la riproducibilità. La valutazione del colore, cioè l'imbrunimento del chicco, è utilizzato in per definire il grado di tostatura come indicatore delle performance del processo e questa misura può essere effettuata utilizzando la spettroscopia NIR. Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'applicabilità della spettroscopia nel vicino infrarosso per monitorare on-line il colore dei chicchi di caffè durante il processo di tostatura. Il controllo di processo è realizzato utilizzando una sonda nel vicino infrarosso (Bruker Optics, Germania) posta all'interno di un tostino da laboratorio (Probat, Germania). Sono stati acquisiti un totale di 800 spettri, durante 65 esperimenti di tostatura, pianificati mediante un experimental design che ha tenuto conto dell'influenza sul colore di diverse parametri sperimentali. Tra queste variabili: la varietà di caffè (Arabica, Robusta e miscele), la temperatura di processo (155°C, 160°C, 170°C e 180°C). Per ottenere il modello di predizione sul colore di tostatura viene utilizzata la PLS; sono stati utilizzati i parametri Hotelling  $T^2$  e i residui  $Q$  per valutare la presenza di campioni *outliers*. Il modello ottenuto presenta una buona capacità predittiva per il colore di tostatura con un RMSECV pari all'1,5 U.A.. Questo studio conferma l'applicabilità della spettroscopia NIR per il monitoraggio on-line del processo di tostatura del caffè. Dopo un'ottimizzazione del metodo si prospetta l'implementazione di questa tecnologia su scala industriale per automatizzare il controllo dei parametri di processo.

## SPETTROSCOPIA NIR: UNA TECNICA VERSATILE PER RISOLVERE PROBLEMI DIVERSI

M. Casale<sup>1</sup>, P. Oliveri<sup>1</sup>, M.C. Casolino<sup>1</sup>, M.C. Cavallero<sup>2</sup>, D. Toselli<sup>2</sup>, N. Sitta<sup>3</sup>, M. Zotti<sup>4</sup>

1. Department of Pharmacy, University of Genoa, Viale Cembrano 4, 16148, Genoa, Italy

2. TECNOGRANDA SpA, Via G.B. Conte, 19 - 12025 Dronero (CN), Italy

3. Professional Consulting Mycologist, Loc. Farné, 32, Lizzano in Belvedere, Italy

4. Department of Earth, Environment and Life Sciences, University of Genoa, Corso Europa 26, 16132, Genoa, Italy

Presenting Author

\*casale@difar.unige.it

### Riassunto

La spettroscopia NIR è una tecnica analitica versatile che presenta numerosi vantaggi, tra i più importanti la possibilità di acquisire spettri di campioni solidi e liquidi senza pretrattamento del campione. In questa presentazione verranno mostrati due casi studio in cui la spettroscopia NIR si è dimostrata una scelta efficace per risolvere problemi di natura diversa.

Nel primo studio, sono stati valutati gli effetti della tostatura ad aria calda o IR sulla nocciola Tonda Gentile Trilobata (TGT) del Piemonte al fine di individuare il processo di tostatura ottimale a seconda dell'impiego finale della nocciola. In particolare, 2 differenti condizioni di tempo e temperatura sono stati considerati per ogni metodo (aria calda o IR) per un totale di 4 processi di tostatura. La spettroscopia NIR è stata impiegata per la prima volta come metodo rapido e non distruttivo per differenziare le nocciole TGT e i loro prodotti di lavorazione (pasta e olio) sulla base del processo di tostatura, ottenendo risultati soddisfacenti.

Nel secondo studio, la spettroscopia NIR è stata impiegata per rilevare l'aggiunta fraudolenta di specie estranee nei funghi porcini secchi, in particolare in quelli importati dalla Cina. Un set rappresentativo di funghi secchi comprendenti le specie *Boletus edulis*, *Tylopilus spp.* e *Boletus violaceofuscus* sono stati analizzati con la spettroscopia NIR. Gli spettri sono stati utilizzati per creare dei modelli di classe con il nuovo metodo di modellamento Partial Least Squares Density Modelling (PLS-DM) [1] e anche con le due tecniche più comunemente impiegate, Quadratic Discriminant Analysis-UNEQUAL dispersed classes (UNEQ) [2] e Soft Independent Modelling of Class Analogy (SIMCA) [3]. I risultati hanno mostrato che la spettroscopia NIR combinata ad opportune tecniche chemiometriche rappresenta una strategia valida per la verifica di autenticità dei funghi secchi del gruppo *Boletus edulis*.

### Introduzione

Vengono mostrate due diverse applicazioni della spettroscopia NIR in campo alimentare.

- 1) Per l'industria di trasformazione, è fondamentale conoscere l'effetto del processo di tostatura sulla qualità delle nocciole e su parametri quali l'umidità, il colore e l'irrancidimento [4]. Si è visto che diversi metodi di tostatura producono significative differenze in termini di umidità, capacità antiossidante, contenuto fenolico totale, concentrazione di proteine e altri valori nutrizionali o tecnologici. Come riportato da Schirack et al. [5], tempi di riscaldamento più brevi portano ad una maggiore ritenzione dei nutrienti e a caratteristiche di qualità migliori, come consistenza e sapore. In questo studio si è valutata la possibilità di differenziare le nocciole intatte e i relativi prodotti di trasformazione, in base al processo di tostatura.
- 2) A causa della globalizzazione del commercio dei funghi, la maggior parte dei porcini disponibili in Italia provengono in realtà da altri Paesi. Nella maggior parte dei casi, essi sono raccolti in Europa orientale e in Cina, essiccati sul posto, e poi, dopo una prima

selezione, importati in Italia [6]. Non è raro trovare, tra questi boleti secchi importati, funghi di diversa specie. In questo studio abbiamo voluto valutare la spettroscopia NIR come strumento utile per rilevare l'aggiunta fraudolenta di specie estranee nei funghi porcini secchi.

## Materiali e Metodi

Per quanto riguarda la prima applicazione, due diversi metodi di tostatura (*aria calda* o *IR*) e due differenti condizioni per ciascun metodo (*normale*: bassa temperatura per lungo tempo, *veloce*: alta temperatura per breve tempo) sono stati considerati, per un totale di quattro tipi di processi di tostatura. Sono stati utilizzati 92 campioni di nocciole intatte tostate seguendo i 4 diversi processi e anche gli oli e le paste ottenute dalle stesse nocciole. Le misure spettroscopiche sono state eseguite con uno spettrometro FT-NIR (Buchi NIRFlex N-500) nel range 4000-10,000  $\text{cm}^{-1}$  con risoluzione 8  $\text{cm}^{-1}$  e 64 scansioni sulle nocciole intatte, sulla pasta e l'olio. Poi Analisi delle Componenti Principali (PCA) è stata applicata come metodo di visualizzazione per estrarre informazione utile dai dati.

Per quanto riguarda la seconda applicazione sono stati analizzati 80 campioni di funghi secchi: 44 campioni di *Boletus edulis* (la classe di interesse) e 36 campioni appartenenti ad altre specie di funghi morfologicamente simili tra cui *Tylophilus felleus* e *Boletus violaceofuscus*. Per ogni fettina di fungo sono state analizzate 3 parti (cuticola, trama e imenio) e l'informazione proveniente da queste parti è stata elaborata sia in maniera distinta che congiuntamente. Gli spettri NIR sono stati acquisiti nel range 4000-10,000  $\text{cm}^{-1}$  con risoluzione 8  $\text{cm}^{-1}$  e 128 scansioni con uno spettrometro FT-NIR (Buchi NIRFlex N-500). Gli spettri sono stati usati per sviluppare modelli di classe affidabili ed efficienti utilizzando un nuovo metodo di modellamento, PLS-DM [1], e le due tecniche più comunemente usate, UNEQ [2] e SIMCA [3].

## Risultati e Discussione

Figura 1 mostra gli spettri NIR relativi ai 92 campioni di nocciola tostate con i 4 diversi processi, nel piano delle prime 2 componenti principali.

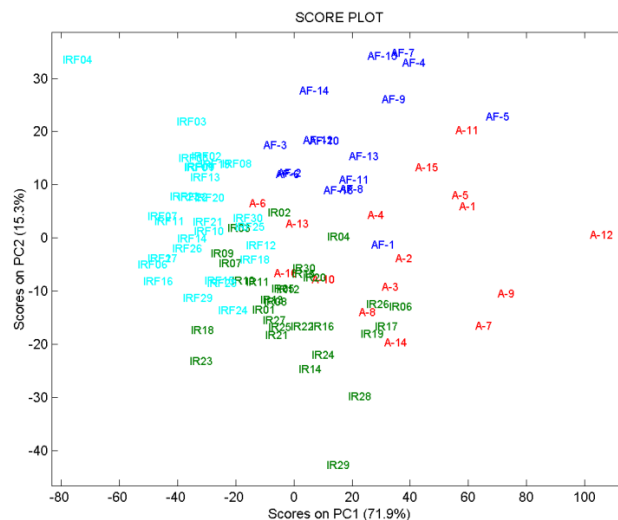


Figura 1- PCA Nocciole intatte- score plot di 92 spettri FT-NIR. Nocciole tostate con 4 processi differenti (*aria calda*=A e *IR*=IR, *normale* e *veloce*).

Risultati analoghi, ossia una chiara separazione tra i prodotti sottoposti ai 4 diversi processi di tostatura, sono stati ottenuti anche analizzando la pasta e l'olio di nocciola (score plots non mostrati).

Figura 2 si riferisce alla seconda applicazione e mostra gli spettri NIR degli 80 campioni di funghi secchi relativi all'imenio, nel piano delle prime 2 componenti principali. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche dall'elaborazione degli spettri relativi a cuticola e trama.

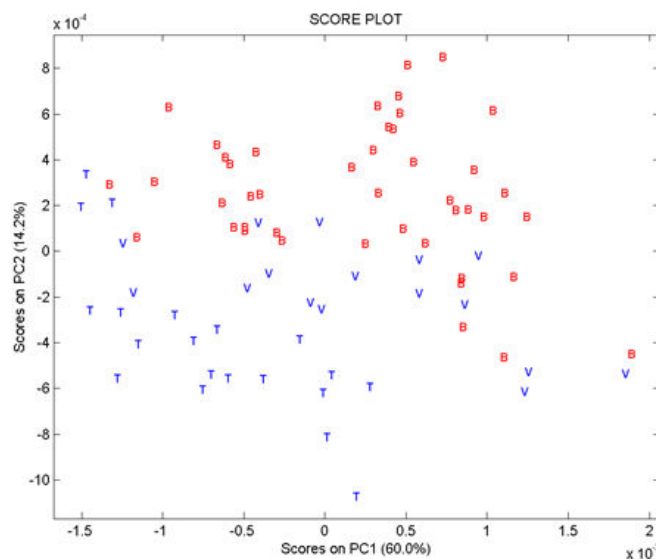


Figura 2- PCA-imenio dei funghi- score plot di 80 spettri FT-NIR. Funghi appartenenti a 3 diverse specie (B=Boletus edulis, T=Tylopilus felleus, V=Boletus violaceofuscus).

In questo studio, è stato testato un approccio di fusione di tipo *low-level*, che consiste nel combinare gli spettri acquisiti analizzando le 3 diverse parti del fungo.

Infine, un'analisi di modellamento di classe è stata seguita, per caratterizzare i funghi della specie *Boletus edulis*.

In tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti con le 3 diverse tecniche di modellamento, sulle 3 parti del fungo separatamente e anche combinando le 2 parti più informative del fungo ossia cuticola e imenio. Sono riportati i risultati ottenuti sul test set esterno, che conteneva il 25% dei campioni scelti in maniera random.

Le 'performances' dei modelli sono espresse come 'efficienza', ossia media geometrica tra sensibilità (percentuale di campioni della classe studiata accettati dal modello) e specificità (percentuale di campioni delle altre classi rifiutati dal modello studiato).

Tabella 1 – Risultati analisi di modellamento sul test set esterno

	CUTICOLA	TRAMA	IMENIO	CUTICOLA+IMENIO
UNEQ	0%	58%	58%	0%
SIMCA	80%	73%	78%	81%
PLS-DM	81%	74%	82%	81%

PLS-DM risulta essere il metodo di modellamento di classe più adatto per la caratterizzazione dei funghi *Boletus edulis* basata sugli spettri NIR. Infatti, i modelli PLS-DM sono più equilibrati in termini di sensibilità e specificità e, fatta eccezione per la seconda parte (trama) che, anche dai micologi viene descritta come la parte meno caratterizzante per i funghi, PLS-DM raggiunge un'efficienza dell'80% sul test set esterno. Tali modelli sono da considerarsi assolutamente adatti ai fini di screening, considerando la natura e la complessità del problema in esame.

## Conclusioni



La spettroscopia NIR, accoppiata con la PCA, può essere considerata una tecnica rapida e non distruttiva per riconoscere nocciole TGT e relativi prodotti di trasformazione (pasta e olio) tostate con metodi e condizioni differenti.

La spettroscopia NIR, accoppiata con opportune tecniche di modellamento di classe, può essere implementata come strategia analitica efficace per la verifica di autenticità di funghi secchi del gruppo *Boletus edulis*.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto con fondi dell'Università di Genova (CUP D32I1400360005).

### Bibliografia

1. P. Oliveri, M. I. López, M. C. Casolino, I. Ruisánchez, M. P. Callao, L. Medini and S. Lanteri (2014) *Partial least squares density modeling (PLS-DM) - a new class-modeling strategy applied to the authentication of olives in brine by near-infrared spectroscopy*, *Analitica Chimica Acta*, 851, 30-36.
2. M.P. Derde, D.L. Massart (1986). *UNEQ: a disjoint modelling technique for pattern recognition based on normal distribution*, *Analitica Chimica Acta*, 184, 33-51.
3. S. Wold, M. Sjöström, SIMCA: a method for analysing chemical data in terms of similarity and analogy. In B. R. Kowalski (Ed.): *Chemometrics, Theory and Application*. American Chemical Society Symposium Series No. 52, American Chemical Society, Washington, DC (1977) 243-282.
4. M. Özdemir, O. Devres (2000) *Analysis of color development during roasting of hazelnuts using response surface methodology*. *Journal of Food Engineering*, 45(1), 17-24.
5. A.V Schirack, M. Drake, T.H Sanders, K.P Sandeep (2006) *Impact of microwave blanching on the flavor of roasted peanuts*, *Journal of Sensory Studies*, 21(4), 428-440.
6. N. Sitta (2000) *Presenza di funghi del genere Tylopilus frammisti a funghi porcini secchi importati dalla Cina e commercializzati in Italia*. *Mic. Ital.* 24(1) 96-99.

## POTENZIALITÀ DELLA SPETTROSCOPIA NIR DI DISCRIMINARE TRA DIVERSI SISTEMI PRODUTTIVI E DI PREDIRE LA QUALITÀ ALLA RACCOLTA: CASO STUDIO SU FRAGOLE

Amodio M.L., Ceglie F., Chaudhry M. A., F. Piazzolla, Colelli G.

*Università di Foggia, Via Napoli 25, 71122, Foggia (FG)*

### Riassunto

Il presente studio ha valutato le potenzialità della spettroscopia NIR per la predizione della composizione di fragole, e per la discriminazione dei frutti per sistema produttivo. In particolare i frutti provenivano da un sistema convenzionale (C), uno biologico basato su ammendamenti organici (M) e uno biologico basato su concimi organici commerciali, secondo un approccio noto come biologico di sostituzione (S). In tutto sono state analizzate 210 fragole cv. 'Festival' di cui 90 per M, 90 per S e 30 per C. I frutti sono stati raccolti a differenti stadi di maturazione. Per ogni frutto sono stati acquisiti 3 spettri a temperatura ambiente usando un spettrometro FT-NIR (MPA) in un intervallo di assorbanze da 12500 a 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Con il software OPUS è stato fatto un primo screening delle combinazioni migliori di bande spettrali e pre-trattamenti matematici per le successive elaborazioni realizzate in Matlab. Sono stati poi creati modelli di predizione PLS per i solidi solubili (TSS), il pH e l'acidità titolabile (TA), misurate per ogni singolo frutto delle tre classi, e acido ascorbico e fenoli, misurati solo per M e S. Per classificare i frutti dei 3 sistemi produttivi è stata applicata l'analisi discriminante PLS-DA. I risultati dimostrano che le informazioni spettrali ottenute tramite scansione di frutti interi di fragola hanno mostrato un eccellente potenziale nella predizione di TSS ( $R^2=0.85$ ;  $\text{RMSEP}=0.58$ ), TA ( $R^2=0.86$ ;  $\text{RMSEP}=0.09$ ) e pH ( $R^2=0.58$ ;  $\text{RMSEP}=0.15$ ), ma non per fenoli e acido ascorbico. Per quanto riguarda la classificazione la quasi totalità dei campioni del test set esterno è stata correttamente assegnata alla giusta classe con di sensibilità e specificità superiori a 0.94. Questi risultati suggeriscono di proseguire con ulteriori prove basate sulla metodologia NIR per realizzare processi selettivi che puntino a migliorare la qualità iniziale delle fragole destinate al mercato fresco e a supportare i processi di autenticazione e tracciabilità.

## USO DELLA SPETTROSCOPIA DI RIFLETTANZA RISOLTA NEL TEMPO PER DISTINGUERE MELE CON DIVERSA *TEXTURE*

Anna Rizzolo<sup>1\*</sup>, Maristella Vanoli<sup>1,2</sup>, Fabio Lovati<sup>1</sup>, Maurizio Grassi<sup>1</sup>, Marina Buccheri<sup>1</sup>, Nadja Sadar<sup>3</sup>, Alessandro Torricelli<sup>4</sup>, Angelo Zanella<sup>3</sup>, Lorenzo Spinelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Unità di ricerca per i processi dell'industria agroalimentare (CREA-IAA), via Venezian 26, Milano

<sup>2</sup> Istituto di Fotonica e Nanotecnologie – CNR-IFN, piazza Leonardo da Vinci, 32, Milano

<sup>3</sup> Centro di Sperimentazione Agraria e Forestale, Vadena, Laimburg 6, Ora (BZ)

<sup>4</sup> Politecnico di Milano, Dipartimento di Fisica, Milano, Piazza Leonardo da Vinci, 32, Milano

Presenting Author

\*Corresponding email: [anna.rizzolo@crea.gov.it](mailto:anna.rizzolo@crea.gov.it)

### Riassunto

Frutti con diversa *texture* sono caratterizzati da proprietà ottiche diverse della polpa. I coefficienti di assorbimento ( $\mu_a$ ) e di scattering ridotto ( $\mu'_s$ ), misurati in modo non distruttivo mediante Spettroscopia di Riflettanza risolta nel tempo (TRS), sono legati alle proprietà sensoriali, meccaniche ed acustiche della polpa dei frutti. Allo scopo di studiare la possibilità di utilizzare la tecnica TRS per selezionare mele 'Braeburn' aventi caratteristiche qualitative e sensoriali differenti, 270 frutti raccolti a 3 epoche diverse sono stati misurati individualmente mediante TRS (670-1040 nm) dopo 1, 7 e 14 giorni di shelf life. Dagli spettri di assorbimento e di scattering sono stati ricavati i contenuti di clorofilla (CHL) e di acqua (H<sub>2</sub>O) e lo scattering ( $\mu'_s$ ). Le stesse mele sono state analizzate per le proprietà sensoriali, meccaniche, acustiche e per gli spazi intercellulari (RISV). Gli attributi sensoriali (durezza, succosità, farinosità, croccantezza) sono stati sottoposti all'Analisi dei Cluster ottenendo 3 profili sensoriali (W1, W2, W3). Le mele W1, di *texture* farinosa, avevano i valori più alti di  $\mu'_s$  e RISV e i valori più bassi di H<sub>2</sub>O e delle proprietà meccaniche ed acustiche. Le mele W3, di *texture* croccante, presentavano i valori più bassi di  $\mu'_s$  e RISV e i valori più alti di CHL, H<sub>2</sub>O e delle proprietà acustiche e meccaniche. L'analisi discriminante basata sulle proprietà ottiche ha permesso di classificare correttamente il 73% dei frutti W1, l'85% dei frutti W3 e il 49% dei frutti W2 (*texture* intermedia). Sono stati studiati anche modelli di classificazione dell'intensità (molto bassa, bassa, media, alta, molto alta) dei singoli attributi sensoriali. La performance di tali modelli variava dal 50% per la croccantezza al 61% per la durezza, anche se più del 70% delle mele appartenenti alle classi molto o poco farinose e delle mele molto o poco dure erano classificate correttamente.

### Introduzione

La *texture* è un attributo qualitativo chiave per le mele, in quanto frutti croccanti e succosi sono preferiti dai consumatori rispetto a quelli farinosi ed è legata alla struttura del frutto a livello molecolare, micro e macroscopico [1]. Croccantezza, succosità e farinosità definiscono la *texture* di un frutto e sono legate alle proprietà meccaniche e acustiche della polpa. La *texture* dipende dal grado di maturazione e varia con l'intenerimento del frutto a causa delle modificazioni subite dalle pareti cellulari e dalla lamella mediana. I frutti possono essere considerati come mezzi torbidi in cui la distribuzione della luce è determinata dalla interazione tra i fenomeni di dispersione (legati alla microstruttura del frutto) e di assorbimento (legati alla presenza di composti chimici, quali pigmenti, acqua, zuccheri). La spettroscopia di riflettanza nel vicino infrarosso risolta nel tempo

(time-resolved reflectance spectroscopy, TRS) permette di caratterizzare otticamente i mezzi torbidi fornendo, per il volume esplorato, la misura simultanea delle proprietà ottiche legate all'assorbimento (coefficiente di assorbimento,  $\mu_a$ ) e alla dispersione (coefficiente di scattering ridotto,  $\mu'_s$ ) [2] fino alla profondità di 1-2 cm [3] senza essere significativamente influenzata dalle caratteristiche degli strati superficiali (es. colore della buccia) [4]. Studi relativi all'applicazione della tecnica TRS a diversi tipi di frutti (mele, pesche, nettarine, mango) hanno dimostrato che il coefficiente di assorbimento misurato a 670 nm ( $\mu_{a670}$ ), vicino al picco di assorbimento della clorofilla-*a*, può essere utilizzato come indice di maturazione [5,6]. Nelle mele il  $\mu_{a670}$  diminuisce con l'accrescimento e la maturazione dei frutti e durante la conservazione refrigerata [7-10]. Inoltre il  $\mu_{a670}$  diminuisce con l'intenerimento del frutto ed è correlato positivamente con la solubilizzazione delle sostanze pectiche [11]. Mele caratterizzate da elevati valori di  $\mu_{a670}$  (poco mature) sono più dure e vengono percepite all'assaggio come più croccanti e succose rispetto a mele caratterizzate da bassi valori di  $\mu_{a670}$  (mature) che sono invece descritte come farinose [10,12].

In questo lavoro è stata valutata la possibilità di utilizzare la tecnica TRS per selezionare mele 'Braeburn' aventi caratteristiche qualitative e sensoriali differenti, studiando le relazioni tra le proprietà ottiche dei frutti interi e la loro texture durante 14 giorni di shelf life dopo un mese di conservazione refrigerata in aria.

## Materiali e Metodi

**Frutti.** Sono state analizzate mele 'Braeburn' di tre raccolte (R1, 26 settembre; R2, 3 ottobre; R3, 10 ottobre 2014) provenienti da un frutteto sperimentale di Laimburg (Bolzano). Dopo circa 30 giorni a 1,3°C in aria, 90 frutti/raccolta sono stati misurati su due lati opposti con TRS a 670 nm e ordinati all'interno di ciascuna raccolta secondo il valore (media dei due lati per ciascun frutto) di  $\mu_{a670}$  decrescente (maturazione crescente) e randomizzati in 3 set di 30 mele rappresentativi dell'intero range di  $\mu_a$  di ciascuna raccolta e corrispondenti a 1, 7 e 14 giorni di shelf life a 20°C.

**Analisi sui frutti.** Le mele di ogni set sono state misurate con TRS a 580, 670, 730, 780, 830, 970 e 1064 nm. Per ciascun frutto sono stati misurati con un calibro digitale i diametri in corrispondenza delle zone di misura TRS, e sono state analizzate le proprietà meccaniche misurate in modo non distruttivo (compressione del frutto intero, Instron UTM, deformazione di 1 mm a 25 mm/min) e in modo distruttivo attraverso l'acquisizione contemporanea del profilo meccanico ed acustico mediante misura penetrometrica (puntale  $\varnothing$  11 mm, 3,33 mm/s, 8 mm di profondità) abbinata a un rilevatore acustico (TA-XT plus Texture Analyzer con AED, Stable Microsystem) con valore cut off di frequenza a 3,125 kHz. Dalle curve forza-deformazione ottenute con la compressione è stato calcolato il modello di deformabilità ( $E_d$ ) [13] secondo l'equazione:

$$\frac{E_d}{1-\mu^2} = \frac{F}{(d_L/2)^{3/2} D^{1/2}}$$

in cui F è la forza a 1 mm di compressione (N),  $d_L$  è la deformazione totale (mm), D è il diametro del frutto (mm) e  $\mu$  è il rapporto di Poisson. Dato che in questo lavoro non è stato misurato il rapporto di Poisson, si è deciso di fissare il suo valore a 0,3 [14].

Dai profili meccanici ed acustici ottenuti con la misura penetrometrica sono stati rilevati 3 parametri meccanici: durezza ( $F_{max}$ , valore massimo della forza negli 8 mm), stiffness ( $St$ , pendenza della curva di deformazione misurata da 0 a 2 mm) e work ( $W$ , area totale sottesa dal profilo meccanico tra 0 e 8 mm) e 5 parametri acustici: numero totale di eventi acustici (COUNT), valore massimo di frequenza tra i picchi acustici (acMAX), lunghezza del profilo acustico (LD), valore medio di frequenza del suono (MEAN) e frequenza del suono in corrispondenza di  $F_{max}$  (acFmax). I frutti sono stati poi sottoposti ad analisi sensoriale (descrittori duro, succoso, farinoso, croccante) seguendo la metodologia riportata da Rizzolo et al. [12], e sono stati valutati per la percentuale degli spazi intercellulari (RISV) secondo il metodo di Baumann e Henze [15].

**Analisi TRS.** Sono state condotte utilizzando un sistema portatile compatto che lavora a lunghezze d'onda discrete sviluppato al Politecnico di Milano [6, 16]. I dati TRS sono stati interpolati con un modello fisico per la propagazione della luce in mezzi diffondenti [17], approssimando la geometria

della mela ad un parallelepipedo in cui le dimensioni X- e Z- sono state fissate a 10 cm per tutte le mele, mentre la dimensione Y- è specifica per ciascun frutto e corrisponde al raggio di ciascun frutto. Il coefficiente di scattering  $\mu'_s$  è stato calcolato come media dei valori di  $\mu'_s$  ottenuti a 730, 780 e 830 nm, dato che non c'erano evidenze di una dipendenza di  $\mu'_s$  dalla lunghezza d'onda. Le concentrazioni di clorofilla (CHL) e di acqua (H<sub>2</sub>O) sono state determinate considerando la relazione lineare esistente tra lo spettro di assorbimento del frutto e il loro contenuto secondo l'equazione:

$$\mu_a(\lambda) = \sum_i c_i \varepsilon_i(\lambda) = c_{CHL} \varepsilon_{CHL}(\lambda) + c_{H_2O} \varepsilon_{H_2O}(\lambda) + bkg$$

in cui  $c_{CHL}$  e  $c_{H_2O}$  sono le concentrazioni di clorofilla e acqua,  $\varepsilon_{CHL}$  e  $\varepsilon_{H_2O}$  sono i coefficienti di assorbimento specifici di clorofilla e acqua, e  $bkg$  è un valore costante per compensare il contributo di altri cromofori.

*Analisi statistica.* Considerando i punteggi di intensità sensoriale, i frutti sono stati suddivisi o in cinque classi di intensità [ $\leq 20$ : molto bassa (VL); 21-39: bassa (L); 40-59: media (M); 60-80: alta (H);  $> 80$ ; molto alta (VH)] separatamente per ciascun attributo, o raggruppati tramite Analisi dei Cluster (Ward's clustering method, Euclidean distance) in tre cluster ciascuno relativo ad uno specifico profilo sensoriale. I dati TRS relativi a  $\mu'_s$ , CHL e H<sub>2</sub>O e i dati delle proprietà meccaniche ed acustiche e dei RISV sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) considerando come fattore o la classe di intensità per ciascun attributo sensoriale o il cluster di appartenenza e le medie sono state confrontate con il test di Bonferroni ( $P \leq 0.05\%$ ). I dati TRS relativi a  $\mu'_s$ , CHL e H<sub>2</sub>O sono stati utilizzati come variabili esplicative nell'analisi discriminante lineare per sviluppare modelli di classificazione che discriminassero i frutti o in base alla classe di intensità per ciascun attributo sensoriale o in base al profilo sensoriale. La capacità discriminativa dei modelli è stata valutata confrontando la percentuale di frutti correttamente classificati.

## Risultati e Discussione

*Analisi dei Cluster.* Con l'analisi dei cluster si sono differenziati tre profili sensoriali (Tabella 1). Il profilo W1 corrisponde a mele tenere, non succose, di *texture* farinosa, caratterizzate dai valori minori dei parametri meccanici, acustici e maggiori di RISV (Tabella 2); il profilo W3 corrisponde a mele molto dure e succose con *texture* croccante, caratterizzate dai valori maggiori dei parametri meccanici e acustici e dal più basso valore di RISV; il profilo W2 è di *texture* intermedia rispetto agli altri due profili, e raggruppa mele mediamente dure, croccanti e succose e piuttosto farinose che presentano valori intermedi dei parametri meccanici, acustici e di RISV. La *texture* croccante (profilo W3) è preponderante all'inizio della shelf life, specie nei frutti R1 per i quali rappresenta il 90% delle mele del set; la *texture* intermedia (profilo W2) è maggiormente rappresentata (50-54% dei frutti) a 7 giorni di shelf life nei frutti R1 e R2, mentre la *texture* farinosa (profilo W1) si sviluppa con la shelf life e dopo 14 giorni è caratteristica di circa il 40% delle mele R1, il 60% delle R2 e circa l'80% dei frutti R3.

*Proprietà ottiche TRS.* Gli spettri medi di assorbimento mostrano due massimi principali: uno a 670 nm, in corrispondenza del picco di assorbimento della clorofilla-a, e l'altro a 980 nm corrispondente al picco dell'acqua (Figura 1). Le mele di *texture* croccante (profilo W3) sono

Tabella 1- Texture sensoriali, valore dei centroidi per ciascun attributo e numero di frutti ( $N_{obs}$ )

Cluster	Texture	duro	succoso	farinoso	croccante	$N_{obs}$
W1	Farinose, tenere e non succose	28,28	25,30	77,12	19,44	88
W2	dure/croccanti/succose e piuttosto farinose	45,42	37,81	51,03	31,15	84
W3	Croccanti, molto dure e succose	65,68	57,78	26,36	54,65	98

Tabella 2- Parametri meccanici, acustici e RISV in funzione del profilo sensoriale. Per ogni parametro a lettere diverse corrispondono medie statisticamente differenti (test di Bonferroni 95%)

Cluster	$E_d$ (N/mm <sup>2</sup> )	Fmax (N)	St (N/mm)	W (N.mm)	COUNT	acMAX (V)	LD (V)	MEAN (V)	acFmax (V)	RISV (%)
W1	10,5 c	44,1 c	14,1 c	263 c	8,8 c	0,010 c	2,4 c	0,0003 c	0,0012 c	18,7 a

W2	11,6 b	53,7 b	16,8 b	317 b	27,0 b	0,024 b	2,6 b	0,0032 b	0,0066 b	17,8 b
W3	14,3 a	67,8 a	20,9 a	400 a	65,0 a	0,048 a	3,2 a	0,0092 a	0,0162 a	16,8 c

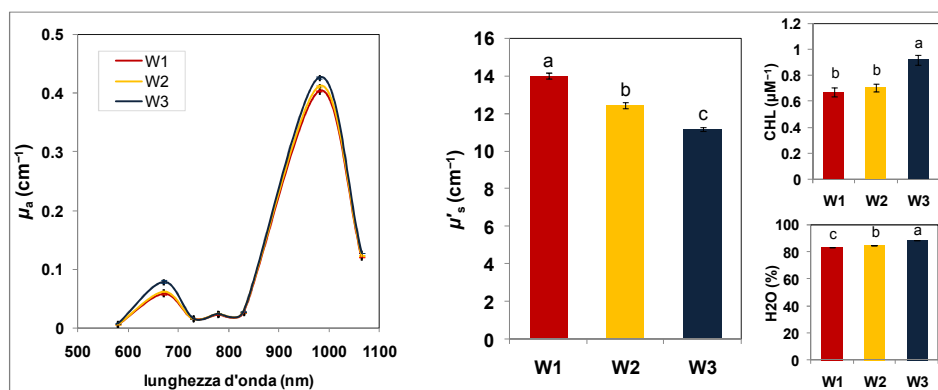


Figura 1- Spettri TRS di assorbimento ( $\mu_a$ ), scattering ( $\mu'_s$ ) e contenuto di clorofilla (CHL) e acqua ( $H_2O$ ) di mele 'Braeburn' di texture farinosa (W1), intermedia (W2) e croccante (W3). A lettere diverse corrispondono medie statisticamente differenti (test di Bonferroni 95%).

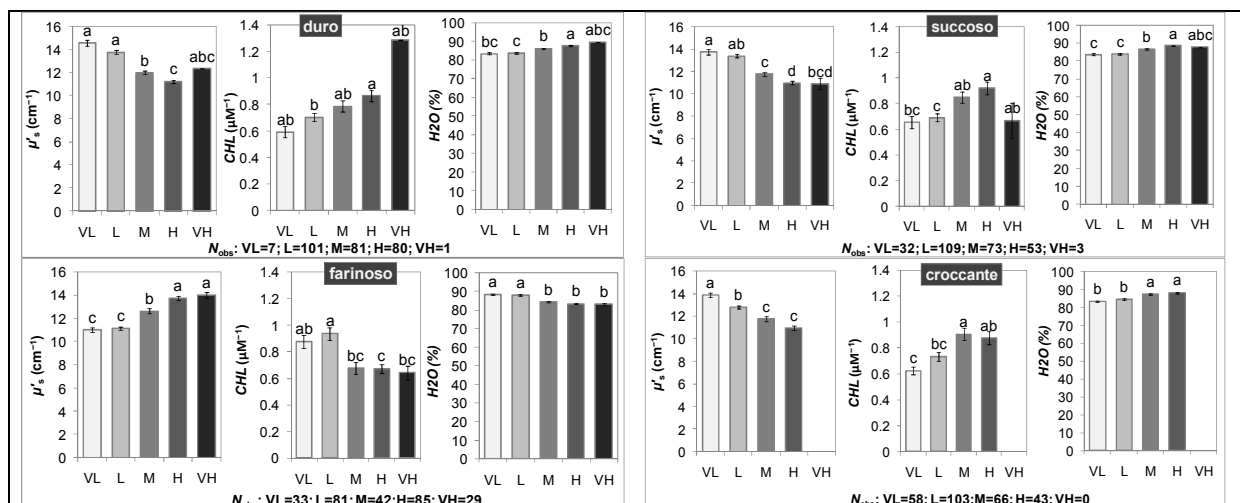


Figura 2 - Scattering ( $\mu'_s$ ), contenuto di clorofilla (CHL) e acqua ( $H_2O$ ) e numero dei frutti ( $N_{obs}$ ) raggruppati nelle cinque classi di intensità per gli attributi duro, succoso, farinoso e croccante. A lettere diverse corrispondono medie statisticamente differenti (test di Bonferroni 95%)

caratterizzate da valori maggiori di CHL e  $H_2O$  e minori di  $\mu'_s$ , i frutti di texture farinosa (profilo W1) hanno valori minori di CHL e  $H_2O$  e maggiori di  $\mu'_s$ , mentre le mele di texture intermedia (profilo W2) presentano un valore di CHL uguale al profilo W1, ma valori intermedi di  $H_2O$  e  $\mu'_s$ . Per quanto riguarda i diversi livelli di intensità percepiti sensorialmente, si osservano valori minori di  $\mu'_s$  per i frutti della classe H per i descrittori duro, succoso e croccante e per le classi VL e L per il descrittore farinoso (Figura 2), come pure valori maggiori di CHL e  $H_2O$  per la classe H per i descrittori duro, succoso e croccante e per le classi VL e L per il descrittore farinoso. I dati ottenuti nel presente lavoro confermano che i frutti di mele 'Braeburn' di texture farinosa sono caratterizzati da valori di scattering maggiori,  $\mu_a670$  (CHL) e  $\mu_a980$  ( $H_2O$ ) minori rispetto ai frutti di texture croccante [10]. Inoltre i dati di  $\mu'_s$  indicano che i frutti raggruppati nelle categorie di intensità dei parametri sensoriali come pure nei profili sensoriali ottenuti con l'analisi dei cluster hanno la polpa caratterizzata da centri scatteranti di dimensione uguale ma di densità differente, minore per i frutti di texture dura, croccante e maggiore per i frutti di texture farinosa [6,10,12].

**Modelli di classificazione.** Le proprietà ottiche misurate con il TRS ( $\mu'_s$ , CHL e  $H_2O$ ) sono state usate come variabili esplicative per i modelli di classificazione relativi ai profili sensoriali e alle classi di intensità per ciascun attributo sensoriale. Per quanto riguarda i profili sensoriali, la funzione discriminante (96,75% della varianza, correlazione canonica 0,688,  $P < 0.0001$ ) ha permesso di classificare correttamente il 73% dei frutti W1 (texture farinosa), l'85% dei frutti W3

(*texture* croccante) e il 49% dei frutti W2 (*texture* intermedia), con una percentuale di casi classificati correttamente dal modello del 70%. Le funzioni discriminanti dei modelli di classificazione ottenuti per i singoli attributi sensoriali hanno correlazioni canoniche significative tra 0,59 (croccante) e 0,74 (farinoso), con percentuali di casi classificati correttamente tra 50% (croccante) e 61% (duro), anche se più del 70% delle mele appartenenti alle classi molto o poco farinose e delle mele molto o poco dure sono classificate correttamente (Tabella 3).

Tabella 3 – Risultati dell’analisi discriminante (fondo grigio), tabella di classificazione e percentuale dei casi classificati correttamente dal modello per i descrittori duro, succoso, farinoso e croccante. Le percentuali di frutti classificati correttamente in ogni classe di intensità sono riportate in grassetto.

DURO						SUCCOSO							
VH	H	M	L	VL		VH	H	M	L	VL			
VH	<b>100</b>	0	0	0	0	VH	<b>0</b>	0	100	0	0		
H	0	<b>71,3</b>	16,2	12,5	0	H	0	<b>56,5</b>	32,1	11,3	0		
M	0	38,3	<b>29,6</b>	32,1	0	M	0	24,7	<b>37,0</b>	38,3	0		
L	0	5,9	11,9	<b>82,2</b>	0	L	0	4,6	15,6	<b>79,2</b>	0		
VL	0	0	0	100	<b>0</b>	60,7	VL	0	6,2	6,3	87,5	<b>0</b>	53,3
Varianza 96,95%, correlazione canonica 0,627, P<0,0001						Varianza 98,15%, correlazione canonica 0,639, P<0,0001							
FARINOSO						CROCCANTE							
VH	H	M	L	VL		H	M	L	VL				
VH	<b>0</b>	89,7	0	10,3	0	H	<b>25,6</b>	53,5	20,9	0			
H	0	<b>84,7</b>	2,3	12,9	0	M	9,1	<b>47,0</b>	39,4	4,5			
M	0	61,9	<b>7,1</b>	31,0	0	L	2,9	15,5	<b>70,9</b>	10,7			
L	0	9,9	2,5	<b>87,6</b>	0	VL	3,4	5,2	56,9	<b>34,5</b>	50,0		
VL	0	3,0	3,0	94,0	<b>0</b>	54,1	Varianza 95,23%, correlazione canonica 0,592, P<0,0001						
Varianza 97,77%, correlazione canonica 0,740, P<0,0001													

## Conclusioni

I risultati della presente ricerca confermano che i differenti profili sensoriali relativi alla *texture* di mele ‘Braeburn’ sono strettamente legati a peculiari proprietà meccaniche ed acustiche della polpa, come pure alle proprietà ottiche di assorbimento e scattering misurate con il TRS. Le mele di *texture* farinosa sono risultate le più tenere e facilmente deformabili con una struttura poco compatta e sono state distinte dai modelli di classificazione basati sulle proprietà ottiche TRS sia come profilo sensoriale farinoso (73% dei casi corretti) sia per l’intensità dell’attributo farinoso (85% per la classe H e 88% per la classe L). Inoltre è stato anche evidenziato che ad elevati valori di  $\mu'_s$  corrispondono bassi valori dei parametri acustici, sottolineando, quindi, l’importanza dello scattering per la rilevazione non distruttiva della farinosità delle mele.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell’ambito del progetto “Monitoring key environmental parameters in the alpine environment involving science, technology and application (MONALISA)” finanziato dalla Provincia autonoma di Bolzano.

## Bibliografia

1. A.S. Szczesniak (2002) *Texture is a sensory property*. Food Quality and Preference, 13, 215-225.
2. A. Torricelli, L. Spinelli, D. Contini, M. Vanoli, A. Rizzolo, P. Eccher Zerbini (2008) *Time-resolved reflectance spectroscopy for non-destructive assessment of food quality*. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, 2, 82-89.
3. R. Cubeddu, C. D’Andrea, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli, G. Valentini, M. Ruiz-Altisent, C. Valero, C. Ortiz, C. Dover, D. Johnson (2001) *Time-resolved reflectance spectroscopy applied to the non-destructive monitoring of the internal optical properties of apples*. Applied Spectroscopy, 55, 1368-1374.
4. W. Saeys, M.A. Velazco-Roa, S.N. Thennadil, H. Ramon, B.M. Nicolai (2008). *Optical properties of apple skin and flesh in the wavelength range from 350 to 2200 nm*. Applied Optics, 47, 908-919.
5. M. Vanoli, M. Buccheri (2012) *Overview of the methods for assessing harvest maturity*. Stewart Postharvest Review 1, 4.

6. A. Rizzolo, M. Vanoli (2016) *Time-resolved technique for measuring optical properties and quality of food*. In: Light Scattering Technology for Food Property, Quality and Safety Assessment (R. Lu, ed.), CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 187-224.
7. A. Rizzolo, M. Vanoli, L. Spinelli, A. Torricelli (2010) *Sensory characteristics, quality and optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy in stored apples*. *Postharvest Biology and Technology*, 58, 1-12.
8. A. Zanella, M. Vanoli, A. Rizzolo, M. Grassi, P. Eccher Zerbini, R. Cubeddu, A. Torricelli, L. Spinelli (2013) *Correlating optical maturity indices and firmness in stored 'Braeburn' and 'Cripps Pink' apples*. *Acta Horticulturae*, 1012, 1173-1180.
9. B. Seifert, M. Zude, L. Spinelli, A. Torricelli (2014) *Optical properties of developing pip and stone fruit reveal underlying structural changes*. *Physiologia Plantarum*, 153, 327-336.
10. M. Vanoli, A. Rizzolo, M. Grassi, A. Torricelli, A. Zanella, Spinelli L. (2015). *Characterizing apple texture during storage through mechanical, sensory and optical properties*. *Acta Horticulturae*, 1079, 383-390.
11. M. Vanoli, P. Eccher Zerbini, L. Spinelli, A. Torricelli, A. Rizzolo (2009) *Polyuronide content and correlation to optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy in 'Jonagored' apples stored in normal and controlled atmosphere*. *Food Chemistry*, 115, 1450-1457.
12. A. Rizzolo, M. Vanoli, G. Bianchi, A. Zanella, M. Grassi, A. Torricelli, L. Spinelli (2014) *Relationship between texture sensory profiles and optical properties measured by time-resolved reflectance spectroscopy during post-storage shelf life of 'Braeburn' apples*. *Journal of Horticultural Research*, 22, 113-121.
13. P. Eccher Zerbini (1981) *Compression tests on intact Golden Delicious apples and correlation with other objective measures for quality evaluation*. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 14, 12-27.
14. A. Ahmadi, H. Bariklon, M. Kashfi (2016) *Viscoelastic finite element analysis of the dynamic behavior of apple under impact loading with regards to its different layers*. *Computers and Electronics in Agriculture*, 121, 1-11.
15. H. Baumann, J. Henze (1983) *Intercellular space volume of fruit*. *Acta Horticulturae*, 138, 107-112.
16. L. Spinelli, A. Rizzolo, M. Vanoli, M. Grassi, P. Eccher Zerbini, R.M. de Azevedo Pimentel, A. Torricelli (2012). *Optical properties of pulp and skin in Brazilian mangoes in the 540-900 nm spectral range: implication for non-destructive maturity assessment by time-resolved reflectance spectroscopy*. *Proceedings del 3° CIGR International Conference of Agricultural Engineering*, 8-12 luglio 2012, Valencia, Spagna, ISBN 84-615-9928-4.
17. F. Martelli, S. Del Bianco, A. Ismaelli, G. Zaccanti (2009). *Light Propagation through Biological Tissue and Other Diffusive Media: Theory, Solution, and Software*. SPIE Press, Washington DC.



# NIRS – A UNIQUE WINDOW OF OPPORTUNITIES FOR THE FOOD INDUSTRY

**S.B. Engelsen**

*Chemometrics and Analytical Technology, Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 26, DK -1958 Frederiksberg C, Denmark*

## Summary

The world of analytical instruments for food analysis is continuously expanding. Complex and hyper-sensitive, as well as selective, analytical instruments have become available, not only to researchers, but also to industrial users in quality control. Common to all these advanced analytical instruments is that they are destructive, use biased sample protocols and instrumental settings, and, last but not least, the sample volume that is measured is very small compared to heterogeneity and volumes of the target sample streams typically encountered in the food industry. Quite uniquely, these problems are not an issue for near infrared (NIR) spectroscopy [1]. The “calorific rays” in the NIR spectral region are in the high-energy region between the excessive molecular (Rayleigh) scattering in UV-VIS and the excessive molecular extinction coefficients in the mid infrared – this has been called the scatter-absorbance valley [2]. This means that NIR spectroscopy has the best conditions for sampling large heterogeneous sample amounts, and accordingly representative sampling issues are greatly reduced which in turn makes NIRS the best possible technology for probing the bulk chemistry of large sample volumes.

NIR spectroscopy can be considered as the ugly duckling amongst spectroscopies that has turned into a swan and revolutionized quality control in practically all areas of food, agricultural and pharmaceutical production. The key to this success of NIR spectroscopy is the extraordinary synergy that lies in the merging with the multivariate data technology called chemometrics. More recently, NIR spectroscopy have become a key sensor technology in Process Analytical Technology (PAT) [3] which in turn represents a silent revolution in industrial quality control by introducing real-time process monitoring through fingerprinting of complex process streams using spectroscopic sensors and thereby moving from inferential monitoring and control towards 100% process control of core quality parameters.

Currently we are on the edge of a new revolution in NIR technology where the fibre-friendly nature of NIR spectroscopy takes advantage of the fact that laser and fibre technologies are continuously being developed and improved (supercontinuum lasers, up-conversion and fiber-spectrometers). This paper will explain some of the unique features and developments of NIR spectroscopy by using examples primarily from the food industry and food science areas.

## References

- [1] Rinnan, Å. and Engelsen, S.B., The shining future of NIR spectroscopy in plant phenomics, crop sorting and biofuel production, *NIR news* 27(1):20-23 (2016).
- [2] Engelsen, S.B., Near Infrared Spectroscopy – a unique window of opportunities, *NIR news* 27(5):14-17 (2016).
- [3] Skibsted, E. and Engelsen, S.B., Fundamentals of Spectroscopy: Spectroscopy for Process Analytical Technology (PAT). In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* (Eds. J. Lindon, G. Tranter and D. Koppenaal), 2nd edition, Vol. 3, Oxford, Elsevier, Oxford, UK (2010), ISBN: 978-0-12-374417-3, pp. 2651–2661.

# MONITORAGGIO DI PROCESSO NELLA PRODUZIONE DI POLIMERI: FUSIONE DI DATI SPETTROSCOPICI NIR E VARIABILI DI PROCESSO

L. Strani<sup>1,2</sup>, E. Mantovani<sup>3</sup>, F. Bonacini<sup>3</sup>, F. Marini<sup>2</sup>, M. Cocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept of Chemical and Geological Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi, 103, 41125 Modena, Italy*

<sup>2</sup>*Dept of Chemistry, University of Roma La Sapienza, P.le A. Moro 5, 00185 Roma, Italy.*

<sup>3</sup>*Basic Chemical & Plastics Research Centre, Versalis-ENI, Via Taliercio 14, 46100 Mantova, Italy.*

## Riassunto

Centinaia di sensori monitorano costantemente la produzione ma non è comune un uso esteso/efficiente dell'enorme quantità di dati raccolti, utilizzati in genere per ottenere carte di controllo univariate relative al monitoraggio di un comparto/parametro alla volta, nonostante l'analisi multivariata potrebbe offrire un enorme vantaggio nella comprensione, monitoraggio e controllo del processo.

Nel controllo di produzione sono impiegate analisi off-line sul prodotto finito nonostante la loro frequenza non sia adatta per il monitoraggio in tempo reale. Così, i settaggi d'impianto sono impostati in base all'esperienza dei responsabili di produzione, al fine di mantenere la variabilità dell'impianto entro limiti fissati. La loro modifica ha luogo quando, secondo le analisi di laboratorio, si riscontra una deviazione dalla condizione di normale funzionamento.

Viceversa, è vantaggioso disporre di sensori/modelli in grado monitorare la qualità in tempo reale. In effetti, la qualità del prodotto dipende dalle condizioni di processo, e le informazioni provenienti dai sensori di processo (misuratori di portata, termocoppie, ecc.) permetterebbero di catturarne la struttura di correlazione e l'impatto sulle caratteristiche dei prodotti. In altre parole, la qualità della produzione può essere estrapolata dall'analisi delle variabili di processo. Inoltre, l'integrazione con sensori spettroscopici che monitorino gli intermedi di produzione può migliorare notevolmente la stima della qualità del prodotto in uno stadio precoce che consenta la ridefinizione di condizioni operative normali. Questa presentazione concerne il monitoraggio di processo multivariato per un processo continuo (produzione di polimeri stirenici) a più stadi: dissoluzione, reazione e raffinazione; dove è stata installata una sonda NIR per controllare la fase di reazione. Tre sono gli indici principali di qualità valutati mediante analisi off-line. L'analisi multivariata ha consentito: la comprensione della struttura di correlazione del processo; il monitoraggio della qualità attraverso data fusion delle informazioni provenienti dai sensori di processo con i dati NIR e la calibrazione delle variabili di qualità.

## CONFRONTO TRA TECNOLOGIA UV-VIS E NIR PER LA DETERMINAZIONE IN CONTINUO DEI TEMPI DI RESIDENZA IN ESTRUSORE

Alessandro Corradini, Francesco Bonacini, Erik Mantovani

*Centro Ricerche, Versalis (Eni), Via Taliercio, 14 – 46100 Mantova*

### Riassunto

La conoscenza della distribuzione dei tempi di residenza (RTD) di un polimero, o altro materiale, in un estrusore è importante per meglio ottimizzare le condizioni macchina (temperature, portate, profilo della vite) in fase di miscelazione di più materiali o nel caso di estrusioni reattive.

Il seguente lavoro presenta un confronto tra la più classica tecnologia visibile e quella NIR nella stima del RTD.

La misura del RTD viene effettuata direttamente *in-line* utilizzando sonde di misura montate direttamente sulla testa dell'estrusore e collegate con fibre ottiche agli spettrometri UV-VIS e NIR.

Per le misure con spettroscopia UV-VIS è stato utilizzato come polimero un polistirene e come tracciante un colorante, mentre per le prove con tecnologia NIR si è utilizzato come polimero del polietilene e come tracciante del polistirene.

Per entrambe le tecniche la sperimentazione si prefiggeva due obiettivi: l'utilizzo del minor quantitativo possibile di tracciante per influenzare al minimo le proprietà della matrice e la più alta frequenza di acquisizione spettrale per ottenere un più definito profilo di RTD.

## SPETTROSCOPIA NIR PER IL MONITORAGGIO DEI PROCESSI ALIMENTARI

Cristina Alamprese, Silvia Grassi, Ernestina Casiraghi

*DeFENS Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2  
- Milano*

### Riassunto

La spettroscopia NIR (NIRS) è di grande interesse per le industrie alimentari perché può facilitare il monitoraggio rapido e non distruttivo dei processi di produzione, contribuendo a migliorare la qualità dei prodotti, a ridurre le tempistiche della produzione e a prevenire scarti di lavorazione. Lo scopo del presente lavoro è quello di fornire spunti sulla possibile applicazione della NIRS nel monitoraggio di processi alimentari, illustrando alcuni *case-study*.

Durante la fase di fermentazione dello yogurt, l'applicazione della PCA agli spettri FT-NIR ha permesso di rivelare le modificazioni molecolari che avvengono a carico della matrice. I punteggi della PC1, i dati reologici e quelli di alcuni parametri tradizionali sono stati modellati in funzione del tempo di fermentazione per rilevare i punti critici del processo. La FT-NIRS è stata efficacemente implementata al controllo della fermentazione della birra, insieme alla determinazione di parametri convenzionali. I risultati della PCA hanno dimostrato che è possibile seguire l'evoluzione della biomassa e delle modificazioni chimiche.

Per dimostrare il potenziale della FT-NIRS nel monitoraggio della stagionatura dei salami, i punteggi della PC1 ottenuti dalla PCA degli spettri sono stati modellati in funzione della durata del processo, insieme a calo peso e *texture*. La FT-NIRS si è rivelata in grado di descrivere la stagionatura nel suo complesso, fornendo risultati simili a quelli ottenuti dalla valutazione dei singoli parametri di qualità, con il vantaggio di essere decisamente più veloce.

La FT-NIRS è stata poi applicata *in-line* durante la lievitazione di impasti destinati alla produzione di panettone. L'andamento dei punteggi delle prime tre PC è stato valutato in funzione del tempo di lievitazione, dimostrando che la FT-NIRS è in grado di descrivere le modificazioni che avvengono a carico dell'impasto.

Nel loro complesso, i risultati ottenuti dimostrano che la FT-NIRS è un valido strumento per un efficace ed efficiente monitoraggio in tempo reale dei processi alimentari.

# APPROCCI CHEMIOMETRICI AVANZATI PER L'AUTENTICAZIONE DI ALIMENTI E FARMACI ATTRAVERSO LA SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO.

Federico Marini\*

Dip. Chimica, Università di Roma La Sapienza, P.le Aldo Moro 5, I-00185 Roma, Italia

Presenting Author

\*federico.marini@uniroma1.it

## **Riassunto**

Le questioni relative al controllo di qualità e alla verifica delle tipicità e della genuinità dei prodotti svolgono un ruolo importante all'interno della chimica degli alimenti. Dal punto di vista analitico, dato che diversi fattori possono determinare la qualità di un alimento, gli approcci per l'autenticazione dei prodotti si stanno sempre più dirigendo verso l'utilizzo di uno o, meglio, più tecniche di fingerprinting che permettano una caratterizzazione delle merci rapida, spesso non distruttiva e, possibilmente, olistica delle merci. Tuttavia, la complessità delle matrici alimentari fa sì che spesso i segnali registrati siano influenzati dal contributo di diverse fonti di variabilità, non sempre legate alle informazioni richieste.

In questa comunicazione, saranno presentati alcuni approcci chemiometrici innovativi per risolvere i problemi di caratterizzazione ed autenticazione dei prodotti alimentari. Queste strategie consentono da un lato di ottenere informazioni dettagliate sull'effetto di possibili fonti di variabilità sui segnali sperimentali e dall'altro di costruire modelli matematici affidabili anche nei casi in cui la presenza di queste fonti di variabilità possa comportare la necessità di costruire modelli matematico-statistici di elevata complessità.

Infine, verrà affrontata la possibilità di ottenere una caratterizzazione quanto più olistica possibile degli alimenti di interesse tramite strategie di fusione dati – che permettano l'integrazione dei profili ottenuti con diverse tecniche strumentali.

Considerazioni analoghe possono essere estese al caso del controllo di qualità dei prodotti farmaceutici, che sarà anche affrontato nella comunicazione.

## **Introduzione**

Le tematiche legate al controllo della qualità delle merci, considerata anche l'ampia accezione rivestita dal concetto stesso di qualità (sicurezza d'uso, assenza di alterazioni/adulterazioni, genuinità, autenticità, capacità di soddisfare il consumatore), rappresentano la maggior parte delle problematiche merceologiche d'interesse sia in ambito alimentare che in ambito farmaceutico. Dal punto di vista analitico, la compresenza di molteplici fattori che concorrano a definire il complesso delle caratteristiche qualitative di una merce si traduce nella necessità di una caratterizzazione della merce stessa che sia quanto più olistica possibile. In questo contesto, la ricerca sempre crescente di approcci che siano in accordo con i paradigmi della green chemistry, ovvero della possibilità di operare in maniera quanto più possibile solvent-free e con metodi rapidi, economici e, soprattutto, non-invasivi/non-distruttivi, fa delle tecniche spettroscopiche (in particolare, nella regione dell'infrarosso) lo strumento d'elezione per affrontare i problemi di autenticazione delle merci. Tuttavia, in ambito alimentare e farmaceutico, la complessità delle matrici in esame, unita alla limitata selettività delle tecniche spettroscopiche, fa sì che spesso i segnali registrati siano influenzati dal contributo di diverse fonti di variabilità, non sempre legate alle informazioni richieste.

Sulla base di queste considerazioni, nella presente comunicazione, saranno presentati alcuni approcci chemiometrici innovativi per risolvere i problemi di caratterizzazione ed autenticazione dei prodotti alimentari e farmaceutici. Da un lato, saranno descritte strategie che permettano di ottenere informazioni dettagliate sull'effetto di possibili fonti di variabilità sui segnali sperimentali, attraverso l'elaborazione multivariata di dati raccolti secondo un opportuno disegno sperimentale. Dall'altro, sarà mostrato come sia possibile costruire modelli matematici affidabili anche nei casi in cui la presenza delle suddette fonti di variabilità possa comportare la necessità di ricorrere ad approcci più complessi della “semplice” relazione lineare tra i predittori e le risposte d'interesse. Infine, verrà affrontata la possibilità di ottenere una caratterizzazione quanto più olistica possibile dei prodotti in esame tramite strategie di fusione dati – che permettano l'integrazione dei profili ottenuti con diverse tecniche strumentali.

## Materiali e Metodi

In questa comunicazione saranno presentati diversi esempi tratti dalle ricerche recenti dell'autore. Dal punto di vista strumentale, tutti i campioni sono stati analizzati con uno spettrometro NIR a trasformata di Fourier Thermo Nicolet 6700 equipaggiato con una sfera integratrice ed un rivelatore InGaAs, raccogliendo 82 scansioni nell'intervallo 4000-10000  $\text{cm}^{-1}$  alla risoluzione nominale di 4  $\text{cm}^{-1}$ . Di seguito, sono riportate le caratteristiche delle diverse matrici alimentari e farmaceutiche analizzate.

*Pasta.* Campioni di pasta sono stati preparati nel nostro laboratorio, mescolando farina di grano duro, uova e, quando necessario per migliorare la lavorazione della pasta, acqua. L'impasto è quindi stato tagliato per ottenere la forma desiderata (fettuccine) e i campioni sono stati essiccati in forno a temperatura controllata. Siccome eravamo interessati a sviluppare un metodo affidabile per la quantificazione del contenuto di uovo, i campioni sono stati preparati a diverso contenuto percentuale di uova (20.25%, 22.53%, 25.15%, 27.00%, 29,92%, 33,50%), nell'intervallo di valori normalmente utilizzato dai produttori industriali.

Allo stesso tempo, per verificare l'effetto dei fattori produttivi sul segnale sperimentale, diversi tempi di essiccazione (4, 6 e 8 ore) e temperature (40, 52, e 65? C) sono stati utilizzati per la preparazione, secondo un disegno fattoriale completo multi-livello.

*Caffè.* Trenta campioni (circa 80 g ciascuno) di chicchi di caffè verde (20 Arabica e 10 Robusta) provenienti da diverse origini geografiche sono stati gentilmente forniti dall'Agenzia delle Dogane italiana. Ogni campione è stato tostato in laboratorio a differenti condizioni, in modo da riprodurre il più fedelmente possibile il processo industriale. In particolare, sulla base di alcuni esperimenti preliminari e della letteratura, si è deciso di lavorare ad una temperatura fissa di 180 ° C e considerare il tempo di tostatura come unico fattore da controllare (a quattro livelli: 0 min – ovvero, caffè verde, 25 min, 50 min e 75 min).

*Birra.* 60 campioni di birra provenienti da diversi produttori sono stati raccolti per lo studio. In particolare, 31 campioni provenivano da Birra del Borgo (Borgorose, Italia), il birrifico artigianale di interesse e i restanti 29 erano rappresentativi di diversi produttori in Italia e nel resto d'Europa. Delle 31 birre da Birra del Borgo, 19 campioni sono stati di "Reale" che è considerata la birra di bandiera del birrifico e la cui autenticazione è stato lo scopo principale della ricerca, mentre gli altri 12 erano rappresentativi del resto della loro produzione.

*L-Dopa.* Sono state preparate, a partire dal solido racemico e dall'enantiomero puro (L-DOPA), 33 miscele a composizione nota e differente che coprissero l'intero intervallo di eccesso enantiomerico. Queste miscele sono state, successivamente, separate in due gruppi: il primo, contenente 21 campioni, per la costruzione e l'ottimizzazione del modello e per la scelta del pretrattamento spettrale più adatto (“training set”); il secondo, contenente 11 campioni, per

verificare la capacità predittiva (e quindi l'affidabilità) del modello ottenuto su campioni incogniti nella fase di validazione esterna ("test set").

## Risultati e Discussione

*Pasta.* La ricerca [1] ha avuto come oggetto la possibilità di sviluppare un metodo che consentisse di determinare in maniera rapida, semplice ed economica il contenuto di uovo in pasta all'uovo secca, usando la spettroscopia nel vicino infrarosso accoppiata alla chemiometria. Tuttavia, siccome è molto probabile che l'impronta digitale spettroscopica possa essere influenzata dalle caratteristiche del processo di fabbricazione del prodotto, in particolare, dalla temperatura e dalla durata dell'essiccazione, l'effetto del processo di lavorazione sul profilo spettrale di campioni di pasta all'uovo è stato oggetto di studi approfonditi, utilizzando un disegno sperimentale fattoriale accoppiato ad una tecnica analitica esplorativa multivariata chiamata ANOVA-Simultaneous Component Analysis (ASCA). L'utilizzo di ASCA ha dimostrato che tutti e tre i fattori (tempo, temperatura e tenore di uovo) e un'interazione binaria (temperatura/concentrazione) hanno un effetto statisticamente significativo sul segnale. In particolare, è stato evidenziato come la regione intorno a 1400 nm e gli intervalli 1600-1700, 1800-2000 e 2200-2400 nm siano le frequenze spettrali più interessate. Successivamente, l'uso di un metodo localmente lineare, ovvero locally weighted PLS (LWR-PLS), per costruire un modello di calibrazione per la quantificazione del contenuto di uovo, ha permesso di affrontare le possibili non linearità derivanti, per esempio, dall'interazione tra la concentrazione e la temperatura evidenziata da ASCA. Infatti, l'uso di LWR-PLS ha portato ad un'ottima capacità predittiva, valutata su un test set esterno (assenza di errore sistematico e RMSEP = 1.25) significativamente migliore di quella risultante dall'utilizzo di un modello globalmente lineare, come PLS (RMSEP > 1.7) o da altri lavori di letteratura.

*Caffè.* In questo studio [2], si è investigata la possibilità di verificare i cambiamenti indotti sui chicchi di caffè da differenti condizioni di tostatura. In particolare, dal momento che sono stati analizzati campioni dalle due principali specie di interesse commerciale, Arabica e Robusta, è stato anche possibile verificare se ci potessero essere delle differenze nel comportamento di torrefazione delle due varietà. L'elaborazione dei NIR dati con l'analisi ASCA ha permesso di affermare che sia il fattore "specie" e che quello "tempo di torrefazione", e la loro interazione binaria influenzino significativamente il profilo spettrale. In particolare, nel caso di tempo di tostatura (anche tenendo in considerazione l'interazione) sono state evidenziate due principali tendenze longitudinali: quella principale (che dà conto di quasi tutta la varianza osservata) corrispondente ad una variazione monotona, cioè un impoverimento o arricchimento progressivo in sostanze specifiche man mano che aumenti il tempo di tostatura, e un secondo contributo minore, che potrebbe essere ascritto alla formazione di intermedi.

Avendo verificato un effetto significativo della specie sul fingerprint strumentale, nell'ultima parte della ricerca è stata affrontata la possibilità di costruire modelli di classificazione per l'autenticazione dell'origine varietale dei campioni di caffè. Utilizzando l'approccio discriminante (PLS-DA), il miglior pretrattamento (derivata prima) ha portato ad un tasso di previsione corretta sul test set esterno del 100% per i campioni Arabica e di 95% per i Robusta. D'altra parte, quando si è applicato un approccio modellante (utilizzando SIMCA), i valori di sensibilità e specificità ottenuti per entrambe le classi (con SNV + derivata prima nel miglior pretrattamento) sono risultati molto elevati (92.5% e 95.8%, rispettivamente, per Arabica e 76.7% e 95.5% per Robusta in validazione esterna).

*Birra.* In questo studio [3], si è voluto dimostrare il potenziale di un approccio di fingerprinting strumentale multiplatforma mediante termogravimetria e quattro tecniche spettroscopiche (MIR, NIR, UV e VIS) per caratterizzare una birra artigianale italiana ad alto valore aggiunto (Reale di Birra del Borgo) e differenziarla da altri concorrenti di qualità inferiore. In particolare, è stato dimostrato come l'autenticazione della birra Reale possa essere effettuata con un'accuratezza

relativamente buona utilizzando ciascuna delle impronte digitali registrate per caratterizzare il campione. D'altra parte, è stato dimostrato anche che, considerando che in nessuno dei modelli individuali costruiti sui profili registrati con le diverse tecniche strumentali poteva permettere una perfetta classificazione di tutti i campioni, l'uso di una strategia di fusione dei dati porta ad un miglioramento significativo della capacità predittiva; in particolare, utilizzando la mid-level data fusion, che ha dimostrato di essere il miglior protocollo di fusione, è stato possibile ottenere il 100% corretta classificazione su tutte le birre sia del training che del test set.

*L-Dopa*. In questo lavoro è stata esplorata la possibilità di quantificare l'eccesso enantiomerico di un principio attivo chirale (L-DOPA, un precursore dei neurotrasmettitori dopamina, norepinefrina e epinefrina utilizzato nel trattamento del morbo di Parkinson) tramite spettroscopia nel vicino e medio infrarosso realizzando modelli di regressione tramite l'algoritmo PLS (Partial Least Squares). In particolare, si è proceduto in primo luogo calcolando i modelli individuali a partire dai dati delle singole tecniche (ottenendo quindi un modello per il vicino infrarosso e un altro modello per il medio infrarosso) e, successivamente, integrando le informazioni presenti nei due blocchi tramite una tecnica di fusione dei dati spettrali (la Mid Level Data Fusion), ovvero costruendo un unico modello di regressione partendo dagli scores estratti dalle due matrici dei dati.

Per gli spettri registrati al MIR, il pretrattamento ideale è risultato essere l'applicazione della derivata prima ed SNV (un algoritmo di riduzione del rumore spettrale) allo spettro trasformato in assorbanza: per quanto riguarda il NIR, l'applicazione della derivata seconda allo spettro trasformato in pseudo-assorbanza ha dato risultati molto promettenti.

Infine si è voluto migliorare ulteriormente i risultati ottenuti applicando ai due modelli di regressione un algoritmo di Data Fusion, con lo scopo di ottenere un modello di predizione realizzato a partire dai dati di entrambe le tecniche. In questo lavoro la tecnica di Data Fusion utilizzata è stata il "Mid Level", che consiste nella realizzazione del modello a partire da una matrice di dati ottenuta concatenando gli scores dei modelli delle singole tecniche piuttosto che utilizzando gli spettri tal quali. I risultati ottenuti mostrano precisione e affidabilità superiori alle singole tecniche, a dimostrazione dell'utilità di processi chemiometrici multisensoriali.

## Conclusioni

I risultati descritti in precedenza mostrano come approcci chemiometrici avanzati, accoppiati a tecniche strumentali rapide, economiche e non-invasive/non-distruttive, come la spettroscopia infrarossa, permettano di affrontare con successo problematiche anche molto complesse in ambito alimentare e farmaceutico.

## Bibliografia

1. M. Bevilacqua, R. Bucci, S. Materazzi, F. Marini (2013) *Application of near infrared (NIR) spectroscopy coupled to chemometrics for dried egg-pasta characterization and egg content quantification*. Food Chemistry, 140, 726-734.
2. S. De Luca, M. De Filippis, R. Bucci, A.D. Magrì, A.L. Magrì, F. Marini (2016) *Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics*. Microchemical Journal, 129, 348-361.
3. A. Biancolillo, R. Bucci, A.L. Magrì, A.D. Magrì, F. Marini (2014) *Data-fusion for multiplatform characterization of an Italian craft beer aimed at its authentication*. Analytica Chimica Acta. 820, 23-31.



# METODI CHEMIOMETRICI PER L'ASSOCIAZIONE FRA PREFERENZE DEI CONSUMATORI E NIR FINGERPRINT DI CAMPIONI DI BIRRA

N. Cavallini<sup>1,2</sup>, H. da Silva Friis<sup>2</sup>, R. Bro<sup>2</sup>, M. Cocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Chimiche e Geologiche, Università di Modena e Reggio Emilia, Via Campi 103 – 41125 Modena*

<sup>2</sup>*Department of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30- DK-1958 Frederiksberg C*

## Riassunto

La consapevolezza dei consumatori riguardo ai vari aspetti che concernono il consumo del cibo è aumentata fortemente negli ultimi anni. Questo ha portato alla nascita di ristoranti di nuova concezione così come a nuove tecniche di produzione alimentare e modi di gustare ed appaiare diversi prodotti alimentari, ponendo particolare attenzione sulla loro qualità. Il presente lavoro è parte di un progetto più ampio che si basa sull'idea fondamentale di utilizzare congiuntamente la chimica analitica e diversi metodi di analisi dei dati nella costruzione di nuovi strumenti che aiutino i consumatori nella scelta dei prodotti alimentari. Un primo esempio pratico, qui esplorato, riguarda la classificazione dei diversi tipi di birra al fine di valutare il collegamento tra l'informazione chimica analitica "oggettiva" e le preferenze "soggettive" del consumatore.

I dati analitici sono stati acquisiti su un set di un centinaio di campioni di birra diversi per marca, contenuto alcolico, lievito, tipologia, ecc. Nella prospettiva di un approccio *fingerprinting* sono stati registrati gli spettri <sup>1</sup>H-NMR e Vis-NIR, insieme agli spettri GC-MS e di fluorescenza. Sono stati inoltre raccolti i relativi dati sensoriali e le valutazioni dei consumatori.

In particolare questo lavoro riguarda l'analisi degli spettri Vis-NIR e dei relativi giudizi dei consumatori. Diversi metodi di preprocessing (SNV, derivazione ma anche utilizzando gli spettri grezzi) e tecniche di analisi esplorativa hanno permesso di evidenziare molti aspetti legati alle caratteristiche della birra.

Metodi di risoluzione multivariata (MCR, ad esempio) sono stati applicati a specifici intervalli spettrali al fine di estrarre caratteristiche e segnali latenti, i quali sono stati successivamente messi in relazione con specifici composti o famiglie di composti. Ciò ha inoltre permesso di effettuare una selezione *ad hoc* delle variabili durante l'analisi di regressione PLS, con la quale sono state studiate le correlazioni tra l'informazione spettrale e le preferenze dei consumatori.

# SVILUPPO E CONFRONTO DI TECNICHE DI CALIBRAZIONE LOCAL SU SPETTRI NIR DI FORAGGI UTILIZZANDO MODELLI BAYESIANI E PLS IMPLEMENTATI NEL SOFTWARE GRATUITO R

Alessandro Ferragina, Francesco Benozzo e Paolo Berzaghi\*

Università degli studi di Padova

Presenting Author: Alessandro Ferragina

\*Corresponding email: [paolo.berzaghi@unipd.it](mailto:paolo.berzaghi@unipd.it)

## Riassunto

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di confrontare i risultati di una Local sviluppata con R e quelli della Local implementata in un software commerciale classico, valutando anche l'efficienza di modelli Bayesiani applicati alla chemiometria. È stato utilizzato un data set di 3,116 campioni relativi a 6 tipologie di foraggio ( insilato di mais, fieno, fieno-silo, insilato di cereali, unifeed, prove parcellari) con relative analisi di sostanza secca, proteina, proteina legata alla fibra, fibra acido detersa, fibra neutro detersa, P, Ca, K, e Mg. I campioni sono stati analizzati con un FOSS NIRSystem 5000 nel range spettrale 1100-2498 nm. Nella prima parte è stata confrontata la Local implementata in WinISI, che utilizza PLS, con una Local sviluppata in R utilizzando sia la PLS che modelli Bayesiani. La Local sviluppata in R era basata sulla correlazione come metodo di selezione dei campioni da utilizzare nel set di calibrazione. Nella seconda parte è stata perfezionata la tecnica di validazione, eseguita per prodotto, e sono stati confrontati i risultati delle calibrazioni Local effettuate con la PLS e i modelli Bayesiani in R. I risultati hanno dimostrato le potenzialità della Local e la versatilità del programma gratuito R. Inoltre è stata dimostrata l'efficienza dei modelli di predizione basati sui pacchetti statistici disponibili, e in particolare la possibilità di utilizzare con successo nuovi modelli di calibrazione, diversi dalla PLS, in particolare quelli Bayesiani.

## Introduzione

Molti fattori influenzano i risultati di una calibrazione basata su spettri NIR, tra questi è importante il metodo chemiometrico utilizzato, inteso come processo di trattamento dei dati, modelli statistici utilizzati e tecnica di validazione. Molti software chemiometrici sono a disposizione degli utenti, e offrono la possibilità di combinare diversi strumenti per l'ottenimento della calibrazione "migliore". Il limite di questi software precompilati è che spesso sono limitati all'uso alla sola strumentazione dell'azienda produttrice e non offrono la possibilità di andare oltre le loro impostazioni. Inoltre nella maggior parte dei lavori scientifici, esclusi i processi di editing e trattamento dei dati, i modelli statistici utilizzati sono basati sulla regressione PLS e la cross-validazione.

La calibrazione cosiddetta globale è il metodo più utilizzato, basato sullo sviluppo di un'equazione di predizione utilizzando un data set di riferimento (o di calibrazione), ma che presenta potenziali svantaggi, per esempio la possibilità di essere utilizzata con successo solo su campioni che rientrano nella variabilità del data set di calibrazione, quindi per migliorare

l'efficienza e ridurre la complessità del modello, dovrebbe essere fatta per prodotto, da qui anche la necessità di aggiornamenti continui per includere la variabilità data da diversi fattori che cambiano nel tempo.

Una tecnica di calibrazione alternativa a quella globale è la Local [1], che prevede lo sviluppo di una calibrazione ad hoc per ogni singolo campione su cui effettuare la predizione. I due passaggi importanti della Local sono: la scelta di un subset di spettri da utilizzare in calibrazione, e il modello statistico da applicare. I campioni da includere nel set di calibrazione possono derivare da una libreria costituita da campioni dello stesso tipo oppure da una libreria multi-prodotto. Tra gli studi fatti sui criteri da utilizzare per la scelta dei campioni da includere nel set di calibrazione, c'è la correlazione tra spettro del campione da predire e quelli del set generale di campioni [2], e le distanze di Mahalanobis [3]. Un solo software offre la possibilità di utilizzare la Local, ma presenta gli svantaggi descritti in precedenza.

La possibilità di svincolarsi dalle limitazioni presentate dai software preimpostati è offerta da altri ad uso gratuito, e in particolare da R [4], che offre sia la possibilità di trattare i dati in modo personalizzato, che di utilizzare diversi pacchetti efficienti, sia per il trattamento degli spettri che per l'implementazione di modelli statistici (e.g., prospectr, chemometrics, ChemoSpec, plsdf, pls).

Recentemente è stato anche studiato un nuovo approccio statistico di calibrazione basato su modelli Bayesiani implementati in R, normalmente utilizzati per analisi genomiche, che hanno dimostrato la loro efficienza anche in campo chemiometrico [5], in particolare il pacchetto BGLR [6].

Utilizzando un data set multi-prodotto costituito da foraggi, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di confrontare i risultati di una Local sviluppata con R e quelli della Local implementata in un software commerciale classico, valutando anche l'efficienza di modelli Bayesiani applicati alla chemiometria

## Materiali e Metodi

### *Dati e analisi*

Il data set generale (o training set) era costituito da 3,116 campioni di foraggi appartenenti alle seguenti tipologie: insilato di mais (**CSL**; 486), fieno (**HAY**; 1231), fieno-silo (**HLG**; 701), insilato di cereali (**SGS**; 287), unifeed (**TMR**; 283), prove parcellari (**PRO**; 128), le statistiche descrittive per ogni prodotto sono riportate in Tabella 1. Seguendo le metodiche di riferimento, i campioni sono stati analizzati per: sostanza secca (**DM**), proteina, fibra acido detersa (**ADF**), proteina legata all'ADF (**ADP**), fibra neutro detersa (**NDF**), P, Ca, K, e Mg. Per ogni campione è stato acquisito lo spettro nel vicino infrarosso (NIR) utilizzando un FOSS NIRSystem 5000, nel range spettrale di 1100-2498 nm ogni 2 nm.

### *Calibrazioni Local*

Questo lavoro è costituito da due passaggi di calibrazione.

Nella prima parte è stato effettuato un confronto tra Local, una sviluppata con il software WinISI II (Infrasoft International LLC) basato sulla PLS, e una sviluppata utilizzando il software R, basata sia su PLS che su modelli Bayesiani.

Nella seconda parte è stata approfondita la Local sviluppata con R, perfezionando il processo di validazione.

*Parte I.* È stato creato un set di validazione selezionando a caso 50 campioni ("unknowns"). Lo stesso set di validazione è stato utilizzato per tutti i modelli testati. Per WinISI è stata utilizzata

l'apposita calibrazione Local in cui il numero di campioni da selezionare per ogni set di calibrazione è stato fissato a 200.

In R i 200 campioni del set di calibrazione sono stati selezionati in funzione della correlazione. Per la PLS in R è stato utilizzato il pacchetto `plsdf` [7], e per l'analisi Bayesiana il pacchetto `BGLR`, e in particolare è stato utilizzato il modello `BayesB`.

Tutta la procedura di calibrazione è stata effettuata su spettri non trattati e su spettri trattati con la derivata prima e standardizzazione (SNVD). Per le statistiche di predizione sono stati utilizzati l' $R^2$  e il root mean square error di validazione (rispettivamente,  $R^2_{VAL}$  e  $RMSE_{VAL}$ ).

*Parte 2.* È stato creato un set di validazione per tipologia di foraggio, in cui sono stati scelti a caso 20 campioni per prodotto. Anche in questo caso, per la Local, i campioni del set di calibrazione per ogni unknown sono stati 200 e scelti in funzione della correlazione. I modelli testati sono stati la PLS e `BayesB` in R. Anche in questo caso sono stati calcolati  $R^2_{VAL}$  e  $RMSE_{VAL}$ .

Tabella 1 – Statistiche descrittive per prodotto

		CSL	HAY	HLG	SGS	TMR	PRO
<b>DM</b>	Media	92.15	92.39	92.09	92.2	92.71	90.1
	<i>DS</i>	1.76	1.81	2.48	1.84	2.48	1.69
<b>Proteina</b>	Media	9.25	17.1	17.99	13.6	12.65	10.59
	<i>DS</i>	2.4	5.05	4.18	5.17	4.68	5.08
<b>ADP</b>	Media	0.56	0.92	1.49	1.12	1.3	0.14
	<i>DS</i>	0.36	0.35	0.71	0.6	0.6	0.2
<b>ADF</b>	Media	27.41	35.15	38.87	35.47	23.77	36.15
	<i>DS</i>	5.04	6.42	5.72	7.54	10.81	4.55
<b>NDF</b>	Media	49.45	54.34	54.23	58.25	45.05	66.24
	<i>DS</i>	8.26	11.38	9.16	9.5	12.65	7.47
<b>P</b>	Media	0.24	0.31	0.35	0.34	0.33	0.22
	<i>DS</i>	0.05	0.08	0.07	0.11	0.1	0.08
<b>Ca</b>	Media	0.31	1.05	1.1	0.55	0.46	0.41
	<i>DS</i>	0.13	0.45	0.38	0.31	0.39	0.17
<b>K</b>	Media	1.11	2.48	2.77	2.61	1.21	1.52
	<i>DS</i>	0.37	0.77	0.64	0.9	0.86	0.83
<b>Mg</b>	Media	0.19	0.28	0.28	0.22	0.2	0.25
	<i>DS</i>	0.05	0.08	0.07	0.07	0.09	0.09

## Risultati e Discussione

In Tabella 2 sono presentate le statistiche di predizione in validazione per il confronto dei modelli sviluppati nella prima parte del lavoro. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la PLS implementata in R ha dato i risultati migliori con entrambi i trattamenti, e non molta differenza è stata osservata tra spettri trattati e non. Tra PLS di WinISI e modello Bayesiano, nella maggior parte dei casi non ci sono state differenze importanti, entrambi i modelli hanno mostrato un incremento notevole di efficienza utilizzando gli spettri trattati.

Tabella 2 – Statistiche di validazione, per trattamento matematico degli spettri, delle calibrazioni Local eseguite con PLS di WinISI (PLS WI), PLS di R (PLS R) e il modello Bayesiano di R (BayesB)

		Nessun trattamento			Derivata prima + SNVD		
		PLS WI	PLS R	BayesB	PLS WI	PLS R	BayesB
<b>DM</b>	$R^2_{VAL}$	0.68	0.87	0.64	0.85	0.90	0.86
	$RMSE_{VAL}$	1.03	0.68	1.11	0.72	0.59	0.69

<b>Proteina</b>	$R^2_{VAL}$	0.95	0.98	0.83	0.98	0.98	0.97
	$RMSE_{VAL}$	1.36	0.80	2.45	0.90	0.80	1.06
<b>ADP</b>	$R^2_{VAL}$	0.75	0.85	0.57	0.89	0.86	0.86
	$RMSE_{VAL}$	0.29	0.23	0.40	0.20	0.23	0.22
<b>ADF</b>	$R^2_{VAL}$	0.77	0.98	0.56	0.97	0.97	0.95
	$RMSE_{VAL}$	3.76	1.15	5.09	1.44	1.29	1.78
<b>NDF</b>	$R^2_{VAL}$	0.82	0.94	0.74	0.93	0.95	0.92
	$RMSE_{VAL}$	4.96	2.54	5.47	2.85	2.26	3.12
<b>P</b>	$R^2_{VAL}$	0.50	0.65	0.44	0.70	0.74	0.73
	$RMSE_{VAL}$	0.06	0.06	0.07	0.05	0.04	0.04
<b>Ca</b>	$R^2_{VAL}$	0.80	0.90	0.73	0.93	0.94	0.92
	$RMSE_{VAL}$	0.24	0.17	0.28	0.14	0.13	0.15
<b>K</b>	$R^2_{VAL}$	0.75	0.86	0.58	0.83	0.84	0.79
	$RMSE_{VAL}$	0.49	0.37	0.63	0.39	0.38	0.45
<b>Mg</b>	$R^2_{VAL}$	0.47	0.65	0.30	0.69	0.70	0.64
	$RMSE_{VAL}$	0.06	0.05	0.07	0.04	0.04	0.05

Nella seconda parte del lavoro è stata perfezionata la tecnica di validazione. Sono stati creati 6 set di validazione (un data set per prodotto, ognuno costituito da 20 campioni completi di tutti i reference) e altrettanti set di dati con i campioni rimanenti per la calibrazione. Gli stessi set di dati creati, sono stati utilizzati per entrambi i modelli testati. Vista la complessità del lavoro, il software WinISI è stato ritenuto dispendioso in termini di tempo per la gestione dei dati. Inoltre dati i risultati della prima parte si è proceduto lavorando solo con R. In Tabella 3 sono riportate le statistiche di validazione per prodotto, delle Local sviluppate con i modelli implementati in R.

I risultati ottenuti hanno dimostrato l'importanza del tipo di validazione effettuata. Confrontando i risultati medi, in particolare l' $R^2$ , con quelli di ogni singolo prodotto, si nota come in alcuni casi l'efficienza della calibrazione sia sovrastimata. Entrambi i modelli testati hanno dato risultati soddisfacenti, soprattutto per la predizione dei composti maggiormente rappresentati in ogni prodotto.

Considerando l'alta correlazione tra la numerosità dei campioni di uno stesso prodotto contenuto nel training set, e la numerosità dei campioni selezionati per il set di calibrazione (dati non mostrati), la Local ha dimostrato di essere molto efficiente. La dimostrazione di quanto appena detto è nei risultati ottenuti per PRO, in cui il numero di campioni selezionati da Local dello stesso prodotto nel set di calibrazione è di circa il 50% e nonostante ciò, i risultati ottenuti per la predizione dei costituenti di PRO sono stati soddisfacenti e in molti casi migliori di quelli relativi ai prodotti più rappresentati.

Tabella 3 – Statistiche di validazione, per prodotto, delle calibrazioni Local sviluppate in R con PLS e BayesB

		<b>CSL</b>	<b>HAY</b>	<b>HLG</b>	<b>SGS</b>	<b>TMR</b>	<b>PRO</b>	<b>Tutti</b>
<b>DM</b>	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.73	0.81	0.94	0.79	0.86	0.84	0.83
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.61	0.66	0.87	0.82	0.78	0.69	0.78
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.72	0.73	0.62	1.07	0.70	0.78	0.78
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.90	0.83	0.88	0.91	0.86	1.02	0.89
<b>Proteina</b>	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.97	0.97	0.91	0.97	0.98	0.98	0.98
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.93	0.95	0.91	0.95	0.96	0.99	0.97
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.52	0.89	1.04	1.04	0.55	0.80	0.83

<b>ADP</b>	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.84	1.20	1.08	1.08	0.84	0.55	0.95
	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.47	0.38	0.87	0.78	0.82	0.84	0.86
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.60	0.46	0.85	0.72	0.72	0.78	0.83
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.27	0.34	0.24	0.36	0.20	0.15	0.27
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.22	0.25	0.31	0.44	0.25	0.18	0.29
<b>ADF</b>	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.96	0.96	0.91	0.95	0.99	0.86	0.97
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.91	0.96	0.83	0.94	0.97	0.73	0.95
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	2.05	1.30	1.86	1.91	1.23	1.75	1.71
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	1.93	1.15	2.81	1.91	2.01	2.37	2.09
	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.86	0.91	0.88	0.92	0.95	0.92	0.94
<b>NDF</b>	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.91	0.82	0.89	0.95	0.96	0.94	0.94
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	3.68	2.72	2.57	3.28	4.41	2.40	3.26
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	2.84	3.74	2.50	2.88	4.39	2.04	3.16
	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.52	0.88	0.56	0.29	0.82	0.56	0.77
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.37	0.67	0.61	0.41	0.83	0.62	0.76
<b>P</b>	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.04	0.04	0.04	0.06	0.04	0.05	0.05
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.04	0.06	0.04	0.06	0.03	0.06	0.05
	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.56	0.90	0.67	0.96	0.85	0.16	0.90
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.55	0.90	0.71	0.86	0.84	0.38	0.89
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.13	0.16	0.18	0.10	0.12	0.17	0.15
<b>Ca</b>	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.13	0.17	0.17	0.14	0.11	0.16	0.15
	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.47	0.56	0.54	0.40	0.89	0.80	0.78
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.47	0.54	0.32	0.51	0.78	0.70	0.74
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.33	0.41	0.49	0.56	0.33	0.37	0.42
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.32	0.46	0.57	0.49	0.45	0.45	0.46
<b>K</b>	$R^2_{VAL\_PLS}$	0.53	0.52	0.53	0.37	0.27	0.79	0.60
	$R^2_{VAL\_Bayes}$	0.51	0.45	0.31	0.22	0.55	0.50	0.49
	$RMSE_{VAL\_PLS}$	0.04	0.07	0.05	0.06	0.04	0.05	0.05
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.04	0.07	0.05	0.06	0.03	0.08	0.06
	$RMSE_{VAL\_Bayes}$	0.04	0.07	0.05	0.06	0.03	0.08	0.06

## Conclusioni

In questo lavoro è stato dimostrato che l'utilizzo di modelli statistici implementati in R può essere una valida alternativa ai software chemiometrici commerciali precompilati. Un ulteriore vantaggio di R è rappresentato dalla possibilità di personalizzare le analisi potendo scegliere tra molti pacchetti ormai disponibili e agevolando la manipolazione dei data set anche di grandi dimensioni, facilitando e ottimizzando allo stesso tempo il processo di validazione. Inoltre il tipo di calibrazione Local sviluppato in R ha dimostrato la sua efficienza sia utilizzando i modelli più comuni basati su PLS che nuovi modelli, rappresentati in questo caso dai modelli Bayesiani.

## Bibliografia

1. J. S. Shenk, P. Berzaghi and M. O. Westerhaus (1997) *Investigation of a LOCAL calibration procedure for near infrared instruments*. J. Near Infrared Spectrosc., 5, 223-232.
2. P. Berzaghi, J. S. Shenk and M. O. Westerhaus (2000) *LOCAL prediction with near infrared multi-product databases*. J. Near Infrared Spectrosc., 8, 1-9.

3. F. Allegrini, J. A. Fernández Pierna, W. D. Fragoso, A. C. Olivieri, V. Baeten, P. Dardenne (2016) *Regression models based on new local strategies for Near Infrared Spectroscopic data*. Analytica Chimica Acta, doi: 10.1016/j.aca.2016.07.006.
4. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
5. A. Ferragina, G. de los Campos, A. I. Vazquez, A. Cecchinato, and G. Bittante (2015) *Bayesian regression models outperform partial least squares methods for predicting milk components and technological properties using infrared spectral data*. J. Dairy Sci. 98, 8133-8151.
6. G. de los Campos and P. Perez Rodriguez (2015) *BGLR: Bayesian Generalized Linear Regression*. R package version 1.0.4. <http://CRAN.R-project.org/package=BGLR>.
7. N. Kraemer, M. Sugiyama (2012) *The Degrees of Freedom of Partial Least Square Regression*. Journal of the American Statistical Association. 106 (494)

## **DAI PORTATILI AI DRONI: APPLICAZIONI DELL'INFRAROSSO VICINO IN AGRICOLTURA**

Paolo Berzaghi

*Università degli studi di Padova*

### **Riassunto**

L'agroalimentare è stato uno dei settori più attivi e prolifici nello sviluppo di applicazioni della spettroscopia dell'infrarosso vicino (NIRS). Le tradizionali analisi NIRS, confinate in laboratori e svolte da personale specializzato hanno cambiato profondamente il lavoro analitico nell'intero settore. Le nuove frontiere di sviluppo vanno però ben oltre e al di fuori delle condizioni controllate del laboratorio. Le produzioni di pieno campo devono confrontarsi oggi con marginalità economiche ridotte, la necessità di ridurre l'impatto ambientale e garantire allo stesso momento alta qualità delle produzioni. Lo sviluppo di applicazioni *on the go* su macchine di raccolta e sensori remoti su droni e UAV stanno portando una serie di innovazioni nella gestione delle colture di pieno campo. Gli strumenti portatili stanno avendo un veloce sviluppo ed una rapida implementazione con diverse aziende italiane in prima linea nell'offerta di strumentazione e applicazioni. Tutte queste nuove applicazioni devono poter dimostrare la loro reale utilità al processo produttivo, ma prima ancora dovranno risolvere le sfide tecniche, che applicazioni fuori dell'ambiente controllato di laboratorio devono affrontare per essere affidabili accurate e garantire il ritorno economico necessario alla loro diffusione.



# SPERIMENTAZIONE DI UN SISTEMA OTTICO SEMPLIFICATO PER LA VALUTAZIONE RAPIDA DELLA MATURAZIONE DI UVA BIANCA DA VINO

Roberto Beghi\*, Valentina Giovenzana, Raffaele Civelli, Roberto Oberti, Riccardo Guidetti

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio, Agroenergia (DiSAA),  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy.

Presenting Author: Roberto Beghi

\*Corresponding email: roberto.beghi@unimi.it

## Riassunto

Il momento della vendemmia viene spesso stabilito senza aver a disposizione sufficienti dati oggettivi sullo stato di maturazione delle uve. Pertanto lo scopo del lavoro è stato quello di progettare e sperimentare un sistema ottico semplificato, alla portata anche di piccoli produttori, ideato per realizzare misure in riflettanza direttamente in campo a quattro lunghezze d'onda specifiche (630, 690, 750 and 850 nm). Per le sorgenti luminose sono stati scelti dei diodi LED in modo da poter regolare singolarmente l'intensità luminosa di ogni canale di misura. La modularità della sorgente luminosa consente di utilizzare il medesimo strumento per diverse applicazioni. Lo strumento è dotato infine di una fibra ottica a otto rami appositamente realizzata per veicolare la luce dai LED al campione e per portare la radiazione di ritorno ai quattro fotodiodi.

Il prototipo è stato sperimentato per la stima del grado di maturazione di uve Chardonnay in Franciacorta. Per confrontare le prestazioni di stima del prototipo, le misure sono state eseguite anche mediante l'impiego di uno spettrofotometro portatile commerciale operante nel range spettrale vis/NIR (400-1000 nm, 2048 lunghezze d'onda). Contestualmente sono state eseguite le analisi di riferimento del contenuto in solidi solubili (SSC) e dell'acidità titolabile (TA). I dati sono stati utilizzati per la creazione di modelli quantitativi di previsione e di modelli di classificazione.

I modelli di previsione quantitativa hanno fornito risultati incoraggianti, con parametri analitici dei modelli derivanti dai dati del prototipo simili a quelli calcolati partendo dagli spettri completi acquisiti con il dispositivo commerciale. Analogo comportamento è stato registrato dall'analisi dei modelli di classificazione con percentuali di campioni correttamente classificati (PPV) solo leggermente inferiori per il prototipo (SSC su bacca = 79,0%, SSC su grappolo = 77,5%, TA = 84,3%) rispetto al sistema vis/NIR commerciale (SSC su bacca = 84,6%, SSC su grappolo = 89,5%, TA = 90,5%).

**Keywords:** analisi non distruttive, spettroscopia vis/NIR, uva bianca, maturazione, chemiometria

## Introduzione

Il settore enologico sta assistendo, in questi ultimi anni, all'introduzione di nuove tecnologie a servizio di un maggior controllo sia delle materie prime sia del processo di vinificazione. Il controllo dell'uva in ingresso rappresenta un punto critico della filiera enologica in quanto se da una parte deve caratterizzare la materia prima, che determinerà la qualità del vino, dall'altra costituisce una fase delicata in quanto è la base per il pagamento del prodotto al viticoltore. Il momento della vendemmia viene spesso stabilito senza aver a disposizione sufficienti dati oggettivi sullo stato di maturazione delle uve. La ricerca di metodi non distruttivi che potrebbero analizzare un gran numero di campioni e fornire una panoramica rapida e completa dell'andamento della maturazione

è pertanto più che mai auspicabile. A questo proposito la strumentazione ottica attualmente disponibile sul mercato (basata soprattutto sulla spettroscopia nel visibile e vicino infrarosso, vis/NIR) è costituita spesso da dispositivi complessi e non specifici in assoluto per il settore enologico. In letteratura sono presenti studi di fattibilità riguardanti l'applicazione della spettroscopia NIR per misurare attributi di qualità dei prodotti ortofrutticoli su diversi prodotti [1]. Arana et al. [2] hanno applicato la spettroscopia NIR (800-1500 nm) al fine di determinare il contenuto di solidi solubili e per identificare varietà e origine di diverse uve Chardonnay ottenendo buoni risultati. Gonzalez-Caballero et al. [3] hanno testato la possibilità di caratterizzare il comportamento di uve bianche e rosse durante la maturazione in vigneto mediante spettroscopia NIR. Kempes et al. [4] hanno valutato la concentrazione di antociani, polifenoli estraibili, zuccheri e densità di 4 vitigni a bacca rossa utilizzando uno spettrofotometro vis/NIR portatile.

Lo scopo del lavoro è stato quello di progettare e sperimentare un sistema ottico semplificato, alla portata quindi anche di piccoli produttori, ideato per realizzare misure in riflettanza direttamente in campo a quattro lunghezze d'onda specifiche (630, 690, 750 and 850 nm). Il prototipo è stato sperimentato per la stima del grado di maturazione di uve Chardonnay; per confrontare le sue prestazioni di stima le misure sono state eseguite anche mediante l'impiego di uno spettrofotometro vis/NIR portatile commerciale.

### Materiali e Metodi

Un prototipo di sistema ottico è stato progettato, realizzato e sperimentato per la stima rapida di parametri di maturazione di uva Chardonnay per vino base spumante Franciacorta. Come sorgente luminosa è stato scelto di utilizzare diodi emettitori di luce (LED) in modo da poter pilotare in modo indipendente l'intensità della luce inviata sul campione per ogni canale di misura. Le quattro lunghezze d'onda specifiche selezionate per il dispositivo sono: 630, 690, 750 and 850 nm (Figura 1).

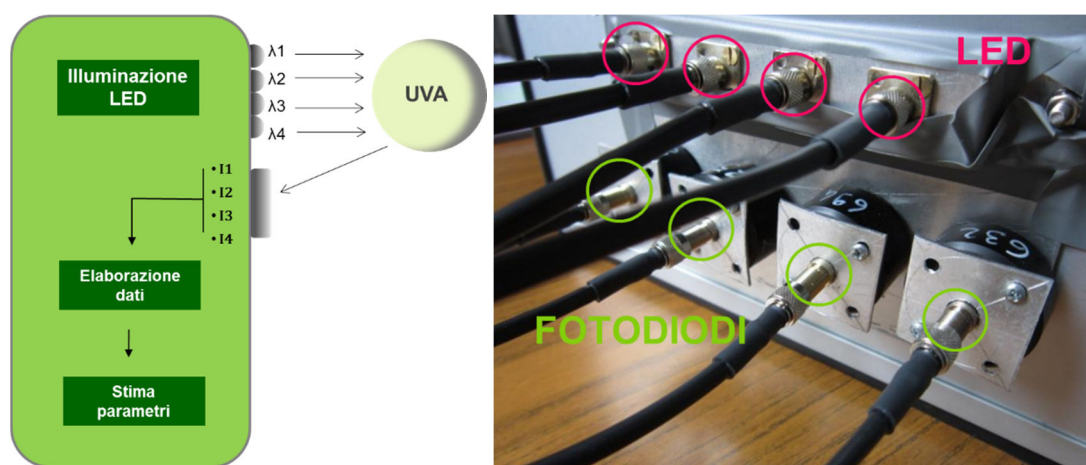


Figura 1- Schema del sistema semplificato e particolare del sistema di illuminazione a quattro LED

La sperimentazione del dispositivo, dopo una fase di test in laboratorio, è stata eseguita su uva bianca (*Vitis Vinifera* L.) cultivar Chardonnay utilizzata per la produzione di spumante Franciacorta (Adro, Brescia, Italia). Sono stati analizzati 95 grappoli d'uva durante le ultime settimane di maturazione fino alla data di vendemmia, utilizzando sia il prototipo a LED a quattro lunghezze d'onda che uno spettrofotometro vis/NIR portatile operante nell'intervallo 400-1000 nm (2048 lunghezze d'onda), al fine di poter fare un confronto sulle performance degli strumenti.

Come analisi di riferimento per la calibrazione dei modelli previsionali sono stati misurati il contenuto in solidi solubili (SSC) e l'acidità titolabile (TA). Utilizzando i dati spettrali registrati con il sistema commerciale vis/NIR sono stati elaborati dei modelli di stima utilizzando la tecnica di regressione PLS, con validazione interna tramite *cross-validation* con 7 gruppi di cancellazione). Parallelamente, i dati registrati con il sistema ottico semplificato sono stati utilizzati per la calibrazione di modelli di stima per gli stessi parametri di maturazione, in questo caso utilizzando

però la tecnica di regressione MLR più adatta per dati costituiti da poche variabili. Le performance dei modelli elaborati sono state valutate mediante parametri come  $R^2$ , RPD e RER.

### Risultati e Discussione

In tabella 1 sono riportati i risultati relativi all'elaborazione dei modelli PLS per la stima di SSC e TA derivanti dagli spettri acquisiti mediante il sistema spettrofotometrico vis/NIR.

I parametri di valutazione dei modelli risultano buoni per la stima dell'SSC su grappoli e della TA con  $R^2$  0,80-0,81, valori di RPD > 2 e valori di RER vicino a 9 per SSC su grappoli e superiori a 10 per TA. Performance leggermente inferiori sono state evidenziate dal modello calibrato per la stima dell'SSC dei singoli acini.

Risultati simili sono stati ottenuti da Arana et al. [2] per la stima di SSC di uva Chardonnay con un strumento NIR (800-1500 nm) con valori di  $R^2$  dei modelli previsionali tra 0,70 e 0,75. Per quanto riguarda la stima della TA, Guidetti et al. [5] hanno ottenuto su bacche d'uva Nebbiolo valori di  $R^2 = 0,66$  in cross-validazione e un RMSECV = 1,48 g dm<sup>-3</sup> utilizzando un sistema vis/NIR portatile (450-980 nm).

Tabella 1. Statistica descrittiva e parametri di valutazione dei modelli PLS elaborati a partire da spettri vis/NIR per la stima di parametri di maturazione di uva bianca per la produzione di spumante Franciacorta

Parametri di maturazione	N	Media	SD	LV	Calibrazione PLS		Cross-validazione PLS			
					$R^2_{cal}$	RMSEC	$R^2_{cv}$	RMSECV	RPD	RER
CSS (°Brix) su acini	475	14,1	3,5	7	0,73	1,8	0,71	1,8	1,94	8,72
CSS (°Brix) su grappoli	95	14,2	3,2	7	0,85	1,3	0,80	1,5	2,13	8,77
Acidità (g/dm <sup>3</sup> )	95	10,5	5,1	5	0,86	1,9	0,81	2,2	2,32	10,14

SD= deviazione standard; LV=variabili latenti

I valori di riflettanza registrati per ognuno dei quattro canali del prototipo di sistema semplificato (LED + fotodiode) sono stati utilizzati per l'elaborazione dei modelli MLR di stima sui medesimi parametri di maturazione (Tabella 2).

Per la stima del SSC, le statistiche dei modelli di MLR mostrano valori pari a  $R^2_{cv} = 0,66$  e  $0,65$ , RPD = 1,74 e 1,67, e RER = 8,26 e 7,31 rispettivamente per bacche e grappolo. Il miglior modello MLR è stato ottenuto per la stima di TA con  $R^2_{cv} = 0,85$ , RPD = 2,5 e RER = 12,4.

È stato effettuato un confronto tra i modelli PLS derivanti dagli spettri vis/NIR completi (dispositivo commerciale) e i modelli MLR risultanti unicamente dalle quattro lunghezze d'onda (dispositivo semplificato) sia per SSC che per TA. Le migliori performance di stima sono state ottenute per TA sia per i modelli di regressione PLS che per i modelli MLR. L'elaborazione del modello MLR per TA ha evidenziato, in validazione, valori più elevati del coefficiente di determinazione ( $R^2 = 0,85$ ), RPD (2,50) e RER (12,40) rispetto ai valori corrispondenti del modello PLS ( $R^2_{cv} = 0,81$ , RPD = 2,32, RER = 10,14). Ciò significa che l'eliminazione di porzioni dell'informazione spettrale evidentemente non utili per la stima di questo parametro specifico permetta la calibrazione di un modello più performante.

In generale, si è verificata solo una piccola perdita di informazioni tra i modelli PLS calcolati utilizzando 2048 lunghezze d'onda e i modelli MLR elaborati impiegando solo i quattro canali del dispositivo semplificato.

Gli autori in uno studio precedente [6] hanno testato una metodologia di selezione delle variabili al fine di selezionare un numero ridotto di variabili informative nell'intervallo vis/NIR per il monitoraggio della maturazione di uva rossa. Sono state selezionate anche in quel caso quattro variabili. I coefficienti di determinazione ottenuti e i valori RPD hanno mostrato una tendenza

simile a quella del presente lavoro: per la stima di SSC il modello PLS mostrava  $R^2 = 0,77$  e  $RPD = 2,26$ , mentre quello MLR  $R^2 = 0,71$  e  $RPD = 2,13$ .

Wu et al. [7] hanno applicato un approccio simile di selezione delle variabili su spettri acquisiti in trasmittanza per la stima di SSC e pH di succo d'uva nell'intervallo spettrale 325-1075 nm. Gli autori hanno ottenuto coefficienti di determinazione ottimali, in validazione, sia per SSC, compresi tra 0,89 al 0,97, che per il pH (da 0,91 a 0,96). L'analisi MLR è stata applicata anche in questo caso per verificare i risultati della selezione della lunghezza d'onda e, per quanto riguarda SSC, sono stati ottenuti ottimi risultati rispetto ai modelli PLS con  $R^2 = 0,97$  e 0,98 per, rispettivamente, cinque e nove variabili selezionate.

Fernández-Navales et al. [8] hanno comparato le performance di stima di un modello PLS calcolato utilizzando spettri completi nell'intervallo 800-1050 nm con uno MLR basato su quattro lunghezze d'onda selezionate per la stima del contenuto di zucchero in mosto d'uva, ottenendo una riduzione delle prestazioni del modello MLR del 20%.

Tabella 2. Statistica descrittiva e parametri di valutazione dei modelli MLR elaborati a partire dai dati acquisiti con il sistema semplificato a 4 lunghezze d'onda (630, 690, 750, 850 nm) per la stima di parametri di maturazione di uva bianca per la produzione di spumante Franciacorta

Parametri di maturazione	N	Media	SD	Calibrazione MLR		Cross-validazione MLR			
				$R^2_{cal}$	RMSEC	$R^2_{cv}$	RMSECV	RPD	RER
CSS (°Brix) su acini	433	14,4	3,3	0,67	1,9	0,66	1,9	1,74	8,26
CSS (°Brix) su grappoli	89	14,1	3,0	0,69	1,7	0,65	1,8	1,67	7,31
Acidità (g/dm <sup>3</sup> )	89	9,9	4,5	0,87	1,6	0,85	1,8	2,50	12,40

SD= deviazione standard

Infine, è stata effettuato un confronto tra le prestazioni di classificazione dei due sistemi. In Tabella 3 sono riportate le percentuali di campioni di uva classificati in modo corretto ed errato in base a soglie di maturazione per i parametri analizzati (17 °Brix per SSC e 7 g dm<sup>-3</sup> per TA).

Tabella 3. Percentuali di campioni d'uva correttamente ed erroneamente classificati in base a soglie di maturazione per i parametri analizzati (17 °Brix per SSC e 7 g/dm<sup>3</sup> for TA). I valori di PPV (Positive Predictive Value) totale indicano le percentuali totali di campioni correttamente classificati.

Dispositivo commerciale							
		CSS su acini (°Brix)		CSS su grappoli (°Brix)		Acidità (g/dm <sup>3</sup> )	
		Misurato					
	(%)	Maturo	Non maturo	Maturo	Non maturo	Maturo	Non maturo
Stimato	Maturo	77,1	22,9	81,8	18,2	95	5
	Non maturo	13,9	86,1	8,2	91,8	10,7	89,3
	PPV totale	84,6		89,5		90,5	
Prototipo sistema semplificato							
		CSS su acini (°Brix)		CSS su grappoli (°Brix)		Acidità (g/dm <sup>3</sup> )	
		Misurato					
	(%)	Maturo	Non maturo	Maturo	Non maturo	Maturo	Non maturo
Stimato	Maturo	75,0	25,0	66,7	33,3	93,3	6,7
	Non	20,6	79,4	22,1	77,9	17,6	82,4

	<b>matturo</b>				
	<b>PPV totale</b>	<b>79,0</b>	<b>77,5</b>	<b>84,3</b>	

I risultati complessivi di PPV derivanti dal sistema semplificato mostrano performance di classificazione leggermente più basse (SSC sulla bacca = 79,0%, SSC sul grappolo = 77,5%, TA = 84,3%) rispetto al dispositivo commerciale vis/NIR. Le differenze in termini di prestazioni di classificazione per SSC su bacche, SSC su grappolo e TA sono infatti inferiori rispettivamente del 5,6%, 12,0% e 6,2%. Per entrambe le strumentazioni ottiche, la percentuale dei campioni immaturi erroneamente classificati come maturi per SSC è superiore a quella registrata per l'indice TA.

Le performance di classificazione relative ai due strumenti ottici riflettono sostanzialmente l'andamento dei modelli PLS quantitativi, confermando la piccola perdita di informazione spettrale derivante dall'utilizzo di solo quattro lunghezze d'onda che, conseguentemente, penalizza leggermente l'applicabilità del sistema LED semplificato.

### Conclusioni

I risultati ottenuti sono da considerarsi sicuramente positivi in quanto hanno permesso di avere a disposizione un prototipo di sistema ottico semplice, poco costoso e rapido per l'analisi degli indici di maturazione. L'elaborazione dei modelli di regressione ha dimostrato la buona potenzialità di questo strumento nella stima dei parametri considerati.

L'integrazione di semplici algoritmi di elaborazione derivanti dai modelli MLR con poche variabili nel software del microcontrollore dello strumento permetterebbe una visualizzazione in tempo reale dei parametri desiderati. I viticoltori potrebbero impiegare strumenti di questo tipo direttamente in campo per una rapida valutazione del livello di maturazione delle uve.

Inoltre, la progettazione del prototipo del dispositivo ottico semplificato è stata realizzata con particolare attenzione alla versatilità e alla modularità. La possibilità infatti di modificare facilmente le sorgenti luminose con una scelta specifica di lunghezze d'onda per i LED, consente di utilizzare lo stesso dispositivo ottico semplificato per molte applicazioni differenti e per diverse matrici alimentari (ad esempio valutazione della maturazione, stima di sostanze chimiche e di proprietà fisiche ma anche analisi di *shelf life* per altri ambiti di applicazione). Una successiva evoluzione e un'ulteriore fase di ingegnerizzazione del sistema dovrà essere ancora eseguita per ottenere un dispositivo più compatto, economico e facile da usare, di dimensioni tascabili, integrabile con applicativi software per *smartphones* e pc per una condivisione e archiviazione dei dati via remoto.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato in parte svolto nell'ambito del progetto "SOQUIC – Sistemi Ottici per la Qualità dell'uva Italiana e Cilena" finanziato da Regione Lombardia.

### Bibliografia

1. B. M. Nicolai, K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K. I. Theron, J. Lammertyna (2007). *Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review*. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 99-118.
2. I. Arana, C. Jaren, S. Arazuri (2005). *Maturity, variety and origin determination in white grapes (Vitis Vinifera L.) using near infrared reflectance technology*. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13, 349-357.
3. V. González-Caballero, M. T. Sánchez, J. Fernández-Novales, M. I. López, D. Pérez-Marín (2012). *On-vine monitoring of grape ripening using near-infrared spectroscopy*. *Food Analytical Methods*, 5, 1377-1385.
4. B. Kemps, L. Leon, S. Best, J. De Baerdemaeker, B. De Ketelaere (2010). *Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy*. *Biosystems Engineering*, 105, 507-513.

5. R. Guidetti, R. Beghi, L. Bodria (2010). *Evaluation of grape quality parameters by a simple Vis/NIR system*. Transaction of the ASABE, 53, 477-484.
6. V. Giovenzana, R. Beghi, C. Malegori, R. Civelli, R. Guidetti (2013). *Wavelength selection with a view to a simplified handheld optical system to estimate grape ripeness*. American Journal of Enology and Viticulture, 65, 117-123.
7. D. Wu, Y. He, P. Nie, F. Cao, Y. Bao (2010). *Hybrid variable selection in visible and near-infrared spectral analysis for non-invasive quality determination of grape juice*. Analytica Chimica Acta, 659(1), 229-237.
8. J. Fernández-Novales, M. I. López, M. T. Sánchez, J. Morales, V. González-Caballero (2009). *Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines*. Food Research International, 42, 285-291.

## SPETTROSCOPIA NIR PER LA VALUTAZIONE E IL MONITORAGGIO DELL' INVECCHIAMENTO NATURALE DEL LEGNO

Anna Sandak<sup>1</sup>, Jakub Sandak<sup>2</sup>, Athanasios Dimitriou<sup>3</sup>, Ingunn Burud<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Trees and Timber Institute IVALSÀ/CNR, via Biasi 75, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italy*

<sup>3</sup> *BioComposites Centre, Bangor University, Deiniol Road, Bangor, Gwynedd LL57 2UW, United Kingdom*

<sup>4</sup> *Norwegian University of Life Sciences, Department of Mathematical Sciences and Technology, Campus Ås, Universitetstunet 3, 1430 Ås, Akershus, Norway*

### Riassunto

L'invecchiamento naturale è un processo che definisce la lenta degradazione dei materiali esposti agli agenti atmosferici. Il tempo di degradamento dipende dalle specie legnose e dipende soprattutto dalle condizioni microclimatiche. Anche se molta ricerca è stata dedicata agli studi dei meccanismi di degrado di diversi materiali, sono difficilmente disponibili modelli affidabili per le superfici legnose. Questa ricerca è una parte delle attività all'interno del test di Round Robin (RR), iniziativa comune all'Azione COST FP1006, in cui 28 set di campioni sono stati esposti in 18 località in Europa e in Brasile.

Due tipi di campioni sperimentali ("sottili" e "spessi") sono state ottenute da un tronco di abete rosso (*Picea abies* L.) e sono stati esposti a invecchiamento naturale breve (28 giorni) e di lungo termine (un anno). I metodi di caratterizzazione della superficie utilizzati per la valutazione dei campioni di prova RR comprendono: colore CIE Lab, spettri VIS, NIR e MIR, l'imaging, la brillantezza, l'XRF e la rugosità.

Due diversi spettrofotometri NIR, uno strumento portatile e uno da laboratorio, sono stati selezionati e testati intensamente con questo lavoro. La spettroscopia NIR è stata utilizzata per l'identificazione dei cambiamenti chimici nel legno dovuti agli agenti atmosferici. Oltre all'interpretazione di routine degli spettri, sono stati eseguiti nuovi approcci per il calcolo della velocità di degradazione. Tali algoritmi hanno permesso il confronto diretto dell'effetto della posizione geografica sull'intensità del degradamento del legno.

**Acknowledgment:** This work has been conducted within the Round Robin test initiative of the COST FP1006, STSM funded by COST FP1303 and project BIO4ever funded within a call SIR by MIUR (RBSI14Y7Y4). Special thanks to all participants of the RR test.

## UTILIZZO DEL MICRO-NIR PER LA VALUTAZIONE DELLA MATURAZIONE DELL'ACEROLA

Malegori C.<sup>1</sup>, Marques E.J.N.<sup>2</sup>, Pimentel M.F.<sup>2</sup>, de Freitas S.T.<sup>3</sup>, de França Souza F.<sup>3</sup>, Pasquini C.<sup>4</sup>,  
Casiraghi E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DeFENS Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università degli Studi di Milano – Milano -  
ITALY

<sup>2</sup> Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco– Recife (PE) – BRAZIL

<sup>3</sup> Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Semiárido, Petrolina (PE) – BRAZIL

<sup>4</sup> Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) – BRAZIL

### Riassunto

L'acerola è un frutto brasiliano noto per il suo elevato contenuto di vitamina C (da 1,0 a 4,5 mg/100 g); scopo di questo lavoro è, quindi, di stimare in modo non-distruttivo non solo il contenuto di acido ascorbico ma anche l'acidità titolabile del frutto.

Sono stati acquisiti gli spettri di 117 frutti a tre diversi stadi di maturazione, durante 14 date di campionamento, impiegando due strumenti: uno spettrofotometro FT-NIRA da banco (12000 – 4000 cm<sup>-1</sup>) e un MicroNIR portatile (950-1650 nm). L'acidità titolabile e il contenuto di acido ascorbico sono stati, in seguito, ottenuti mediante titolazione del succo ottenuto da ciascuna acerola. Gli spettri provenienti dai due strumenti, suddivisi in training set (77 campioni) e test set (40 campioni) sono stati modellati impiegando due algoritmi: PLS (Partial Least Square), semplice e affermato algoritmo di modellazione lineare, e SVM (Support Vector Machine), per la modellazione non lineare.

I valori medi ottenuti dalle determinazioni distruttive sono risultati di 2750±517 mg/100g per l'acido ascorbico e di 2,20±0,2 g/100g per l'acidità titolabile, espressa come acido malico. La variabilità del dato è scarsa e sembra seguire un andamento non strettamente lineare. I modelli di regressione ottenuti con gli spettri del MicroNIR hanno, infatti, fornito risultati migliori se modellati con l'algoritmo SVM; il modello della vitamina presenta R<sup>2</sup> in calibrazione di 0,71 con RMSEC di 221 mg/100g mentre l'acidità presenta R<sup>2</sup> di 0,78 con RMSEC di 0,11 g/100g. Per quanto riguarda la predizione, R<sup>2</sup> è pari a 0,65 e 0,72 rispettivamente per acido ascorbico e acidità. I dati FT-NIRA hanno fornito modelli di comparabile robustezza con entrambe gli algoritmi, con errori più bassi in SVM. L'abilità in predizione del MicroNIR sembra, quindi, essere adatta ad un utilizzo in campo; si suggerisce una modellazione non lineare



## CARATTERIZZAZIONE DI CAMPIONI DI CAFFÈ VERDE MEDIANTE IMAGING IPERSPETTRALE E TECNICHE DI DATA REDUCTION

Rosalba Calvini<sup>\*</sup>, Giorgia Orlandi, Giorgia Foca, Alessandro Ulrici

Dipartimento di Scienze della Vita – Università di Modena e Reggio Emilia – Pad. Besta Via Amendola 2, 42122, Reggio Emilia. E-mail: [rosalba.calvini@unimore.it](mailto:rosalba.calvini@unimore.it)

\*[rosalba.calvini@unimore.it](mailto:rosalba.calvini@unimore.it)

### Riassunto

L'imaging iperspettrale è una tecnica analitica in grado di fornire in tempi brevi informazione sia spettrale che spaziale di un campione. Tuttavia, l'enorme mole di dati contenuta in ogni immagine iperspettrale pone il problema di trovare strumenti efficaci per analizzare contemporaneamente decine o migliaia di immagini. In questo contesto, le tecniche di riduzione dei dati iperspettrali in segnali monodimensionali (1D-DR) possono rappresentare una possibile soluzione, poiché consentono di convertire ogni immagine tridimensionale in un segnale monodimensionale che ne codifica l'informazione spaziale e/o spettrale: dataset contenenti un elevato numero di immagini possono quindi essere convertiti in matrici di segnali, che al loro volta possono essere facilmente analizzate mediante metodi chemiometrici.

In questo lavoro sono state analizzate immagini iperspettrali acquisite nel vicino infrarosso (955-1700 nm) su campioni di caffè verde, trasformandole in tre tipologie di segnale: Spettri Medi (*Average Spectra*, AS), Iperspettrogrammi nello Spazio Singolo (*Single Space Hyperspectrograms*, SSH) ed Iperspettrogrammi nello Spazio Comune (*Common Space Hyperspectrograms*, CSH). I tre tipi di segnale sono stati utilizzati per l'analisi esplorativa del dataset e per classificare i campioni in base alla varietà di caffè (Arabica e Robusta) e al metodo di lavorazione dei chicchi (caffè Polished, Naturale e Lavato).

L'analisi esplorativa mediante Principal Component Analysis (PCA) ha permesso di individuare la presenza di alcune immagini difettose a causa di un guasto strumentale. Questo problema è stato evidenziato soprattutto grazie all'uso degli SSH: ciò suggerisce che questo metodo di riduzione dei dati iperspettrali potrebbe costituire uno strumento efficace per il monitoraggio della stabilità del sistema di acquisizione. Inoltre, sono stati calcolati modelli di classificazione mediante Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA), considerando le tre tipologie di segnali sia separatamente che mediante tecniche di data fusion. Mentre nel caso della classificazione dei campioni in base alla varietà l'uso degli iperspettrogrammi (in particolare dei CSH) è stato sufficiente per ottenere risultati soddisfacenti, la data fusion ha portato ad un miglioramento dei risultati nel caso della classificazione basata sul metodo di lavorazione dei chicchi.

### Introduzione

Nell'ambito della chimica analitica l'imaging iperspettrale (HSI) è una tecnica che si sta affermando velocemente in quanto permette di raccogliere in tempi brevi sia informazione spettrale che informazione spaziale di un campione [1]. In particolare, l'imaging iperspettrale permette di combinare i vantaggi della spettroscopia classica con quelli delle tecniche di imaging, fornendo una rappresentazione dettagliata della superficie del campione in esame.

Le immagini iperspettrali sono matrici tridimensionali (chiamate ipercubi) caratterizzate da due dimensioni spaziali e una spettrale [2]. Un'immagine iperspettrale può essere quindi considerata sia

come una serie di immagini acquisite a diverse lunghezze d'onda, sia come un insieme di spettri corrispondenti ai diversi pixel dell'immagine.

Per lo sviluppo di applicazioni pratiche di questa tecnica risulta spesso necessario prendere in considerazione un elevato numero di campioni, al fine di rappresentare la variabilità degli stessi; ciò implica la necessità di elaborare dataset che possono essere costituiti da centinaia o migliaia di immagini iperspettrali. La difficoltà nella gestione di un così elevato numero di immagini rappresenta una delle principali limitazioni per l'applicazione di tali sistemi nell'ambito del monitoraggio di processo [3]. Per superare questo problema è dunque necessario utilizzare adeguati metodi di riduzione della dimensionalità dei dati (DR); tra questi, i più semplici consistono nel convertire ogni ipercubo in un segnale monodimensionale (1D-DR) che ne codifica l'informazione utile. Pertanto, l'intero dataset di immagini iperspettrali viene convertito una matrice di segnali che può essere successivamente analizzata mediante metodi chemiometrici, permettendo così di confrontare rapidamente e simultaneamente un elevato numero di immagini. A seconda del tipo di metodo 1D-DR che viene utilizzato è possibile codificare un diverso tipo di informazione contenuta nell'immagine iperspettrale: il segnale può cioè contenere solo informazione spettrale, solo informazione spaziale, o entrambe.

In questo lavoro sono state considerate tre diverse tipologie di metodi 1D-DR: Spettri Medi (*Average Spectra*, AS), Iperspettrogrammi nello Spazio Singolo (*Single Space Hypersepctrograms*, SSH) [4, 5] e Iperspettrogrammi nello Spazio Comune (*Common Space Hyperspectrograms*, CSH) [6].

Essenzialmente, l'approccio degli iperspettrogrammi consiste nel trasformare ogni immagine in un segnale monodimensionale ottenuto a partire da quantità estratte mediante Principal Component Analysis (PCA). Nel caso degli SSH viene calcolato un modello PCA separatamente su ogni immagine ed il segnale è ottenuto andando ad unire in sequenza le curve di distribuzione di frequenza degli scores, dei residui Q e di  $T^2$ , ed infine i vettori dei loadings. Pertanto ogni SSH è formato da due parti: una parte costituita dalle curve di distribuzione di frequenza che codifica l'informazione spaziale, ed una parte costituita dai vettori dei loadings che codifica l'informazione spettrale. Invece, per gli CSH viene calcolato un modello PCA comune all'intero dataset di immagini e vengono unite in successione solamente le curve di distribuzione di frequenza degli scores, dei residui Q e di  $T^2$ , ottenendo un segnale che codifica l'informazione spaziale.

AS, SSH e CSH rappresentano tre diverse strategie di conversione delle immagini iperspettrali in segnali, ognuna delle quali permette di mettere in evidenza diversi aspetti delle immagini originali. Gli spettri medi permettono di codificare solamente l'informazione spettrale, mentre l'informazione spaziale viene persa completamente; pertanto questo tipo di approccio risulta utile nell'analisi di campioni omogenei ma potrebbe non essere idoneo per l'identificazione di caratteristiche spazialmente localizzate di un campione, come ad esempio la presenza di difetti. Al contrario, gli SSH sono molto efficaci nel tenere in considerazione l'informazione spaziale delle immagini, ma potrebbero non essere un metodo adatto per la valutazione di campioni omogenei o proprietà comuni all'intero dataset. Gli CSH possono essere visti come una sorta di compromesso tra i due metodi in quanto permettono di tenere in considerazione sia le caratteristiche spaziali, come gli SSH, sia proprietà generali delle immagini, come gli AS.

## Materiali e Metodi

In questo lavoro sono stati considerati campioni di caffè verde appartenenti alle varietà Arabica e Robusta e sottoposti a diversi metodi di lavorazione dei chicchi per rimuovere la polpa dal seme (caffè Polished, Naturale, Lavato). I campioni di caffè, provenienti da 31 diversi lotti industriali, sono stati consegnati al laboratorio in 4 giorni diversi durante un periodo di circa 5 mesi e le immagini iperspettrali dei campioni sono state acquisite lo stesso giorno di consegna. In particolare, per ogni lotto sono state acquisite 12 immagini iperspettrali per un totale di 372 immagini (Tabella 1).

Tabella 1 - Descrizione dei campioni di caffè verde

Giorno di consegna	N° lotti	N° immagini	N° lotti Arabica / Robusta	N° lotti Polished / Naturale / Lavato	Dataset
Giorno 1 (14 Aprile)	7	84	4 / 3	3 / 3 / 1	Training set
Giorno 2 (6 Giugno)	10	119	4 / 6	3 / 5 / 2	Training set
Giorno 3 (3 Luglio)	7	83	3 / 4	3 / 3 / 1	Test set day-3
Giorno 4 (28 Agosto)	7	84	3 / 4	3 / 3 / 1	Test set day-4

Durante la successiva fase di elaborazione i file di 2 immagini sono risultati danneggiati, pertanto il dataset definitivo è costituito da 370 immagini.

Le immagini iperspettrali sono state acquisite mediante un sistema NIR Spectral Scanner (DV Optics) formato da uno spettrometro Specim N17E accoppiato con una telecamera Xenics Xeva-1,7-320 (320 × 256 pixel). Il sistema di acquisizione lavora nel range spettrale 955-1700 nm con una risoluzione spettrale di 5 nm.

Tutte le immagini iperspettrali sono state sottoposte ad una calibrazione interna per ridurre la variabilità tra le immagini nel tempo [7] ed i pixel relativi allo sfondo sono stati rimossi.

Le immagini iperspettrali sono state quindi trasformate nelle tre tipologie di segnale monodimensionale prese in considerazione in questo studio, ottenendo così tre matrici di segnali: la matrice AS, la matrice SSH e la matrice CSH.

Informazioni più dettagliate sulla procedura utilizzata per la conversione delle immagini iperspettrali nelle tre tipologie di segnale sono riportate in Calvini et al., 2016 [6].

Prima della conversione, le immagini iperspettrali sono state suddivise in immagini di training ed immagini di test in base al giorno di consegna dei campioni. In particolare, le immagini di training comprendono le immagini acquisite nei primi due giorni di consegna, mentre le immagini di test corrispondono al terzo e quarto giorno di consegna. Questa suddivisione è stata fatta in modo tale da imitare le procedure di controllo che vengono messe in atto in un impianto industriale, dove modelli costruiti su dati storici vengono utilizzati per prevedere nuovi lotti in entrata.

L'analisi esplorativa delle tre matrici corrispondenti alle tre diverse tipologie di segnale è stata effettuata mediante PCA. In particolare, prima di effettuare la PCA la matrice AS è stata pretrattata mediante SNV e mean center, mentre le matrici SSH e CSH sono state pretrattate solamente con mean center.

Successivamente, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) è stato utilizzato come metodo di classificazione per discriminare i campioni di caffè verde in base alla varietà (Arabica / Robusta), ed in base al metodo di lavorazione dei chicchi (Polished / Naturale / Lavato). I modelli di classificazione sono stati calcolati considerando le tre tipologie di segnali sia separatamente che mediante tecniche di data fusion. In particolare, sono state valutate due diverse strategie di data fusion: data fusion Low level (Low-L), che consiste semplicemente nell'unire in sequenza le tre tipologie di segnale, e data fusion Mid level (Mid-L), che consiste nel concatenare features precedentemente in precedenza da ciascun blocco di dati separatamente [8]. In questo caso la data fusion Mid-L è stata effettuata unendo insieme gli scores ottenuti dai modelli PLS-DA calcolati separatamente per ogni tipologia di segnale.

Il numero ottimale di variabili latenti (LV) dei diversi modelli PLS-DA è stato individuato utilizzando una cross-validazione di tipo contiguous blocks con 17 gruppi di cancellazione, ciascuno contenente i segnali calcolati a partire da immagini di campioni appartenenti allo stesso lotto. I risultati dei modelli di classificazione sono stati valutati in termini di non-Error-Rate (NER), ovvero la percentuale di campioni correttamente attribuiti alla classe di appartenenza.

## Risultati e Discussione

In Figura 1 sono riportati i grafici degli score ottenuti dall'analisi esplorativa effettuata sulle matrici AS, SSH e CSH. Dai grafici degli score si evidenzia una buona separazione dei campioni in base alla varietà di caffè, soprattutto per gli AS e CSH (Figura 1.A e Figura 1.C). Inoltre, nel caso delle

matrici AS e CSH si può osservare anche un parziale raggruppamento dei campioni di caffè in base al metodo di lavorazione dei chicchi.

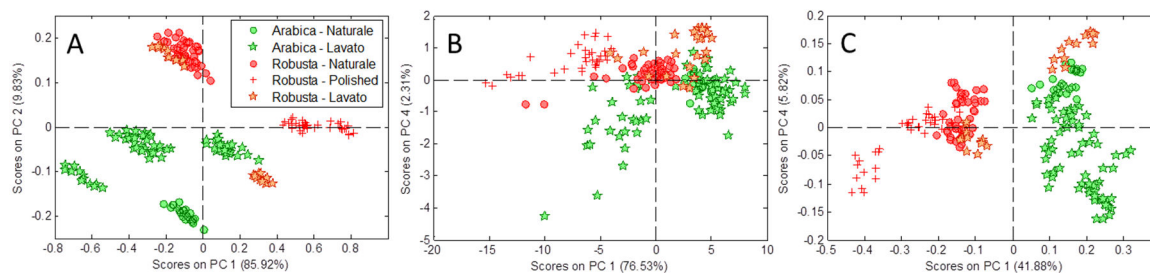


Figura 1 – Grafico degli score dei modelli PCA calcolati a partire dalle matrici AS (A), SSH (B) e CSH (C).

Dall'analisi dei residui, effettuata per tutti e tre i modelli PCA, è stato possibile osservare che la maggior parte delle immagini acquisite il quarto giorno di consegna dei campioni risultavano essere outlier, in quanto caratterizzate da elevati valori di Q. Inoltre, la presenza delle immagini outlier era più evidente per la matrice SSH rispetto alle altre due matrici di segnali. Per capire la causa del problema, queste immagini sono state analizzate più nel dettaglio effettuando la PCA su ogni immagine iperspettrale. Le immagini degli score di PCA hanno mostrato la presenza di bande verticali anomale. Un intervento di manutenzione effettuato sul sistema di acquisizione ha permesso di attribuire il problema ad un malfunzionamento del sistema di raffreddamento del sensore. A causa di questo inconveniente tecnico, i segnali calcolati a partire dalle immagini del quarto giorno di consegna dei campioni non sono state utilizzate nei successivi modelli di classificazione.

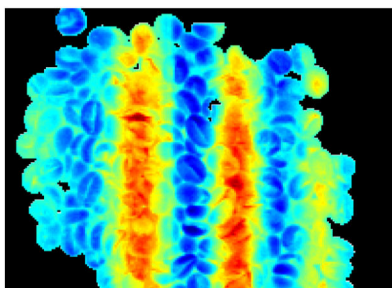


Figura 2 – Immagine degli score di PC 3 di un'immagine iperspettrale acquisita il quarto giorno di consegna

In Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti dai modelli PLS-DA calcolati per la classificazione dei campioni a seconda della varietà di caffè. Considerando i risultati in predizione sul test set, il miglior modello di classificazione è stato ottenuto a partire dagli iperspettrogrammi nello spazio comune che hanno permesso di classificare correttamente tutti i campioni (NER uguale a 100%). Considerando invece i risultati ottenuti dopo data fusion, i valori di NER ottenuti in predizione sono generalmente più elevati rispetto a quelli ottenuti con gli AS e SSH, mentre sono leggermente peggiori o uguali a quelli ottenuti con CSH.

Tabella 2 - Risultati dei modelli PLS-DA per la classificazione in Arabica e Robusta

Dataset	AS	SSH	CSH	Low-L	Mid-L	Mid-L
Pretrattamento	SNV + mean center	mean center	mean center	block-scale	block-scale	Autoscale
N° LV	4	4	3	4	2	1
Training	100,0	98,5	100,0	100,0	100,0	100,0
CV	99,5	93,1	94,1	94,1	94,1	100,0
Test	92,8	91,6	100,0	98,8	100,0	95,2

In Tabella 3 sono riportati i risultati dei modelli PLS-DA calcolati per la classificare i campioni nelle categorie Polished, Naturale e Lavato. In generale, la classificazione dei campioni di caffè in base al tipo di lavorazione è meno semplice rispetto alla classificazione in Arabica e Robusta. Considerando le tre tipologie di segnale analizzate separatamente, anche in questo caso i migliori

risultati in predizione sono stati ottenuti con gli CSH. La data fusion ha permesso di raggiungere un generale miglioramento dei risultati ed in questo caso il valore di NER in predizione più elevato è stato ottenuto mediante l'approccio Mid-L di data fusion dopo block-scale come pretrattamento.

Tabella 3 - Risultati dei modelli PLS-DA per la classificazione in Polished, Naturale e Lavato

Dataset	AS	SSH	CSH	Low-L	Mid-L	Mid-L
Pretrattamento	SNV + mean center	mean center	mean center	block-scale	block-scale	Autoscale
N° LV	2	4	3	4	4	3
Training	77,8	80,3	91,6	95,6	99,0	98,5
CV	75,4	69,5	83,3	74,9	91,1	96,1
Test	69,9	69,9	84,3	79,5	90,4	86,7

## Conclusioni

Nel presente lavoro è stata descritta l'applicazione di tecniche di riduzione dei dati iperspettrali a segnali monodimensionali che possono essere utilizzate per analizzare in maniera efficace dataset costituiti da numerose immagini iperspettrali. In particolare, immagini iperspettrali di campioni di caffè verde sono state convertite in tre diverse tipologie di segnali monodimensionali.

La conversione delle immagini in segnali ha permesso di ridurre drasticamente le dimensioni dei dati e di ottenere una rapida valutazione della struttura dell'intero dataset. In particolare, l'analisi esplorativa mediante PCA ha permesso di identificare la presenza di immagini difettose a causa di un guasto strumentale. La presenza di tali immagini è risultata più evidente nel caso degli iperspettrogrammi, suggerendo che questo approccio può essere utilizzato come uno strumento efficace il monitoraggio della stabilità del sistema di acquisizione.

Per quanto riguarda lo sviluppo di modelli di classificazione, in generale i modelli migliori sono stati ottenuti con gli CSH. Inoltre, nel caso di problemi di classificazione complessi come la classificazione dei campioni di caffè in base al metodo di lavorazione dei chicchi, l'uso congiunto di diversi metodi di 1D-DR mediante data fusion ha permesso di migliorare significativamente i risultati.

## Ringraziamenti

Gli autori ringraziano Luigi Bellucci (Caffè Molinari S.p.a) per aver fornito i campioni di caffè e per il supporto tecnico.

## Bibliografia

1. L.M. Dale, A.Thewis, C. Boudry, I. Rotar, P. Dardenne, V. Baeten, J.A.F. Pierna (2013). *Hyperspectral imaging applications in agriculture and agro-food product quality and safety control: A review*. Appl Spectrosc Rev. 48(2):142–159.
2. J. Burger, A.A. Gowen (2011) *Data handling in hyperspectral image analysis*. Chemom Intell Lab Syst., 108:13–22.
3. A.A. Gowen, F. Marini, C. Esquerre, C.P. O'Donnell, G. Downey, J. Burger (2011) *Time series hyperspectral chemical imaging data: challenges, solutions and applications*. Anal Chim Acta, 705, 272–282.
4. C. Ferrari, G. Foca, A. Ulrici (2013). *Handling large datasets of hyperspectral images: reducing data size without loss of useful information*. Anal Chim Acta 802:29–39.
5. C. Ferrari, G. Foca, R. Calvini, A. Ulrici (2015) *Fast exploration and classification of large hyperspectral image datasets for early bruise detection on apples*. Chemom Intell Lab Syst. 146:108–119.

6. R. Calvini, G. Foca, A. Ulrici (2016). *Data dimensionality reduction and data fusion for fast characterization of green coffee samples using hyperspectral sensors*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 1-16.-16
7. A. Ulrici, S. Serranti, C. Ferrari, D. Cesare, G. Foca, G. Bonifazi (2013). *Efficient chemometric strategies for PET–PLA discrimination in recycling plants using hyperspectral imaging*. *Chemom Intell Lab Syst.*, 122, 31–39.
8. E. Borràs, J. Ferré, R. Boqué, M. Mestres, L. Aceña, O. Busto (2015). *Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment – A review*, *Anal. Chim. Acta*, 891, 1-14

## MAPPATURA DELLA VITAMINA C IN IMMAGINI HS-NIR DI ACEROLA MEDIANTE CLS

Cristina Malegori <sup>1</sup>, Silvia Grassi <sup>1</sup>, Emanuel Marquez <sup>2</sup>, Sergio Tonetto de Freitas <sup>3</sup>, Ernestina Casiraghi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DeFENS Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università degli Studi di Milano – ITALY

<sup>2</sup> Department of Fundamental Chemistry, Federal University of Pernambuco– Recife (PE) – BRAZIL

<sup>3</sup> Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Semiárido, Petrolina (PE) – BRAZIL

### Riassunto

L'acerola è un frutto tropicale che può contenere fino al 4.5% di acido ascorbico. Benchè sia noto che il contenuto in vitamina diminuisca con il progredire della maturazione, non ci sono informazioni relativamente alla sua distribuzione nel frutto, il quale modifica il suo colore da verde a rosso durante la maturazione. Lo scopo di questo lavoro è la messa a punto di una metodologia in grado di fornire mappe di distribuzione spaziale della vitamina nell'acerola. A tale scopo sono state acquisite, mediante una SisUChema Spectral Camera (900 - 2500 nm), le immagini di 10 acerola tagliate: 4 verdi-acerbe, 2 gialle-intermedie, 4 rosse-mature. Uno spettrometro FT-NIR, equipaggiato con ATR (12000 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ ), è stato utilizzato, invece, per acquisire gli spettri di assorbimento di aliquote di succo di acerola addizionato con vitamina C in polvere, da 0% a 5% di concentrazione peso/volume. Dopo il pre-processamento degli spettri, mediante SNV e derivata prima, e la rimozione dello sfondo dalle immagini, sono state selezionate le lunghezze d'onda comprese tra 7100 e 6700  $\text{cm}^{-1}$  caratteristiche per l'assorbimento della vitamina, per un totale di 17 variabili. Su tale matrice è stata condotta una indagine esplorativa mediante PCA che ha consentito di individuare una corrispondenza tra gli *scores* di PC2 e gli spettri del succo arricchito. L'applicazione dell'algoritmo CLS ha consentito di sviluppare mappe di concentrazione della vitamina C sulla superficie del frutto (*non-negativity*, LOF=1.87%), utilizzando come spettro di riferimento il succo aggiunto del 5%. L'applicazione di NIR-HSI risulta essere un approccio promettente per la valutazione della distribuzione di acido ascorbico nell'acerola, specialmente selezionando le bande di assorbimento correlate a questa vitamina. L'algoritmo CLS ha consentito di visualizzare la distribuzione nelle diverse aree del frutto, confermando una diminuzione della concentrazione di vitamina durante la maturazione e modificazione di colore.

**Acknowledgement:** The authors would like to thanks INCTAA/CNPq/FAPESP and NUQAAPE/FACEPE for the financial support and, in particular, Fernanda Pimentel and Celio Pasquini for the hosting support in their laboratories.

# DALL'IMAGING IPERSPETTRALE ALL'IMAGING MULTISPETTRALE: IDENTIFICAZIONE DEI CANALI SPETTRALI UTILI PER LA COSTRUZIONE DI SISTEMI MULTISPETTRALI NIR CON ELEVATE PRESTAZIONI

Rosalba Calvini<sup>1</sup>, Jose Manuel Amigo<sup>2</sup>, Alessandro Ulrici<sup>1</sup> \*

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Vita – Università di Modena e Reggio Emilia – Pad. Besta Via Amendola 2, 42122 Reggio Emilia. E-mail: [alessandro.ulrici@unimore.it](mailto:alessandro.ulrici@unimore.it)

<sup>2</sup>Department of Food Science, Faculty of Sciences, University of Copenhagen, Rolighedsvej 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark

Presenting Author

[\\*alessandro.ulrici@unimore.it](mailto:*alessandro.ulrici@unimore.it)

## Riassunto

L'imaging multispettrale nel vicino infrarosso (NIR) è uno strumento affidabile per l'implementazione di sistemi di monitoraggio on-line a costi contenuti. In generale, un sistema di imaging multispettrale viene sviluppato sulla base di regioni identificate come significative a partire da dati di natura iperspettrale; tuttavia, il trasferimento dei risultati da sistemi di imaging iperspettrale a sistemi di imaging multispettrale non è semplice e, in particolare, non è affatto facile mantenere le stesse prestazioni. Per questi motivi, questo lavoro presenta un approccio volto all'identificazione dei canali spettrali più adatti ai fini della discriminazione tra chicchi di caffè verde delle varietà Arabica e Robusta.

Inizialmente sono state analizzate immagini iperspettrali acquisite nel NIR (955-1700 nm) mediante sparse Partial Least Squares-Discriminant Analysis (sPLS-DA), per identificare le regioni spettrali maggiormente coinvolte nella discriminazione tra le due varietà di caffè. Successivamente, sono stati scelti quattro filtri passa-banda disponibili in commercio, le cui caratteristiche mostravano la migliore corrispondenza con le regioni spettrali precedentemente identificate, e sulla base delle loro caratteristiche sono stati simulati i valori di riflettanza di un sistema multispettrale. Sono state quindi calcolate variabili aggiuntive a partire dai quattro valori di riflettanza dei filtri, al fine di tenere in considerazione relazioni lineari e non lineari tra i diversi canali spettrali; infine, mediante sPLS-DA sono stati identificati i descrittori ottimali. L'impiego di un training set rappresentativo e la scelta di descrittori idonei ha permesso di ottenere risultati in classificazione paragonabili a quelli ottenuti partendo dai dati iperspettrali, sia a livello di immagine (cioè considerando ogni immagine nel suo complesso) che a livello di pixel (cioè considerando la classificazione di ogni singolo pixel).

## Introduzione

Arabica e Robusta sono le principali specie di caffè utilizzate, sia da sole che in miscela, per la preparazione di questa bevanda. Il caffè Arabica è più costoso ed è considerato di qualità superiore rispetto al Robusta, pertanto la disponibilità di metodi analitici rapidi e non distruttivi che permettano di discriminare correttamente le due specie di caffè e prevenire possibili adulterazioni potrebbe costituire uno strumento molto per la repressione di eventuali frodi.

In questo contesto, l'imaging iperspettrale può risultare estremamente efficace; tuttavia, nonostante i numerosi vantaggi di questa tecnica, l'implementazione dell'imaging iperspettrale per sistemi di monitoraggio in tempo reale è attualmente limitata dai costi elevati delle fotocamere iperspettrali e da problemi relativi alla gestione ed all'elaborazione dell'enorme mole di dati che vengono acquisiti



in tempi brevissimi [1]. Per questi motivi, spesso vengono applicate ai dati iperspettrali tecniche di selezione di variabili al fine di indentificare poche ma significative lunghezze d'onda da utilizzare per lo sviluppo di sistemi di imaging multispettrale, che sono più veloci e decisamente più economici [2].

Tuttavia, il trasferimento dei risultati derivanti da una selezione di variabili effettuata su un sistema iperspettrale ad un sistema multispettrale basato su filtri non è affatto banale. Infatti, nelle immagini multispettrali ogni pixel contiene solo valori discreti (medie pesate) di riflettanza misurati in corrispondenza di ciascun intervallo spettrale considerato, e non uno spettro come avviene invece nel caso delle immagini iperspettrali. D'altra parte, il numero ristretto di canali multispettrali consente di considerare anche descrittori aggiuntivi calcolati a partire dai valori di riflettanza dei diversi filtri, al fine di considerare anche l'eventuale presenza di relazioni lineari e non lineari tra canali spettrali.

In questo contesto, il presente lavoro si pone quindi l'obiettivo di investigare le problematiche relative allo sviluppo di un modello di classificazione per un sistema multispettrale volto alla discriminazione di campioni di caffè verde delle due specie Arabica e Robusta, partendo dai risultati di un modello ottenuto da dati iperspettrali. In particolare, l'approccio considerato è stato prevalentemente focalizzato su due aspetti: la selezione dei descrittori di maggior rilevanza per la classificazione e la scelta di un training set rappresentativo.

## Materiali e Metodi

In questo studio sono stati considerati 33 diversi lotti di caffè verde: 18 appartenenti alla specie Robusta e 15 appartenenti alla specie Arabica. Per ogni lotto sono state acquisite 12 immagini iperspettrali ottenendo un dataset costituito da 396 immagini.

Le immagini iperspettrali sono state acquisite utilizzando un sistema NIR Spectral Scanner (DV Optic) costituito da uno spettrometro Specim N17E accoppiato ad una fotocamera Xenics Xeva-1.7-320 (320 × 256 pixel). Il sistema iperspettrale lavora nel range spettrale 955-1700 nm con una risoluzione spettrale di 5 nm.

Prima di procedere con l'analisi, le immagini iperspettrali sono state elaborate tramite una calibrazione interna al fine di ridurre la variabilità nel tempo e, successivamente, i pixel relativi allo sfondo sono stati rimossi. Ulteriori dettagli sull'elaborazione delle immagini effettuata per questo dataset sono stati riportati in Calvini et al., 2015 [3].

I 33 lotti di caffè sono stati suddivisi in maniera casuale in un training set comprendente 24 lotti (11 lotti di caffè Arabica e 13 lotti di caffè Robusta, per un totale di 288 immagini) ed in un test set comprendente 9 lotti (4 lotti di caffè Arabica e 5 lotti di caffè Robusta, per un totale di 108 immagini).

Le immagini iperspettrali dei campioni appartenenti ai lotti di training sono state utilizzate per costruire due diverse matrici di spettri: un training set di Spettri Medi (Average Spectra, AS), ottenuto calcolando lo spettro medio di ogni immagine, e un training set di Spettri Random (Random Spectra, RS), ottenuto selezionando casualmente 50 spettri da ogni immagine. Poiché ogni immagine iperspettrale è composta di decine di migliaia di spettri, i training set AS e RS rappresentano due diverse strategie che possono essere adottate per costruire un training set di dimensioni ridotte ma pur sempre rappresentativo a partire dall'enorme mole di dati contenuta nelle immagini. In particolare, il training set AS viene costruito partendo dal presupposto che lo spettro medio sia rappresentativo dell'intera immagine, tuttavia l'informazione spaziale viene persa; il training set RS permette invece di ridurre la dimensione dei dati ed allo stesso tempo di tenere in considerazione la variabilità spaziale di ogni immagine.

Le immagini iperspettrali dei lotti di test sono state utilizzate per calcolare un test set di spettri medi al fine di valutare i modelli di classificazione a livello di immagine, ovvero considerando ogni immagine nel complesso. Inoltre, due immagini dei campioni di test, una di caffè Arabica e una di caffè Robusta, sono state unite insieme per ottenere un'unica immagine test usata per valutare i risultati della classificazione anche a livello di pixel, ovvero andando a valutare l'attribuzione di ogni singolo pixel.

In primo luogo, Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) e sparse PLS-DA (sPLS-DA) [4] sono stati applicati sul training set AS per calcolare i modelli di classificazione e, nel caso di sPLS-DA, per effettuare la selezione delle variabili spettrali significative. Gli spettri medi sono stati pretrattati utilizzando Standard Normal Variate, derivata prima e mean centering.

Successivamente, a partire dal modello di classificazione e selezione di variabili calcolato sui dati iperspettrali, sono stati identificati 4 filtri passa banda disponibili in commercio (centrati rispettivamente a 1150, 1200, 1250 e 1400 nm), considerando come criterio la miglior corrispondenza con le zone spettrali selezionate sui dati iperspettrali mediante sPLS-DA. I dataset iperspettrali sono stati quindi trasformati in dati multispettrali in modo tale da avere una stima dei valori di riflettanza che sarebbero stati ottenuti se gli stessi campioni fossero stati acquisiti utilizzando i filtri considerati. A questo scopo il profilo gaussiano di ogni filtro è stato calcolato a partire dalle proprietà del filtro stesso fornite dalla casa costruttrice, ovvero lunghezza d'onda centrale (central wavelength, CWL), larghezza del filtro a metà altezza (full width at half maximum, FWHM) e massimo del picco (peak transmission, PT). Il profilo gaussiano è stato poi moltiplicato per gli spettri acquisiti con il sistema iperspettrale ed è stata calcolata la somma dei valori ottenuti. In questo modo i dati iperspettrali costituiti da 150 variabili sono stati trasformati in dati multispettrali costituiti da 4 variabili, dove ogni variabile è il valore di riflettanza di un determinato canale multispettrale (R1150, R1200, R1250, R1400). Inoltre, a partire dai quattro valori di riflettanza dei filtri sono stati calcolati dei descrittori aggiuntivi al fine di considerare interazioni lineari e non lineari tra i diversi canali spettrali. In particolare sono stati calcolati il quadrato del valore di riflettanza di ogni canale e differenze, somme, rapporti e prodotti tra coppie di canali. I dataset così ottenuti sono composti da 32 variabili: i quattro valori di riflettanza dei filtri ed i descrittori aggiuntivi. Sono stati quindi calcolati modelli di classificazione usando sia PLS-DA che sPLS-DA; quest'ultimo metodo è stato utilizzato per identificare i descrittori più importanti. In questo caso i modelli di classificazione sono stati calcolati utilizzando sia il training set AS che il training set RS e i dati sono stati autoscalati prima dell'analisi.

Sia per i dati iperspettrali che per i dati multispettrali, il numero ottimale di variabili latenti (LVs) e, per sPLS-DA, il numero di variabili da selezionare per ogni componente sono stati selezionati mediante cross validazione. In particolare, è stato adottato un metodo di cross validazione a blocchi contigui con 4 gruppi di cancellazione, dove ogni gruppo conteneva gli spettri medi (per il training set AS) o gli spettri selezionati casualmente (per il training set RS) di tutte le immagini di 6 lotti. I risultati dei modelli di classificazione così ottenuti sono stati valutati in termini di efficienza, definita come media geometrica dei parametri sensibilità e specificità [3].

In Figura 1 è riportata la procedura seguita in questo lavoro, a partire dalla selezione di variabili effettuata sui dati iperspettrali fino alla selezione delle condizioni ottimali per il sistema multispettrale simulato.

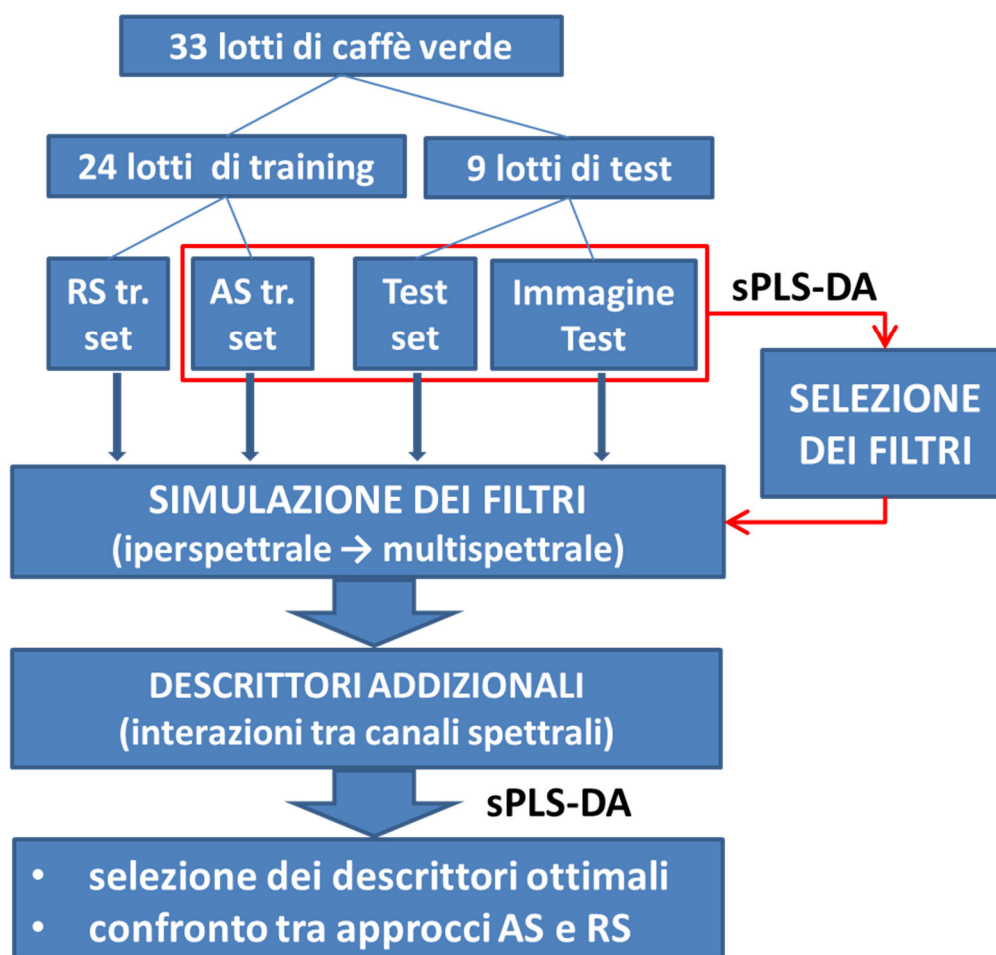


Figura 1 – Rappresentazione schematica della procedura adottata per il trasferimento dei risultati da un sistema di imaging iperspettrale ad un sistema di imaging multispettrale

## Risultati e Discussione

Per quanto riguarda la selezione di variabili effettuata sui dati iperspettrali, sono stati calcolati diversi modelli sPLS-DA provando tutte le combinazioni tra un numero di variabili latenti da 1 a 7 ed un numero di variabili da selezionare per ogni componente da 5 a 150. Sulla base dei valori di efficienza ottenuti in cross validazione, la condizione ottimale è stata riscontrata in corrispondenza del modello sPLS-DA calcolato con 2 variabili latenti e 10 variabili per ogni componente. Questa situazione corrisponde ad un vettore di regressione in cui solo 20 variabili delle 150 variabili originali hanno coefficienti diversi da zero.

Rispetto a PLS-DA, sPLS-DA ha permesso di ottenere modelli più parsimoniosi mantenendo analoghi risultati in classificazione (Tabella 1, dati iperspettrali). In particolare, sia per PLS-DA che per sPLS-DA è stato ottenuto un valore di efficienza del 100% in predizione sul test set, mentre sPLS-DA ha dato risultati leggermente peggiori per la predizione a livello di pixel, poiché il modello sparse è risultato essere più sensibile a problemi derivanti dalla forma dei chicchi di caffè.

Le regioni spettrali selezionate da sPLS-DA sono correlate con il secondo overtone del legame C-H aromatico (1143 nm) e alifatico (1195-1225 nm) e con il primo overtone del legame O-H degli alcoli aromatici (1410 nm) e alifatici (1420 nm). La significatività di queste regioni spettrali è stata confermata anche dai risultati ottenuti applicando altri metodi sparse sullo stesso dataset [3].

Tabella 1- Risultati di classificazione ottenuti dai modelli PLS-DA e sPLS-DA applicati ai dati iperspettrali e multispettrali

Dati Iperspettrali		Dati Multispettrali			
PLS-DA	sPLS-DA	PLS-DA		sPLS-DA	
		AS tr. set	RS tr. set	AS tr. set	RS tr. set

# var	150	20	32	32	4	4
# LVs	3	2	3	3	2	2
EFF <sub>CAL</sub>	100.0	99.4	100.0	80.3	99.6	78.4
EFF <sub>CV</sub>	97.8	99.3	99.3	78.7	97.3	78.0
EFF <sub>TEST</sub>	100.0	100.0	97.5	100.0	98.3	100.0
EFF <sub>IMG</sub>	85.0	80.2	71.1	71.0	69.5	83.9

Per quanto riguarda la simulazione dei dati multispettrali, a partire da entrambi i training set (training set AS e training set RS) sono stati testati diversi modelli sPLS-DA considerando tutte le combinazioni tra un numero di variabili latenti da 1 a 5 ed un numero di variabili da selezionare su ogni componente da 2 a 32. Anche in questo caso è stata considerata l'efficienza in cross validazione per ottimizzare i parametri del modello. Sia per il training set AS che per il training set RS le condizioni ottimali sono state riscontrate in corrispondenza del modello calcolato con 2 variabili latenti e 2 variabili per ogni componente, ottenendo dei vettori di regressione con solo 4 variabili selezionate.

In particolare, tre descrittori sono stati selezionati da entrambi i modelli sparse: R1250-R1200, R1400-R1200 e R1200/R1250. Inoltre, i descrittori R1400-R1250 e R1400-R1150 sono stati selezionati dai modelli sparse calcolati rispettivamente dal training set AS e dal training set RS.

In generale, rispetto al modello PLS-DA calcolato considerando tutte le 32 variabili, la selezione dei descrittori più importanti ha portato ad un significativo miglioramento dei risultati in predizione, soprattutto per il modello calcolato a partire dal training set RS. Infatti, nonostante le peggiori performance in calibrazione e cross validazione, il training set RS ha permesso di ottenere valori di efficienza in predizione più alti sia per il test set (100%) che per l'immagine test (83,9 %).

La Figura 2 mostra le differenze di predizione sull'immagine di test tra il modello sPLS-DA calcolato a partire da dati iperspettrali e il modello sPLS-DA calcolato a partire dai dati multispettrali con il training set RS. La maggior parte dei chicchi è classificata correttamente in entrambi i casi (pixel colorati in verde) anche se un chicco di caffè Robusta viene sempre classificato erroneamente. È interessante notare che il modello calcolato sui dati iperspettrali fornisce generalmente risultati migliori per la specie Arabica, mentre il modello calcolato con i dati multispettrali permette di classificare meglio la specie Robusta. In entrambi i casi le attribuzioni errate sono prevalentemente dovute a problemi relativi alla forma arrotondata dei chicchi o alla presenza del taglio centrale.

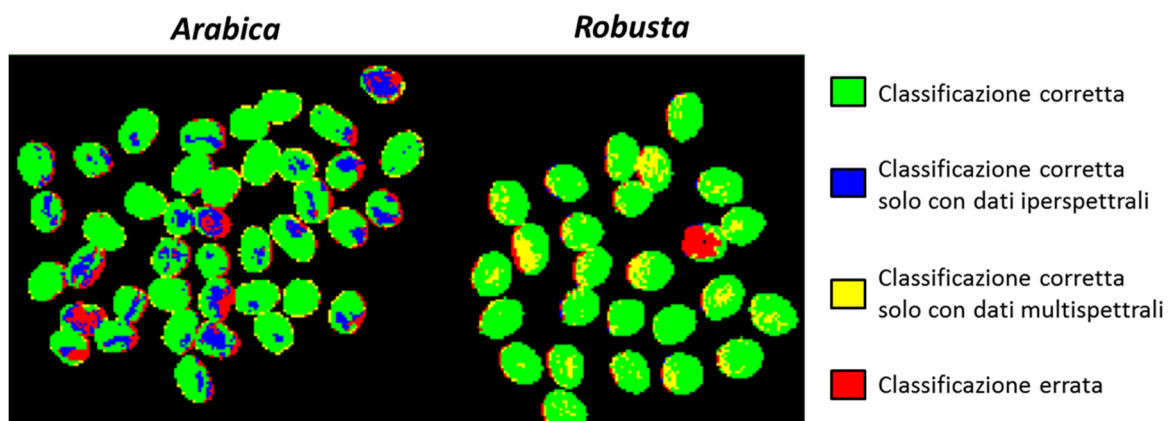


Figura 2 – Differenze tra le predizioni sull'immagine di test ottenute con i migliori modelli sPLS-DA calcolati utilizzando i dati iperspettrali e multispettrali

## Conclusioni

In questo studio sono stati investigati i problemi riguardanti lo sviluppo di un modello di classificazione basato su sistema di imaging multispettrale a partire dal risultato di una procedura di selezione di variabili effettuata su dati iperspettrali.

In aggiunta ai singoli valori di riflettanza dei filtri, le simulazioni effettuate hanno permesso di valutare anche interazioni tra i diversi canali spettrali.

In questo modo, grazie alla combinazione degli opportuni descrittori e all'uso di un training set rappresentativo è stato possibile ottenere risultati soddisfacenti nella discriminazione tra campioni di caffè delle specie Arabica e Robusta, raggiungendo performance simili a quelle ottenute con i dati iperspettrali sia a livello di immagine che a livello di pixel.

Più in generale, questo tipo di approccio permette di valutare l'effettivo potenziale di un sistema di imaging multispettrale prima che il sistema stesso sia effettivamente costruito.

### **Ringraziamenti**

Gli autori ringraziano il Dott. Luigi Bellucci (Caffè Molinari S.p.A) per aver fornito i campioni di caffè e per il supporto tecnico.

### **Bibliografia**

1. J. Burger, A. Gowen (2011). *Data handling in hyperspectral image analysis*, Chemom. Intell. Lab. Syst., 108, 13-22.
2. H. Pu, M. Kamrizzman, D.W. Sun, (2015). *Selection of feature wavelengths for developing multispectral imaging systems for quality, safety and authenticity of muscle foods – a review*, Trends Food Sci. Tech., 45, 86-104.
3. R. Calvini, A. Ulrici, J.M. Amigo (2015). *Practical comparison of sparse methods for classification of Arabica and Robusta coffee species using near infrared hyperspectral imaging*, Chemom. Intell. Lab. Syst., 146, 503-511.
4. K.A. Lê Cao, S. Boitard, P. Besse (2011). *Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems*, BMC Bioinformatics, 12, 253-269.

## USO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER RILEVARE IL CONTENUTO DI CROSTA IN FORMAGGIO PARMIGIANO-REGGIANO GRATTUGIATO

Stefania Barzaghi<sup>1\*</sup>, Sara Michelini<sup>2</sup>, Katia Cremonesi<sup>1</sup>, Marco Nocetti<sup>2</sup>, Laura Marinoni<sup>1</sup>, Giovanni Cabassi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CREA- FLC - via A.Lombardo,11 26900 LODI

<sup>2</sup>Servizio Tecnico Consorzio del formaggio Parmigiano Reggiano – via J.F. Kennedy,18 42100 REGGIO E.

\*stefania.barzaghi@crea.gov.it

### Riassunto

Il formaggio a pasta dura Parmigiano Reggiano D.O.P. è un prodotto territoriale le cui caratteristiche di pregio sono connesse al rispetto di una tecnologia di produzione consolidata. Il monitoraggio della qualità garantisce il rispetto dei requisiti che lo rendono unico. Dal disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano risulta che per avere la denominazione nel prodotto grattugiato la quantità di crosta presente non deve superare il 18% sul totale del prodotto.

Scopo del presente lavoro era confermare l' idoneità della spettroscopia NIR nell'individuazione della percentuale di crosta presente nel prodotto grattugiato.

Prove preliminari sono state condotte miscelando porzioni provenienti da lotti diversi di croste lavate e di paste di parmigiano grattugiato. In totale sono state ottenute 67 miscele con percentuali di crosta aggiunta fino ad un massimo del 50%.

Le miscele, poste in capsule Petri, sono state analizzate con spettrometro FT-NIR NIRFlex 500 in riflettanza nell'intervallo spettrale tra 10000 e 4000 cm<sup>-1</sup>.

Allo scopo di costruire un modello di predizione indipendente dal differente tenore di umidità delle due componenti della miscela e che rilevi le differenze della maturazione di crosta e pasta dovute alla proteolisi, le regioni spettrali degli assorbimenti dei gruppi ossidrilici sono state escluse dal modello. Il miglior modello è stato ottenuto con 5 LV, pretrattando gli spettri con derivata prima SG; gli errori ottenuti sono stati RMSEC: 1.25, RMSECV: 1.86 e RMSEP: 3.37 (p/p).

Un modello ausiliario, calcolato con spettri ottenuti dalle medesime miscele sottoposte ad un processo di liofilizzazione con umidità residua del 1,6% ha confermato la capacità predittiva della tecnica NIR indipendentemente dal contributo del contenuto idrico dei costituenti la miscela con RMSEC: 0.99, RMSECV: 1.83 e RMSEP: 3.58 (p/p).

## Introduzione

Il formaggio a pasta dura Parmigiano Reggiano D.O.P. è un prodotto territoriale le cui caratteristiche di pregio sono connesse al rispetto di una tecnologia di produzione consolidata. Il monitoraggio della qualità garantisce il rispetto dei requisiti che lo rendono unico. Dal disciplinare di produzione del formaggio Parmigiano Reggiano risulta che per avere la denominazione nel prodotto grattugiato la quantità di crosta presente non deve superare il 18% sul totale del prodotto [1].

Diverse tecniche di analisi sono state proposte con l'obiettivo di quantificare la percentuale di crosta presente in miscela con la componente pasta, tra cui l'utilizzo dell'elettroforesi capillare [2] e la waveguide dielectric spectroscopy[3].

Tra le tecniche utili allo scopo è stata proposta anche la spettroscopia NIR data la sua versatilità e la possibilità di essere utilizzata per analisi da effettuarsi on-line[4,5].

Il presente studio è stato condotto per confermare l'idoneità della spettroscopia NIR nell'individuazione della percentuale di crosta presente nel prodotto grattugiato in prospettiva di un suo possibile impiego per l'individuazione di frodi alimentari.

## Materiali e Metodi

Le prove sono state condotte miscelando porzioni provenienti da lotti diversi di croste lavate e di paste di parmigiano grattugiate provenienti da forme con periodi di maturazione da 15 a 30 mesi. In totale sono state ottenute 67 miscele (p/p) con percentuali di crosta aggiunta fino ad un massimo del 50%. Le letture allo spettrometro sono state fatte in giorni differenti a temperatura ambiente. È stato utilizzato uno spettrometro FT-NIR (NIRFlex N500, Büchi Italia Srl) equipaggiato con accessorio per letture del campione in capsule Petri. Gli spettri, sono stati acquisiti in riflettanza nell'intervallo  $4000-10000\text{ cm}^{-1}$ , con risoluzione di  $8\text{ cm}^{-1}$ , e 32 scansioni. Per ogni campione sono state fatte 3 letture e i risultanti spettri sono stati mediati e trasformati in assorbanza per le successive elaborazioni.

I campioni sono stati raggruppati in due set indipendenti, uno per la costruzione dei modelli l'altro per la loro validazione.

I medesimi campioni sono stati successivamente liofilizzati fino ad un contenuto di umidità residua di 1.6% e rilette utilizzando le medesime impostazioni.

I modelli sono stati calcolati utilizzando il software PLS\_Toolbox ver 8.1 (Eigenvector Research, Inc.)

## Risultati e Discussione

Allo scopo di costruire un modello di predizione indipendente dal differente tenore di umidità, poiché questo parametro è strettamente dipendente anche dal periodo e dalle condizioni di stagionatura, le regioni spettrali degli assorbimenti dei gruppi ossidrilici, caratteristici dell'acqua, sono state escluse dal modello.

Sono stati inoltre considerati diversi algoritmi di pretrattamento degli spettri per eliminare differenze di assorbanza tra i campioni dovute all'effetto scattering della luce.

Il modello con le migliori performance, ovvero con errori di predizione più bassi, è stato ottenuto pretrattando gli spettri applicando una derivata prima, secondo il metodo di Savitzky-Golay (2nd order, 21 punti), seguita da un centraggio degli spettri rispetto alla media.

Il modello scelto considera 5 Variabili Latenti e assorbimenti nell'intervallo spettrale da 1953nm a

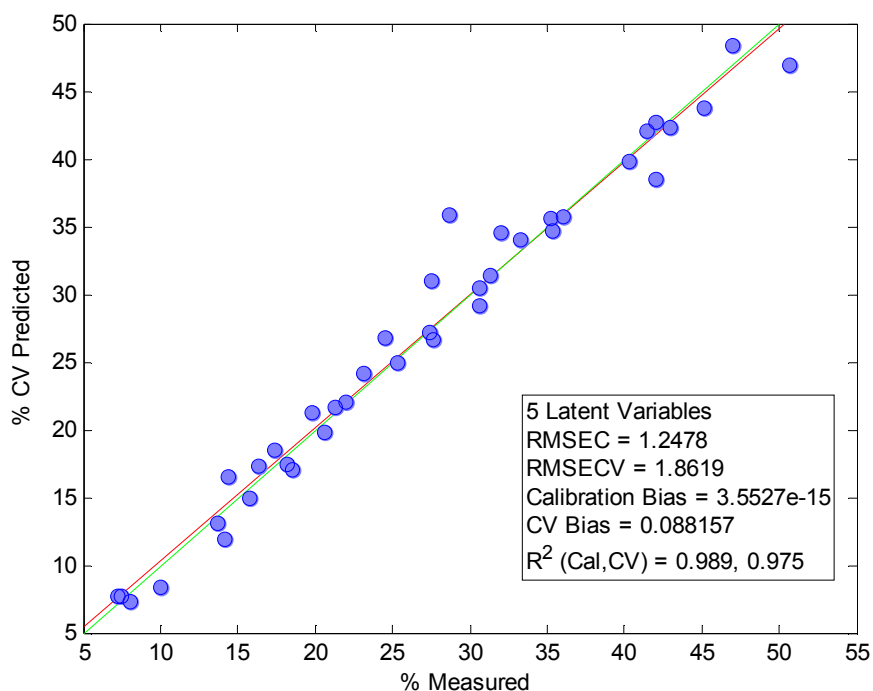


Figura 1- Percentuale di crosta aggiunta vs valori predetti del set di campioni di calibrazione e performance del modello scelto

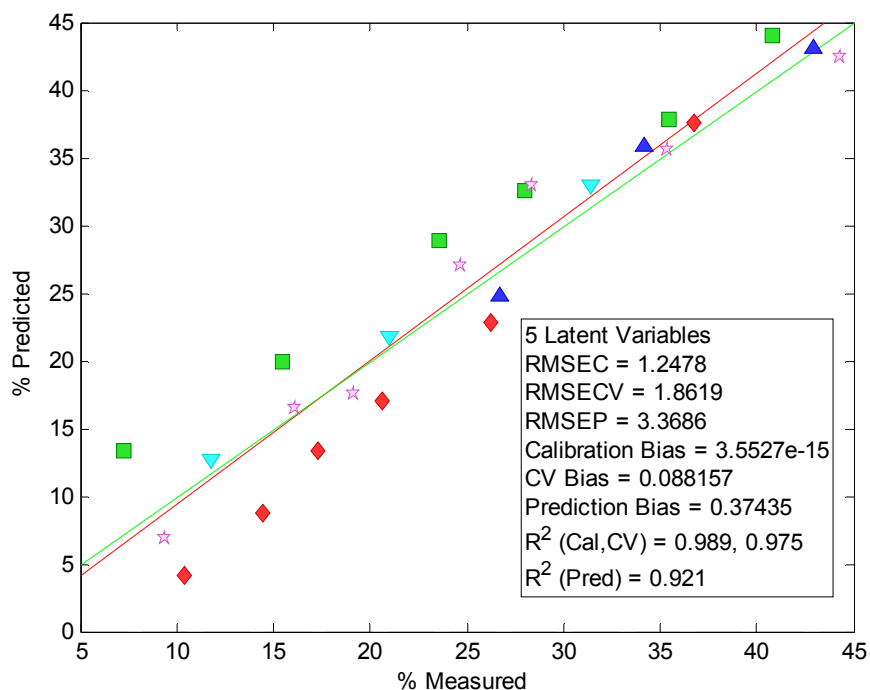


Figura 2- Percentuale di crosta aggiunta vs valori predetti del set di campioni di validazione e performance di predizione



2500nm; l'errore medio in cross-validazione (RMSECV) è risultato pari a 1.86 %, in un intervallo di percentuale di crosta aggiunta che va da 7,5% a 50.7%, e il coefficiente di determinazione della retta tra valori reali vs valori predetti è risultato pari a 0.975 (Figura 1).

La predizione della percentuale di crosta aggiunta in miscele appartenenti al set di validazione ha presentato un errore medio maggiore, RMSEP= 3.37%, sebbene i campioni che hanno mostrato errori più alti siano le miscele con una bassa percentuale di aggiunta di crosta (Figura 2), spesso al di sotto del limite di legge (18%).

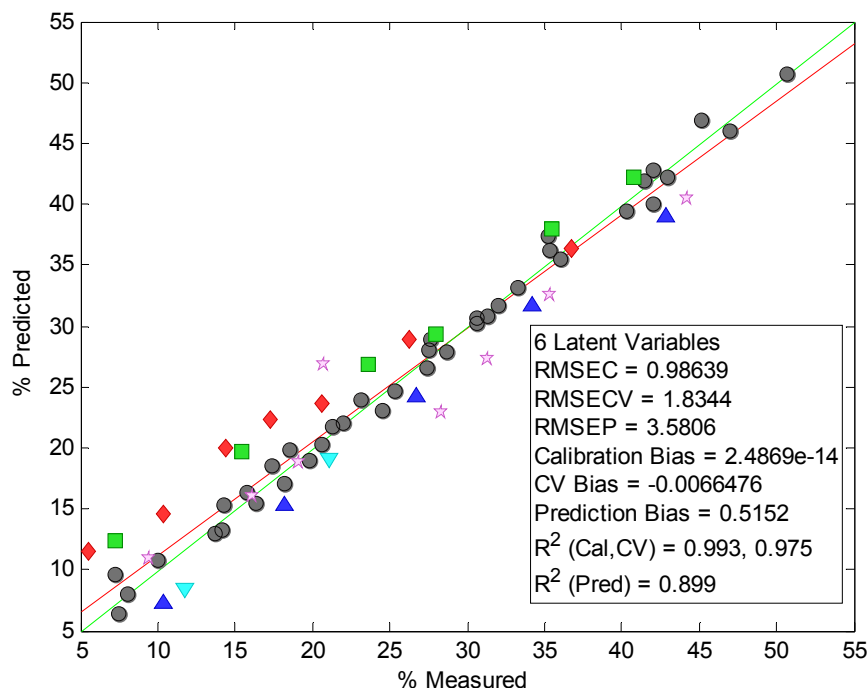


Figura 3- Percentuale di crosta aggiunta vs valori predetti di campioni con 1,6% umidità relativa e performance del modello. Il colore nero indica campioni appartenenti al set di calibrazione, i campioni colorati appartengono al set di campioni di validazione

Un modello ausiliario, calcolato con spettri ottenuti dalle medesime miscele sottoposte ad un processo di liofilizzazione con umidità residua del 1,6% ha confermato la capacità predittiva della tecnica NIR indipendentemente dal contributo del contenuto idrico dei costituenti la miscela con RMSEC: 0.99, RMSECV: 1.83 e RMSEP: 3.58 (Figura 3)

## Conclusioni

Dai risultati ottenuti si è avuta un'ulteriore conferma della validità della spettroscopia NIR nell'individuare il contenuto di crosta nel grattugiato.

Inoltre è stata verificata la possibilità di utilizzare, nella costruzione del modello, zone spettrali non direttamente influenzate dal contenuto di umidità del campione, che è un parametro dipendente, tra l'altro, dalle condizioni di conservazione del campione stesso.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato parzialmente svolto nell'ambito del progetto "Strumenti di supporto per la valutazione del rischio di frodi dei prodotti agroalimentari" finanziato da Ministero delle Politiche agricole alimentari e forestali DD.MM. n. 24267 del 17/11/2010, n. 13973 del 16/05/2012, n. 23790 del 12/11/2013.

Si ringrazia il dott. Gianluca Gambini per il prezioso contributo fornito.

### **Bibliografia**

1. [http://www.parmigianoreggiano.it/consorzio/disciplinare\\_produzione\\_vigente\\_2011/default.aspx](http://www.parmigianoreggiano.it/consorzio/disciplinare_produzione_vigente_2011/default.aspx)
2. L. Pellegrino, A. Tirelli, i. De Noni, P. Resmini (2003) *Valutazione del grana Padano Grattugiato attraverso determinazione per elettroforesi capillare di frazioni caseiniche e di loro peptidi di degradazione*, Sci. Tecn. Latt.-Cas., 54, 321-333.
3. C. Cevoli, L. Ragni , A. Gori, A. Berardinelli , M.F. Caboni (2012) *Quality parameter assessment of grated Parmigiano–Reggiano cheese by waveguide spectroscopy*, Journal of Food Engineering, 113, 201–209.
4. V. Musi, A. Filippi (2015) *La tecnologia VIS-NIR online nel controllo del contenuto di crosta nel grattugiato di Parmigiano Reggiano* Sci. Tecn. Latt.-Cas., 66, 107-110.
5. Cevoli C., Fabbri A., Gori A., Caboni M.F., Guarnieri A. (2013) *Screening of grated cheese authenticity by NIR spectroscopy*, Journal of Agricultural Engineering , 44, e53, 264-267

# POTENZIALE DELLA TECNICA NIR PER LA CLASSIFICAZIONE DI DIVERSI TRATTAMENTI DELIGNIFICANTI SU BIOMASSE LIGNOCELLULOSICHE: IL CASO STUDIO DEL RACHIDE DI BANANA.

Giovanni Dedenaro<sup>1</sup>, Christian Fabricio Larenas Uria<sup>2</sup>, Stefania Costa<sup>1</sup>, Paola Pedrini<sup>1</sup>, Elena Tamburini<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie – Università di Ferrara – Via L. Borsari, 46 44121 Ferrara

<sup>2</sup> Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador

Giovanni Dedenaro

\*Corresponding email

## Riassunto

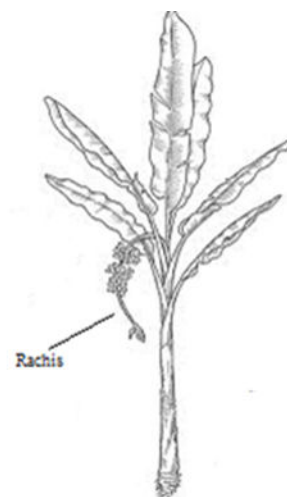
I pretrattamenti di delignificazione sono uno step fondamentale di qualunque processo che utilizzi materiali lignocellulosici, e hanno lo scopo di rendere accessibile cellulosa ed emicellulosa per ulteriori conversioni. Attualmente tutti i metodi di delignificazione che sono disponibili a livello industriale (i.e., *steam explosion*, lavaggio alcalino, idrolisi acida, *ammonia explosion*, trattamenti a base di *organosolv*, wet oxidation) prevedono una modificazione chimico/fisica della struttura della biomassa, che dipende dalla quantità di lignina presente e dall'effetto del trattamento sulla matrice vegetale. La spettroscopia NIR basata su modelli qualitativi messi a punto attraverso *cluster analysis* e PCA, ha permesso di realizzare uno studio qualitativo su rachide di banana (residuo agricolo lignocellulosico) sottoposto a diversi pretrattamenti delignificanti. In particolare i campioni di rachide essiccati e macinati sono stati sottoposti a trattamento con *organosolv* (etil-acetato, acetone, etanolo), delignificazione ossidativa con ipoclorito di sodio e con una soluzione elettrochimicamente attivata di cloro attivo (ECA), e confrontati con il campione non trattato, con lo scopo di evidenziare eventuali similitudini o differenze nelle caratteristiche strutturali della matrice a seguito dei trattamenti. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$  utilizzando uno strumento NIRFlex® N-500 (Buchi, Svizzera), così come tutte le elaborazioni chemiometriche, inclusi i pretrattamenti, sono state eseguite con NIRCAl® 5.4 (Buchi, Svizzera). Per la costruzione del set di calibrazione sono stati utilizzati 66 spettri, 32 per la validazione blockwise. I modelli di calibrazione hanno permesso di raggruppare in *clusters* statisticamente separati i campioni sottoposti ai diversi tipi di pretrattamenti, a parità di pretrattamento a tempi di pretrattamento diversi, e a diverse combinazioni di pretrattamenti. La spettroscopia FT-NIR mostra perciò un notevole potenziale come tecnica analitica per la caratterizzazione qualitativa di campioni lignocellulosici. I modelli messi a punto possono rappresentare la base per la successiva costruzione di modelli quantitativi per la determinazione del contenuto di lignina.

## Introduzione

Le biomasse lignocellulosiche stanno diventando un'alternativa sempre più interessante per la produzione di *chemicals* e carburanti per via biotecnologica, dal momento che sono rinnovabili, concorrono alla riduzione delle emissioni di gas serra e non competono con le filiere alimentari [1]. I principali componenti delle matrici lignocellulosiche sono la cellulosa, l'emicellulosa e la lignina. La cellulosa e l'emicellulosa sono polisaccaridi, che possono essere idrolizzati a molecole a più basso grado di polimerizzazione per essere utilizzate per processi chimici o microbiologici [2]. La lignina è una struttura polimerica a base fenolica, che, una volta separata dai polisaccaridi può essere anch'essa utilizzata come materia prima per diverse applicazioni, come la produzione di

resine adesive o gel [3]. Indipendentemente dall'uso finale dei diversi componenti, il punto chiave dei vari processi è quello relativo ai pretrattamenti sulla matrice lignocellulosica per romperne la struttura e rendere i componenti accessibili a successive lavorazioni. Oggigiorno, ci sono diverse possibilità di pretrattamento, alcune delle quali già impiegate a livello industriale [4]. Tuttavia, non esistono metodi analitici semplici e rapidi per la determinazione del contenuto di lignina residua [5]. Il NIR potrebbe rappresentare una valida alternativa, non solo per

la determinazione quantitativa delle sostanze, ma anche per la classificazione dei diversi trattamenti e, quindi, per una valutazione qualitativa dell'impatto che essi hanno sulla matrice legnosa su cui operano. In questo studio, è stata realizzata la messa a punto di un metodo qualitativo per la classificazione di diversi trattamenti delignificanti a partire da rachide di banana. Il rachide è la parte legnosa a cui sono attaccati i caschi di frutti, e rappresenta uno scarto consistente in termini quantitativi nei paesi produttori [6]. Attraverso una *cluster analysis* basata sugli spettri NIR delle matrici trattate e trattate, sono stati classificati i seguenti pretrattamenti: *organosolv* con etil-acetato, etanolo e acetone, delignificazione ossidativa con sodio ipoclorito e con cloro attivo prodotto per elettrochimica a partire da potassio cloruro.



in

non

via

## Materiali e Metodi

**Rachide di banana e pretrattamenti.** I campioni di rachide di banana (*Musa paradisiaca* var. *sapientum*) provengono dall'Equador. 300 g di campione essiccato sono stati macinati e omogeneizzati. Il contenuto iniziale di lignina, analizzata utilizzando il metodo Klason [7], ha dato un valore id 15,60%. Aliquote di 1 grammo di materiale sono state sottoposte ai seguenti agenti delignificanti: cloro attivo prodotto per via elettrochimica (soluzione ECA) per 5-10-15-30 minuti; sodio ipoclorito (5% w/w), *organosolv* (etanolo, etil-acetato e acetone), ECA+*organosolv*; ECA+acqua a 50°C e ECA+acqua a 90°C (Tabella 1). La soluzione ECA è stata preparata come riportato da Tamburini et al. [8].

Tabella 1. Condizioni di pretrattamento utilizzate negli esperimenti

#	Agente delignificante (DA)	Trattamento
1	ECA	5 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
2	ECA	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
3	ECA	15 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
4	ECA	30 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
5	<i>Organosolv</i> _etanolo	30 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
6	<i>Organosolv</i> _acetone	30 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
7	<i>Organosolv</i> _etil acetato	30 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
8	Sodio ipoclorito	30 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C
9	ECA + etanolo	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C + 30 min di tratt. con solvente con 25 ml di DA a 25°C
10	ECA + acetone	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C + 30 min di tratt. con solvente con 25 ml di DA a 25°C
11	ECA + etil acetate	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C + 30 min di tratt. con solvente con 25 ml di DA a 25°C
12	ECA + acqua	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C + 30 min di tratt. con acqua a 50°C
13	ECA + acqua	10 min di reazione con 25 ml di DA a 25°C + 30 min di tratt. con acqua a 90°C
14	nessuno	Campione non trattato

**Analisi NIR.** Gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento NIRFlex N-500 (Büchi, Svizzera), dotato di un sistema portacampioni XL di 2,5 cm di diametro. Lo spettro è stato acquisito nell'intervallo 1000-2500 nm, a intervalli di 8 nm. Per ottimizzare il rapporto segnale/rumore, lo spettro finale è il risultato della media di 16 scansioni.

**Elaborazioni chemiometriche.** Tutte le elaborazioni statistiche e chemiometriche sono state realizzate con NIRCAl 5.0 (Büchi, Svizzera). La selezione delle lunghezze d'onda, la *cluster*

*analysis* [9] e tutti i parametri statistici sono stati ottenuti dalla procedura automatica Calibration Wizard® inclusa nel software. Gli spettri sono stati pretrattati con SNV e derivata prima [10-11]. La calibrazione è stata validata con *cross-validation*.

## Risultati e Discussione

Gli spettri acquisiti (in totale 98), originali e pretrattati sono riportati in Figura 1.

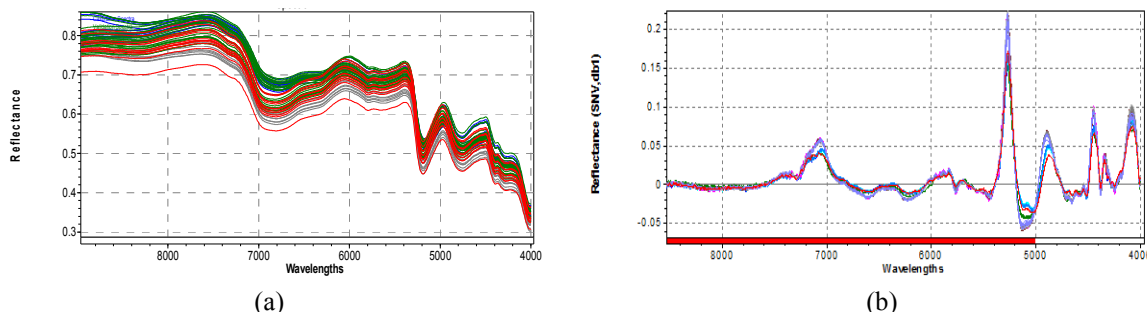


Figura 1. Spettri NIR originali e pretrattati (SNV e db1) di campioni di rachide di banana sottoposto a diversi trattamenti delignificanti.

I segnali più significativi della lignina sono a  $5980\text{ cm}^{-1}$  relativo al primo *overtone* del legame CH degli anelli aromatici e a  $5800\text{ cm}^{-1}$  del legame CH nei gruppi acetile legati agli xilani delle emicellulose [12]. Anche se solo come spalla, sono visibili i segnali a  $6916\text{--}6913\text{ cm}^{-1}$ , dovuti agli OH fenolici [13]. I segnali relativi ai polisaccaridi sono riconoscibili a  $7050\text{--}6250$ , a  $5800\text{--}5600$  e a  $4350$  and  $4250\text{ cm}^{-1}$ . La cellulosa genera bande di assorbimento negli intervalli  $7200\text{--}6950$ , a  $6720$ ,  $6480$  e  $6290\text{ cm}^{-1}$ , corrispondenti rispettivamente alle forme amorfa, semicristallina e cristallina [14]. Anche se i campioni sono stati essiccati una parziale reidratazione potrebbe essere la causa dei segnali tra  $5200$  e  $5400\text{ cm}^{-1}$ .

I campioni sottoposti ai trattamenti sopra definiti, sono stati raggruppati secondo quattro differenti criteri, in modo da evidenziare l'effetto di specifici parametri sulla capacità del NIR di classificare i campioni (Tabella 2).

Tabella 2. Criteri di raggruppamento

Criteri di classificazione dei campioni	#campioni
Effetto dell'agente delignificante	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14
Effetto del tempo di trattamento con soluzione ECA	1, 2, 3, 4, 14
Effetto del trattamento con <i>organosolv</i>	5, 6, 7, 14
Effetto del doppio trattamento	9, 10, 11, 12, 13, 14

Il risultato della classificazione dei campioni sottoposti a diversi agenti delignificanti è riportato in Figura 2, dove è rappresentata la proiezione bidimensionale di PC1 e PC2 ottenute dalla *cluster analysis*. La capacità di differenziare i trattamenti potrebbe essere riconducibile alla modificazione che i trattamenti inducono sulla struttura chimica della lignina e sul diverso livello di degradazione dei legami [15].

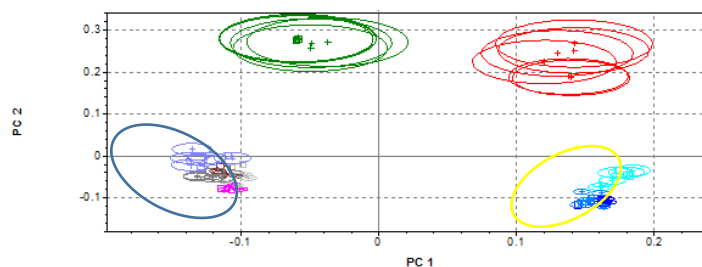


Figura 2. PC2 vs. PC1 per la classificazione di diversi trattamenti delignificanti basata sugli spettri FT-NIR: campioni non trattati (rossi); trattati con sodio ipoclorito (verdi); trattati con ECA (cerchio blu) e trattati con *organosolv* (cerchio giallo)

Per quello che riguarda la classificazione dei campioni trattati con soluzione ECA per tempi diversi, il diagramma PC2 vs. PC1 evidenzia una buona separazione, lungo la PC1 tra i campioni trattati e non trattati (Figura 3(a)), mentre non sono sufficienti per discriminare rispetto ai tempi di trattamento, dove sembra più efficace PC3 (Figura 3 (b)).

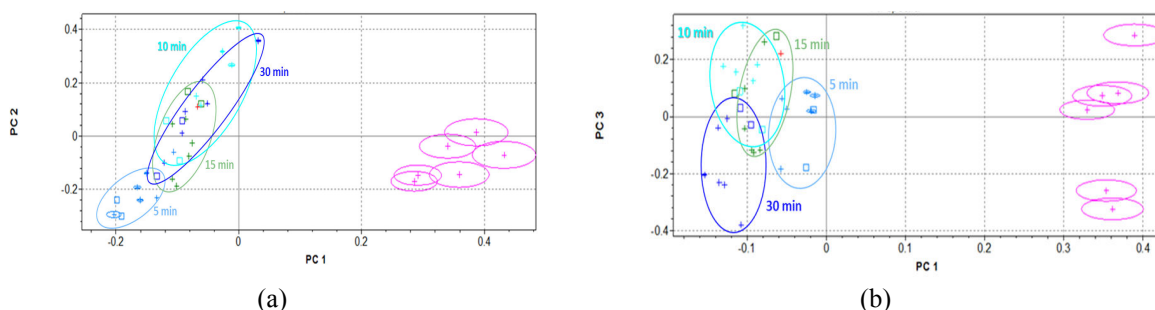


Figura 3. PC2 vs. PC1 (A) and PC3 vs. PC1 (B) per la classificazione dei diversi tempi di trattamento con soluzione ECA.

Informazioni analitiche interessanti per differenziare il tipo di solvente utilizzato sono incluse in PC4 vs. PC1 della Figura 4, dove è evidenziato l'effetto dei diversi trattamenti con *organosolv*. I trattamenti con solventi organici non hanno effetti molto diversi sulla struttura principale della lignina [16] e questo si riflette sul fatto che gli spettri NIR rilevano poche differenze. I principali cambiamenti sembrano derivare da modificazioni di componenti secondari della matrice lignocellulosica [17], come proteine o composti azotati, che sembrano essere maggiormente evidenziabili lungo la PC4.

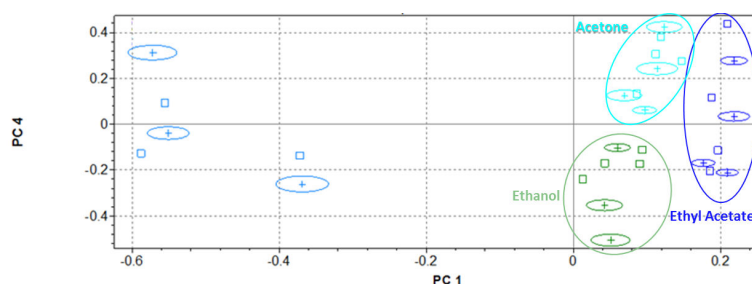


Figure 4. PC4 vs. PC1 per la classificazione di diversi trattamenti con *organosolv*

Nel caso di trattamenti combinati si evidenzia come la PC1 rileva una buona separazione tra campioni trattati e non trattato, mentre la PC3 permette di migliorare il livello di discriminazione dei trattamenti.

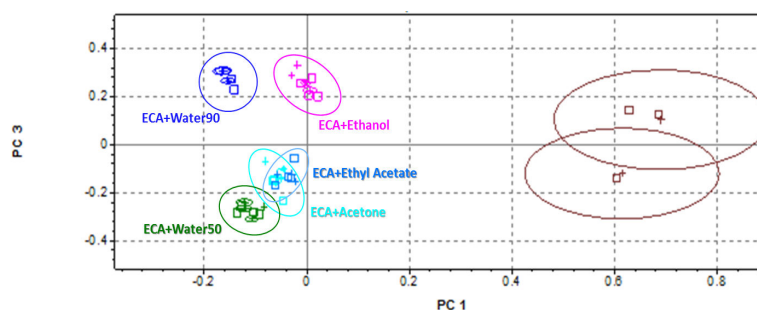


Figure 5. PC3 vs. PC1 per la classificazione di diverse combinazioni di trattamenti con ECA+ *organosolv* o ECA+acqua.

## Conclusioni

Lo studio dell'effetto dei pretrattamenti delignificanti su campioni di rachide di banana ha dimostrato che la tecnica NIR può essere efficacemente applicata per discriminare gli effetti indotti dagli agenti delignificanti, e apre la prospettiva ad una applicazione di tipo quantitativo.

### Bibliografia

1. Binder JB (2009) Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *Journal of American Chemical Society* 131: 1979-1985
2. Singh P, Sulaiman O, Hashim R, Peng LC, Singh RP (2013). Using biomass residues from oil palm industry as a raw material for pulp and paper industry: potential benefits and threat to the environment. *Environment, development and sustainability* 15: 367-383.
3. El Mansouri N, Pizzi A, Salvadó J. (2007) Lignin-based wood panel adhesives without formaldehyde. *European Journal of Wood & Wood Products* 65: 65–70.
4. Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010) Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* 101: 4851-4861.
5. Xu F, Yu J, Tesso T, Dowell F, Wang D (2013) Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: a mini review. *Applied Energy* 104: 801-809
6. Oliveira L, Evtuguin D, Cordeiro N, Silvestre AJD (2009) Structural characterization of stalk lignin from banana plant. *Industrial Crops and Products*. 29: 86-95.
7. Dence CW (1992) The determination of lignin. In: *Methods in Lignin Chemistry*. Springer Series in Wood Science, Springer pp. 33-61.
8. Tamburini E, Bernardi T, Castaldelli G, Tumiatti G, Ferro S (2011) Green electrochemical approach for delignification of wheat straw in second generation bioethanol production. *Energy and Environmental Science* 4: 551-557.
9. Bossart R, Keller H, Kellerhals H, Oelichmann J (2003) Principal components analysis as a tool for identity control using near-infrared spectroscopy. *Journal of molecular structure*, 661: 319-323.
10. Cen H, He Y (2007) Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Science and Technology* 18: 72-83.
11. Savitzky A, Golay MJ (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry* 36: 1627-1639.
12. Via BK, Zhou C, Acquah G, Jiang W, Eckhardt L (2014) Near Infrared Spectroscopy Calibration for Wood Chemistry: Which Chemometric Technique Is Best for Prediction and Interpretation? *Sensors* 14: 13532-13547.
13. Scarff M, Arnold SA, Harvey LM, McNeil B (2006) Near Infrared Spectroscopy for bioprocess monitoring and control: Current status and future trends. *Critical Reviews in Biotechnology* 26: 17–39.
14. Tsuchikawa S, Siesler HW (2003)s Near infrared spectroscopic monitoring of the diffusion process of deuterium-labeled molecules in wood. Part I: softwood. *Applied Spectroscopy* 57: 667-674.
15. Nada AAMA, El-Sakhawy M, Kamel SM (1998) Infra-red spectroscopic study of lignins. *Polimers Degradation and Stability* 60: 247–251.
16. Erdocia X, Prado R, M. Corcuera A, Labidi J (2014) Effect of different organosolv treatments on the structure and properties of olive tree pruning lignin. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20: 1103-1108.
17. Bensah EC, Mensah M (2013) Chemical Pretreatment Methods for the Production of Cellulosic Ethanol: Technologies and Innovation. *International Journal of Chemical Engineering* 2013: 1-21.

## ANALISI MULTIVARIATA E SPETTROSCOPIA NIR PER LA DETERMINAZIONE DEL GRADO DI CONTAMINAZIONE DA AFLATOSSINA M1 IN LATTE BOVINO

M. Li Vigni<sup>1,2</sup>, C. Durante<sup>1</sup>, J.M. Amigo<sup>3</sup>, N. Cavallini<sup>2</sup>, M. Cocchi<sup>2</sup>, N. Rizzi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*ChemSTAMP srl, Via Giuseppe Campi, 183, 41125 Modena, Italy.*

<sup>2</sup>*Dept of Chemical and Geological Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi, 103, 41125 Modena, Italy*

<sup>3</sup>*Dept of Food Science, University of Copenhagen, Rolighedsvej, 30, DK-1958 Frederiksberg C, Denmark*

<sup>4</sup>*Laboratorio ARAL (Associazione Regionale Allevatori della Lombardia), Via Kennedy, 30, 26013 Crema, Italy*

### Riassunto

La contaminazione alimentare da micotossine ha effetti importanti sull'opinione pubblica, come emerge in occasione di notizie relative a sequestri di prodotti contaminate. Queste molecole (potenziali cancerogeni) rappresentano una minaccia diretta alla salute e sicurezza per via della loro presenza ubiquitaria come contaminanti alimentari, siano essi prodotti vegetali ad uso diretto o semilavorati e, attraverso i mangimi, possono contaminare il latte e suoi derivati. La legislazione europea prevede un limite stringente per l'Aflatossina M1 nel latte (50 ppt): i metodi analitici quindi devono garantire elevata sensibilità, ottenuta al prezzo della velocità e semplicità di analisi (cromatografia), problematica parzialmente affrontata dai metodi immunologici (ELISA). In questo lavoro è valutata la fattibilità di un metodo analitico rapido ed efficiente per la determinazione di AFM1 nel latte. L'obiettivo è ottenere un metodo rapido e semplice di screening da implementare ad ogni livello della filiera di produzione del latte, per realizzare un controllo interno capillare. Un totale di ottanta campioni di latte sono stati considerati, secondo quattro livelli di contaminazione: negativi (tossina assente), sotto il limite (20-50 ppt), sopra il limite (50-80 ppt), altamente contaminati (fino a 300 ppt). NIRS è già impiegata in questo contesto per la determinazione di proprietà del prodotto e controllo della qualità, pertanto è stata impiegata come metodo preliminare per la classificazione dei campioni secondo il livello di contaminazione. L'implementazione di un metodo rapido di screening in grado di definire se un campione cade in uno dei quattro gruppi sopracitati può rappresentare un importante vantaggio per ridurre il numero di campioni da sottoporre ad ulteriori accertamenti della contaminazione.



## SPETTROSCOPIA NEL VICINO INFRAROSSO E ANALISI MULTIVARIATA DEI DATI COME SUPPORTO PER LA DETERMINAZIONE DELLA QUALITÀ DEL PELLETT

M. Mancini<sup>1</sup>, A. Pizzi<sup>1</sup>, Å. Rinnan<sup>2</sup>, C. Mengarelli<sup>1</sup>, D. Duca<sup>1</sup>, G. Rossini<sup>1</sup>, E. Foppa Pedretti<sup>1</sup>, A. Ilari<sup>1</sup>, G. Toscano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Agricultural, Food and Environmental Sciences - Università Politecnica delle Marche - via Brecce Bianche 60131 Ancona, Italy

<sup>2</sup>Affiliation: Department of Food Science, Faculty of Science - University of Copenhagen - Rolighedsvej 26, 1958, Frederiksberg C, Denmark

Presenting Author

\*g.toscano@univpm.it

### Riassunto

Negli ultimi decenni la politica europea sta promuovendo l'uso delle energie rinnovabili per ridurre lo sfruttamento dei combustibili fossili e l'emissione di gas ad effetto serra. A tal proposito, il pellet sta assumendo sempre maggiore importanza tra i biocombustibili solidi perché durevole, facilmente trasportabile e con una maggiore densità energetica, presentando quindi anche una migliore logistica.

Per contro è molto difficile seguirne la tracciabilità poiché possono essere inseriti materiali di natura diversa dal legno vergine, causando effetti indesiderati in combustione. Per questo il comitato europeo per la normazione (CEN) ha prodotto uno standard (EN ISO 17225-2) che definisce le classi di qualità del pellet considerando sia parametri chimico-fisici che aspetti qualitativi (es. origine e provenienza).

Le analisi convenzionali possono determinare questi parametri ma sono costose, lunghe e non in linea con le reali necessità del mercato poiché gli operatori hanno bisogno di avere risultati nel più breve tempo possibile. Una valida alternativa è la spettroscopia infrarossa. Questa tecnica analitica rapida e non distruttiva può giocare un ruolo importante nella determinazione della composizione e della provenienza dei prodotti densificati.

A tale scopo, sono stati prelevati campioni appartenenti alle specie più utilizzate nel settore del pellet (pino, abete, faggio e acero) prendendo informazioni riguardanti origine e provenienza del materiale. Un totale di 80 campioni di legno vergine e 24 campioni di corteccia sono stati analizzati usando FT-NIR in combinazione con la Principal Component Analysis. Il metodo è stato capace di discriminare i campioni non solo tra corteccia e legno, ma anche tra legno di conifera e di latifolia. Inoltre è stato possibile osservare una discreta separazione tra le diverse specie legnose all'interno dei gruppi di conifera e latifolia. Le differenze spettrali responsabili dei diversi raggruppamenti sono legate principalmente a cambiamenti nella composizione e nella quantità di cellulosa, emicellulosa e lignina.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che la tecnica ha delle buone potenzialità nel fornire informazioni utili sulla qualità del pellet, prospettandosi come uno strumento utile per verificare l'origine e la provenienza del materiale, caratteristiche normalmente soltanto dichiarate dal produttore.

### Introduzione

Nel corso degli ultimi decenni l'utilizzo delle biomasse ad uso energetico sta assumendo un'importanza sempre maggiore in quanto fonte di energia rinnovabile, sostenibile ed economica. Inoltre la politica europea sta promuovendo l'utilizzo di fonti di energia rinnovabile per ridurre le emissioni di gas ad effetto serra. In questo panorama un ruolo importante lo riveste il mercato del

pellet in quanto, rispetto alle altre biomasse solide, è durevole, facilmente trasportabile e con maggiore densità energetica. Nel 2009 il consumo di pellet era di circa 9,2 Tg [1] ed entro il 2020 la European Biomass Association si aspetta un consumo di 50 Tg per i soli paesi europei [2, 3]. Questa rapida crescita è legata alla necessità di effettuare un maggiore controllo per verificarne la qualità. Per questo motivo il comitato tecnico CEN/TC 335 ha stabilito una serie di parametri chimico-fisico e qualitativi (ad es. origine e provenienza), che dividono il pellet in tre classi di qualità sulla base di specifici limiti [4]. L'analisi chimica convenzionale è in grado di restituire questo tipo di informazioni, ma è costosa, richiede lunghe procedure e personale specializzato; tutte caratteristiche che non sono in linea con le esigenze del mercato. Per contro l'analisi infrarosso offre vantaggi quali affidabilità, velocità e non richiede la distruzione del campione. Questa tecnica è stata già utilizzata per predire caratteristiche del legno e la sua composizione chimica dal momento che queste sono correlate con delle specifiche bande NIR [5-7]. Il vantaggio per il settore è enorme in quanto gli operatori possono accedere a tutta una serie di informazioni quali-quantitative con una sola e rapida misura, permettendo in questo modo la tracciabilità del prodotto. Pertanto nel presente lavoro è stata indagata la possibilità di utilizzare la spettrofotometria nel vicino infrarosso unitamente all'analisi chemiometrica, per discriminare campioni in base alla loro origine, in particolare tra legno e corteccia. A tal proposito sono stati analizzati 80 campioni di legno delle specie più importanti del settore del pellet e 24 cortecce. Successivamente gli spettri ottenuti nel vicino infrarosso sono stati elaborati con la tecnica dell'analisi dei componenti principali (PCA).

## Materiali e Metodi

In questo studio sono stati prelevati 24 campioni di cortecce e 80 campioni di legno di alcune delle più comuni specie utilizzate nel settore del pellet (faggio, acero, pino ed abete); nello specifico 20 campioni per ognuna delle 4 specie. I campioni di legno sono stati ottenuti da pezzi interi, prelevando rondelle scortecciate e tavole, in modo da assicurare la specie legnosa di appartenenza. Le cortecce invece sono state prelevate da segherie locali come scarto del processo di lavorazione del legno. Dopo una prima riduzione manuale, i campioni sono stati macinati con un mulino a taglienti (mod. SM 2000, RETSCH) fino ad una granulometria inferiore ad 1 mm e conservati in contenitori di plastica fino al momento dell'acquisizione degli spettri. Gli spettri sono stati acquisiti usando uno spettrofotometro FT-NIR (mod. Nicolet iS 10, THERMO) dotato di accessorio per l'acquisizione in riflettanza diffusa (mod. smart Near-IR upDRIFT, THERMO). Le seguenti impostazioni sono state impiegate per l'acquisizione degli spettri: intervallo spettrale 10000÷4000  $\text{cm}^{-1}$ ; 64 scansioni per campione; risoluzione spettrale di 4  $\text{cm}^{-1}$ . Per correggere il segnale uno spettro di background è stato acquisito ogni ora. Ogni campione è stato analizzato in triplicato su diverse porzioni di campione.

L'uso della chemiometria è fondamentale per estrarre informazione utile da dati spettrali dal momento che, soprattutto gli spettri nel vicino infrarosso, contengono bande sovrapposte e relativamente deboli in intensità [8, 9].

La tecnica della PCA è stata utilizzata come analisi esplorativa dei dati spettrali così da valutare la possibilità di ottenere informazioni riguardanti l'origine e la provenienza del materiale. Prima della PCA sono stati applicati dei pretrattamenti per rimuovere effetti di scattering come offset, slope e non-linear effect [10]. Infine l'analisi dei loading ha consentito l'identificazione dei composti (cellulosa, emicellulosa, lignina ed estrattivi) che sono maggiormente responsabili della discriminazione tra i vari materiali. Sia per il pretrattamento dei dati spettrali che per il calcolo della PCA è stato utilizzato il software Matlab (ver. 7.10.0, The MathWorks).

## Risultati e Discussione

Il pretrattamento migliore per i dati spettrali è risultato essere quello della derivata seconda. In particolare gli spettri sono stati pretrattati con la derivata seconda usando l'algoritmo Savitzky-Golay [11] con 13 punti di smoothing e secondo ordine polinomiale. Non essendo stati rilevati degli outlier tra le repliche, queste sono state mediate per ottenere un unico spettro per campione. Per il

successivo calcolo della PCA è stato utilizzato il range spettrale tra 6.910 e 4.000  $\text{cm}^{-1}$  dato che contiene la maggiore parte dell'informazione spettrale.

La figura 1.a mostra lo scores plot della PCA effettuata sul dataset completo dei campioni. La separazione tra i diversi gruppi è evidente, ma non orientata secondo la direzione delle componenti principali (PCs). Pertanto i campioni sono stati proiettati in un nuovo plot dove la PC1 e la PC2 sono date dalla normalizzazione della differenza tra gli spettri medi di corteccia/legno e di conifera/latifoglia rispettivamente (P) (Figura 1.b). I nuovi scores sono stati calcolati con la formula  $T(\text{new}) = X(\text{new}) * P' * (P' * P)^{-1}$ .  $X(\text{new})$  e  $T(\text{new})$  sono rispettivamente la matrice pretrattata del dataset e la matrice degli scores da proiettare nel nuovo plot.

È evidente la separazione tra corteccia e legno che si può notare lungo la PC1. Un'ulteriore separazione si nota anche tra i campioni di conifera e di latifoglia che avviene principalmente lungo la PC2. La PC1 spiega il 45% della variabilità iniziale, mentre la PC2 il 27%. Si evidenzia inoltre un parziale raggruppamento dei campioni appartenenti alla stessa specie legnosa all'interno dei gruppi di conifera e di latifoglia.

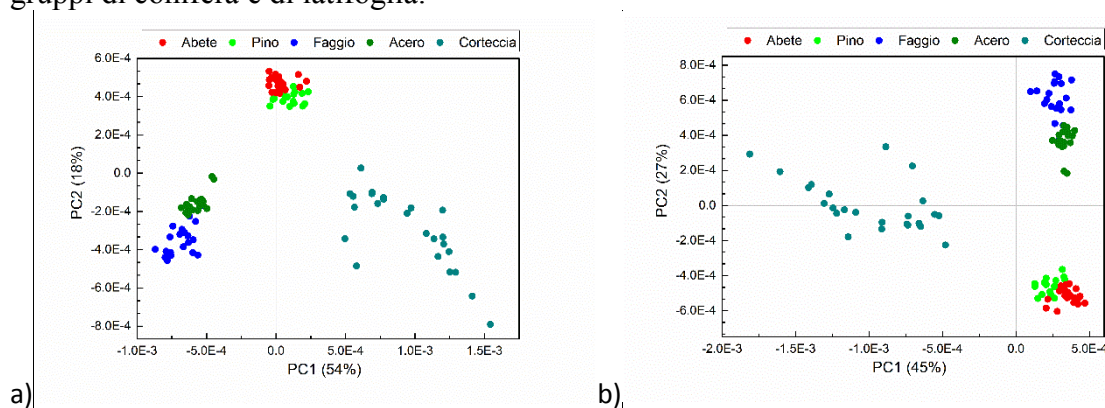


Figura 1- (a) Scores plot delle prime due PCs. (b) Proiezione dei campioni nel nuovo plot.

Le più importanti differenze tra gli spettri medi dei campioni di legno e quelli di corteccia sono legate a variazioni nella composizione chimica tra corteccia e legno e sono marcate con linee tratteggiate nella figura 2.a. Infatti la corteccia presenta una concentrazione di lignina e di materiale inorganico superiore rispetto al legno, e di conseguenza anche un minor contenuto di polisaccaridi [12, 13]. Gli estrattivi nella corteccia sono più abbondanti e più variabili, con alcune tipologie che non sono presenti nel legno [12] [13].

L'analisi del loading del primo componente principale ha consentito di individuare le più importanti lunghezze d'onda legate alla discriminazione tra legno e corteccia, evidenziate in figura 2.b da linee tratteggiate e riportate numericamente in tabella 1 con le relative assegnazioni ai composti di interesse. Come è possibile notare non tutte le lunghezze d'onda rilevate nel plot degli spettri risultano essere utili per il raggruppamento tra legno e corteccia.

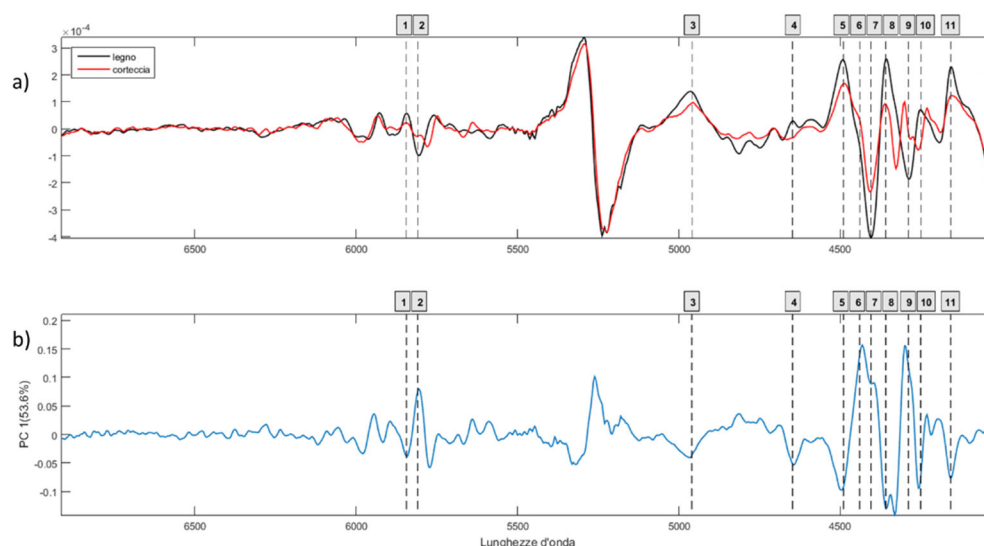


Figura 2- (a) plot degli spettri medi di legno e di corteccia trattati con la derivata seconda. (b) primo loading. Le più importanti lunghezze d'onda per la discriminazione tra legno e corteccia sono marcate con linee tratteggiate e con numeri (gli stessi della tabella 1).

Tabella 1- assegnazione delle bande di assorbimento infrarosso associate alle principali differenze spettrali tra legno e corteccia. La prima colonna si riferisce ai numeri evidenziati in figura 2. I numeri d'onda tra parentesi si riferiscono ai valori di letteratura.

N°	Numeri d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo Funzionale	Assorbimento
1	5809 (5800)	Hemi.	1st OT C-H str. [14]
2	4490	Cell., Hemi.	[15]
3	4440 (4435)	All	O-H str. + C-O str. [14]
4	4405 (4405)	Cell.	O-H str. + C-O str. [14]
5	4359(4365)	Cell.	C-O str. + O-H str. or C-H <sub>2</sub> bend. + C-H <sub>2</sub> str. [14]
6	4289 (4288)	Hemi.	C-H str. + C-H def. [14]
7	4251 (4252)	Cell.	C-H str. + C-H def. 2 <sup>nd</sup> OT C-H <sub>2</sub> bend [14]
8	4158	Cell.	[15]

Al fine di valutare la capacità della tecnica di estrarre informazioni sull'origine dei materiali e considerando anche la parziale separazione evidenziata tra campioni appartenenti a specie legnose differenti in figura 1, è stata calcolata una nuova PCA prendendo in considerazione i soli campioni di legno (80 campioni). In figura 3 viene riportato lo scores plot per le componenti principali PC1 e PC3. La PC1 spiega il 58% della variabilità iniziale, mentre la PC3 il 3%. La separazione tra legno di conifera e legno di latifoglia è ancora più evidente che in figura 1 ed interessa la prima componente principale (PC1). Allo stesso modo è possibile notare una buona separazione tra le diverse specie legnose all'interno dei gruppi di conifera e latifoglia, in particolare lungo la PC3 sia per acero/faggio che per pino/abete.

Le principali differenze spettrali tra legno di conifera e di latifoglia sono state evidenziate in figura 4.a dalle linee tratteggiate. Anche in questo caso il loading plot è stato investigato per individuare le principali variabili responsabili della separazione tra conifere e latifoglie (figura 4.b) ed associarne il composto di interesse (tabella 2). Le più importanti differenze tra i campioni di conifera e di latifoglia sono legate all'emicellulosa e alla lignina. Per quanto riguarda la lignina, le conifere contengono più unità di guaiacile rispetto alle latifoglie che invece sono composte da una miscela di unità di siringile e guaiacile [16]. L'emicellulosa è invece formata per l'80–90% di 4-O-metilglucuronoxilani nelle latifoglie e per il 60–70% di glucomannani e il 15–30% arabinogalattano nelle conifere [17].

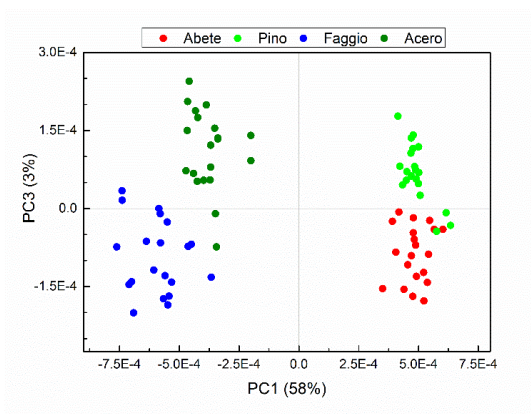


Figura 3- Scores plot della PC1 e PC3.

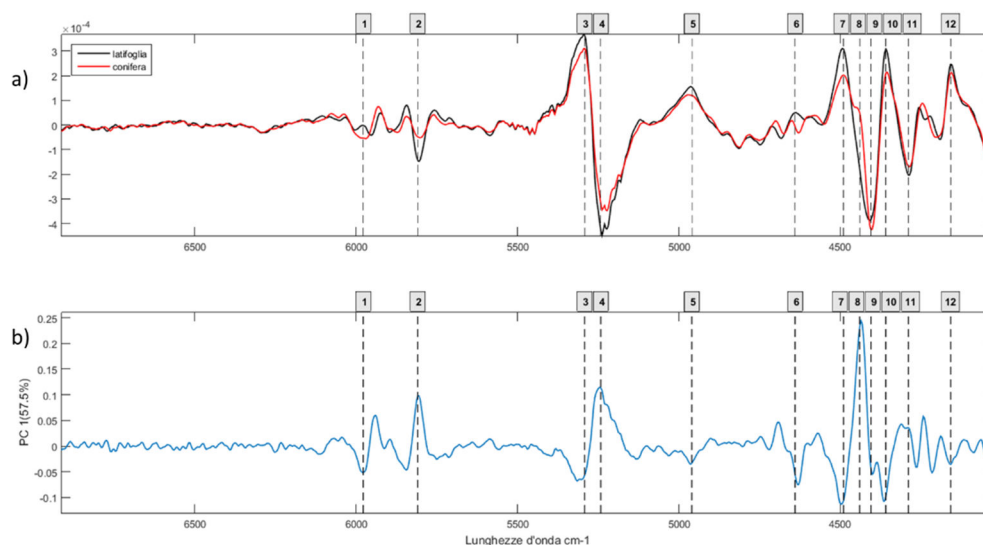


Figura 4- (a) plot degli spettri medi di legno di conifera e legno di latifoglia trattati con la derivata seconda. (b) primo loading. Le più importanti lunghezze d'onda per la discriminazione tra legno di conifera e di latifoglia sono marcate con linee tratteggiate e con numeri (gli stessi della tabella 2).

Tabella 2- assegnazione delle bande di assorbimento infrarosso associate alle principali differenze spettrali tra conifera e latifoglia. La prima colonna si riferisce ai numeri evidenziati in figura 4. I numeri d'onda tra parentesi si riferiscono ai valori di letteratura.

N°	Numeri d'onda (cm <sup>-1</sup> )	Gruppo Funzionale	Assorbimento
1	5978 (5978)	Lign.	1st OT C <sub>ar</sub> -H str. [14]
2	5809 (5800)	Hemi.	1st OT C-H str. [14]
3	5242 (5245)	Hemi.	2nd OT C=O str. [14]
4	4640	Cell., Hemi.	[15]
5	4490	Cell., Hemi.	[15]
6	4440 (4435)	All	O-H str. + C-O str. [14]
7	4359 (4365)	Cell.	C-O str. + O-H str. or C-H <sub>2</sub> bend. + C-H <sub>2</sub> str. [14]
8	4289 (4288)	Hemi.	C-H str. + C-H def.[14]

### Conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano che è possibile applicare la tecnica FT-NIR insieme alla PCA per discriminare non solo campioni di corteccia e legno, ma anche identificare campioni di conifera e di latifoglia. La separazione tra i diversi gruppi è legata in entrambi i casi alla quantità di lignina, cellulosa ed emicellulosa che compongono il materiale. Questa metodologia si prospetta essere un valido strumento per gli operatori del settore in quanto permette di ottenere informazioni in modo rapido ed economico sull'origine delle biomasse solide ad uso energetico, in particolare di materiali non strutturati come il pellet. In questo modo i requisiti richiesti dalla normativa del settore (EN

ISO 17225-2) possono essere controllati più facilmente ed è possibile in questo modo garantire la tracciabilità e la qualità della biomassa.

### Bibliografia

1. R., Sikkema, M., Steiner, M., Junginger, W., Hiegl, M.T., Hansen, A., Faaij (2011) *The European wood pellet markets: current status and prospects for 2020*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining. 5(3): p. 250-278.
2. M., Selkimäki, B., Mola-Yudego, D., Rösera, R., Prinza, L., Sikanenb (2010) *Present and future trends in pellet markets, raw materials, and supply logistics in Sweden and Finland*. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 14(9): p. 3068-3075.
3. A.K., Biswas, W., Yang, W., Blasiak (2011) *Steam pretreatment of Salix to upgrade biomass fuel for wood pellet production*. Fuel Processing Technology. 92(9): p. 1711-1717.
4. ISO (2014) *Solid biofuels - Fuel specifications and classes - Part 2: Graded wood pellets*.
5. C., Zhou, W., Jiang, B.K., Via, O., Fasina, G., Hanb (2015) *Prediction of mixed hardwood lignin and carbohydrate content using ATR-FTIR and FT-NIR*. Carbohydrate Polymers. 121: p. 336-341.
6. F.S., Poke, C.A., Raymond (2006) *Predicting Extractives, Lignin, and Cellulose Contents Using Near Infrared Spectroscopy on Solid Wood in Eucalyptus globulus*. J. Wood Chem. Technol. 26 187–199.
7. S., Tsuchikawa, H., Kobori (2015) *A review of recent application of near infrared spectroscopy to wood science and technology*. Journal of Wood Science. 61(3): p. 213-220.
8. A., Sandak, J. Sandak, M., Zborowskab, W. Prądyński (2010) *Near infrared spectroscopy as a tool for archaeological wood characterization*. Journal of Archaeological Science. 37(9): p. 2093-2101.
9. C.C., Fagan, C.D., Everard, K., McDonnell (2011) *Prediction of moisture, calorific value, ash and carbon content of two dedicated bioenergy crops using near-infrared spectroscopy*. Bioresource Technology. 102(8): p. 5200-5206.
10. Å., Rinnan, F.v.d., Berg, S.B., Engelsen (2009) *Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 28(10): p. 1201-1222.
11. A., Savitzky, M.J.E., Golay (1964) *Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures*. Analytical Chemistry. 36(8): p. 1627-1639.
12. J.M., Harkin, J.W., Rowe (1971) *Bark And Its Possible Uses*. (Research note FPL ; 091):56 p.
13. I., Miranda, J., Gominho, H., Pereira (2012) *Incorporation of Bark and Tops in Eucalyptus Globulus Wood Pulping*. 7: p. 4350-4361.
14. M., Schwanninger, J., Rodrigues, K., Fackler (2011) *A review of band assignments in near infrared spectra of wood and wood components*. Journal of Near Infrared Spectroscopy. 19(5): p. 287-308.
15. E., Pecoraro, B., Pizzoa, A., Alves, N., Macchionia, J.C., Rodrigues (2015) *Measuring the chemical composition of waterlogged decayed wood by near infrared spectroscopy*. Microchemical Journal. 122: p. 176-188.
16. I., Santoni, E., Callone, A., Sandak, J., Sandak, S., Dirè (2015) *Solid state NMR and IR characterization of wood polymer structure in relation to tree provenance*. Carbohydrate Polymers. 117(0): p. 710-721.
17. G., Toscano, D., Duca, G., Rossini, C., Mengarelli, A., Pizzi (2015) *Identification of different woody biomass for energy purpose by means of Soft Independent Modeling of Class Analogy applied to thermogravimetric analysis*. Energy. 83: p. 351-357.

## UN APPROCCIO IPERSPETTRALE NIR PER IL RILEVAMENTO AUTOMATICO DI DIFETTI NEL CAFFÈ VERDE

P. Oliveri<sup>1,\*</sup>, R. De Pellegrini<sup>1</sup>, E. Tartacca<sup>2</sup>, G. Salvatori<sup>2</sup>, M.C. Casolino<sup>1</sup>, M. Casale<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Genova, Viale Cembrano, 4 – 16148 Genova.

<sup>2</sup>Agenzia delle Dogane e dei Monopoli, Direzione Regionale per la Liguria – Laboratori e Servizi Chimici, Via R. Rubattino, 6 – 16126 Genova.

Presenting Author

\*oliveri@difar.unige.it

### Riassunto

Il caffè è tra le bevande più popolari nel mondo: è stato stimato che il consumo giornaliero di tazze di caffè superi i due miliardi [1]. Più del 90% della produzione di caffè è localizzata nei paesi in via di sviluppo, mentre i maggiori consumatori sono i paesi delle aree industrializzate. Conseguentemente, il caffè costituisce un'importante merce nei mercati internazionali ed anche nell'economia italiana. La legislazione italiana regola le importazioni di partite di caffè verde definendo una serie di controlli analitici ufficiali (umidità, micotossine) a cui i campioni in ingresso devono essere sottoposti, e specificando una serie di difetti la cui presenza ed entità deve essere verificata [2]. Tra questi, vi sono: (1) impurezze minerali ed animali; (2) impurezze vegetali (“ciliegie secche”, chicchi “in pergamino”, chicchi neri, chicchi secchi, chicchi fermentati); (3) chicchi con fori e alterazioni derivanti da infezioni da *Stephanoderes* spp. e *Araeocerus* spp.; (4) frammenti di chicchi.

Tali difetti sono rilevati mediante ispezione visiva ad opera di personale addestrato, che frequentemente si trova a dover controllare un elevato numero di campioni ogni giorno. Per questa ragione, la possibilità di sviluppare metodi analitici rapidi e non distruttivi per l'identificazione e quantificazione di tali difetti è una possibilità di grande interesse in questo settore.

In questo studio, sviluppato in collaborazione con il laboratorio di Genova dell'Agenzia delle Dogane e dei Monopoli, vengono studiate e presentate le potenzialità dell'*imaging* iperspettrale (HSI) nella regione NIR (1000–2500 nm) abbinato a tecniche multivariate di *pattern recognition*. In particolare l'analisi esplorativa delle componenti principali (PCA) con un approccio di *brushing* consente di rilevare la presenza dei difetti più importanti riscontrabili in campioni di caffè verde, attraverso il diretto esame delle immagini iperspettrali. L'uso di tecniche *supervised* può inoltre essere utile allo scopo. I risultati presentati sono discussi criticamente.

## Introduzione

Il caffè giunge nella nostra penisola principalmente in forma di “caffè verde” o “caffè crudo”, ovvero i semi (chicchi) privati dell’endocarpo (pergamino) e, almeno in parte, del tegumento seminale (pellicola argentea). Prima di essere lavorato, viene sottoposto a controlli specifici per permettere di verificarne la qualità, nonché la sicurezza; con il Decreto del Presidente della Repubblica del 16 Febbraio 1973, n. 470 è stabilito il regolamento per la disciplina igienica della produzione e del commercio del caffè e dei suoi derivati [2].

Si attengono, all’applicazione di tale decreto, i laboratori sia delle Agenzie delle Dogane sia delle Camere di Commercio.

I principali difetti analizzati riguardano: (1) impurezze minerali ed animali; (2) impurezze vegetali (“ciliegie secche”, chicchi “in pergamino”, chicchi neri, chicchi secchi, chicchi fermentati); (3) chicchi con fori e alterazioni derivanti da infezioni da *Stephanoderes* spp. e *Araeocerus* spp.; (4) frammenti di chicchi.

Questi controlli sono svolti in conformità con le norme ISO 6667-1985 “*Green coffee-Determination of proportion of insect-damaged beans*”, ISO 4149-2005 “*Green coffee-Olfactory and visual examination and determination of foreign matter and defects*” e ISO 10470-2007 “*Green coffee-Defect reference chart*”.

Le procedure di controllo ufficiale, svolte mediante l’uso dell’occhio umano, necessitano di un tempo di analisi che si aggira intorno alle venti ore totali per partita di caffè.

Tra i limiti maggiori di queste metodiche si devono sottolineare l’imprecisione del metodo, la difficoltà di rilevare i difetti in maniera univoca ma, soprattutto, i lunghi tempi di esecuzione e l’impossibilità di analizzare un elevato numero di campioni.

Tutto questo rende molto interessante lo sviluppo e la messa a punto di nuovi metodi analitici, necessariamente rapidi, poco costosi e non distruttivi al fine di ottenere un’informazione precisa sui tipi di difetti; l’obiettivo è quello di ridurre la percentuale di incertezza riducendo i tempi dell’analisi.

A tale scopo, negli ultimi anni, sono state particolarmente studiate le tecniche analitiche basate sulla spettroscopia nel medio e nel vicino infrarosso (MIR e NIR), che garantiscono elevate prestazioni in tempo di analisi, costo, selettività e invasività nei confronti del campione.

Lo scopo di questo studio è quello di sviluppare un modello basato su imaging iperspettrale per il controllo automatizzato dei difetti del caffè; in particolare, questo studio si avvale dell’utilizzo di un *hyperspectral scanner* operante nella regione spettrale NIR e di opportune tecniche di *pattern recognition* multivariata.

## Materiali e Metodi

### *Campioni*

I campioni di caffè verde utilizzati in questo studio sono campioni di controllo di partite di caffè in ingresso in Italia attraverso il porto di Genova, sottoposti ad analisi di routine da parte del laboratorio chimico dell’Agenzia delle Dogane, sede di Genova.

Dopo essere stati sottoposti ai controlli di legge, includenti la valutazione della percentuale di difetti effettuata da operatori esperti mediante esame visivo, su un quantitativo di almeno 100 chicchi per campione, secondo la normativa, gli stessi campioni sono stati sottoposti ad analisi HSI-NIR. Ai fini dello sviluppo e della validazione dei modelli predittivi, i campioni sono stati suddivisi in maniera random in un training set e in un test set.

### *Analisi HSI-NIR*

I campioni di caffè verde sono stati sottoposti ad analisi HSI-NIR mediante un hyperspectral scanner (Specim Ltd, Finlandia – LOT-QD, Italia) operante in modalità *line-scan* ed equipaggiato con una camera iperspettrale che acquisisce segnali nel range 1000-2500 nm.

Le immagini iperspettrali sono state acquisite contro sfondo nero e le intensità degli spettri misurati sono state normalizzate in scala di riflettanza % (utilizzando uno standard in Spectralon® per l’acquisizione del bianco).



### *Analisi dei Dati*

Le immagini iperspettrali sono state sottoposte, come primo step, ad eliminazione del background, mediante una segmentazione basata sull'istogramma di intensità totale delle immagini stesse. Attraverso un'analisi morfologica dell'immagine segmentata, sono stati quindi individuati, per ciascuna immagine, i singoli chicchi di caffè, conteggiandone automaticamente il numero.

Tutti gli spettri di ciascun pixel corrispondenti ai chicchi di caffè sono stati quindi sottoposti a trasformata SNV (*standard normal variate*), al fine di minimizzare il contributo di effetti fisici dovuti principalmente all'irregolarità della superficie dei chicchi.

Successivamente, è stato calcolato un modello PCA utilizzando gli spettri corrispondenti ai chicchi di caffè non difettosi del training set. A questo punto, è stata adottata una strategia di caratterizzazione dei singoli chicchi, anziché dei singoli pixel. Più in dettaglio, per ciascun pixel, è stata considerata la distribuzione degli *scores* sulle prime 5 PC. Per ogni singola distribuzione, sono stati calcolati parametri statistici di locazione e dispersione (media, deviazione standard, asimmetria, curtosi, e 5 intervalli interquantili: 0.025 0.25 0.50 0.75 0.975). L'insieme di tali parametri, calcolato per ciascun chicco in esame, è stato utilizzato per caratterizzare il chicco stesso, congiuntamente al vettore dei residui al quadrato. Nello specifico, è stata assemblata una matrice di dati in cui ogni riga corrisponde ad un chicco di caffè e le singole colonne corrispondono rispettivamente ai parametri statistici sopra elencati, stimati sulle distribuzioni degli *scores* sulle prime 5 PC, e ai residui.

La stessa procedura è stata applicata ai campioni training di caffè con difetti delle principali tipologie, con un'unica differenza procedurale: anziché calcolare un nuovo modello PCA, è stato utilizzato il modello costruito con i campioni non difettosi, e gli *scores* per i campioni difettosi sono stati ottenuti mediante moltiplicazione della corrispondente matrice degli spettri pretrattati per la matrice dei *loadings* del modello PCA dei campioni non difettosi.

Infine, sulla matrice dei campioni training (difettosi e non), è stato applicato un algoritmo di classificazione k-NN, utilizzabile a fini predittivi su campioni test, consentendo non solo di distinguere i chicchi difettosi da quelli normali, ma anche di differenziare le varie tipologie di difetti. Per ciascuno dei campioni test, è stata applicata la stessa strategia utilizzata per i campioni difettosi del training. Anche in questo caso, a partire dagli *scores*, sono stati calcolati i parametri statistici descrittivi delle distribuzioni e i residui.

Su questi dati, è stato applicato l'algoritmo di classificazione in predizione, consentendo di predire ciascun chicco in una delle classi predefinite (caffè non difettoso, o con uno dei difetti considerati). Rapportando il numero di chicchi difettosi al numero di chicchi totali analizzati, è stato possibile ottenere le percentuali per ciascun difetto riscontrato nei diversi campioni.

### **Risultati e Discussione**

Le immagini iperspettrali acquisite per ciascun campione in modalità di riflessione sono state innanzitutto normalizzate attraverso il calcolo della riflettanza, effettuato automaticamente dal software di acquisizione dello strumento utilizzando i valori di intensità del bianco e del nero acquisiti in automatico ad ogni misurazione. Tale correzione, effettuata per ciascun pixel del sensore lineare e per ciascuna lunghezza d'onda, consente di correggere efficientemente eventuali differenze di illuminazione tra sessioni analitiche differenti.

Le matrici tridimensionali dei dati iperspettrali associate a ciascuna immagine sono state quindi sottoposte ad un'analisi chemiometrica esplorativa mediante PCA, preceduta da una segmentazione dell'immagine iperspettrale finalizzata all'eliminazione del background, e basata sull'individuazione di un opportuno *cut-off* nell'istogramma delle intensità totali. La caratterizzazione esplorativa è stata effettuata attraverso la procedura del *brushing*, che consente di mettere in relazione gli *scores* nello *score plot* della PCA con la posizione dei pixel corrispondenti nell'immagine.

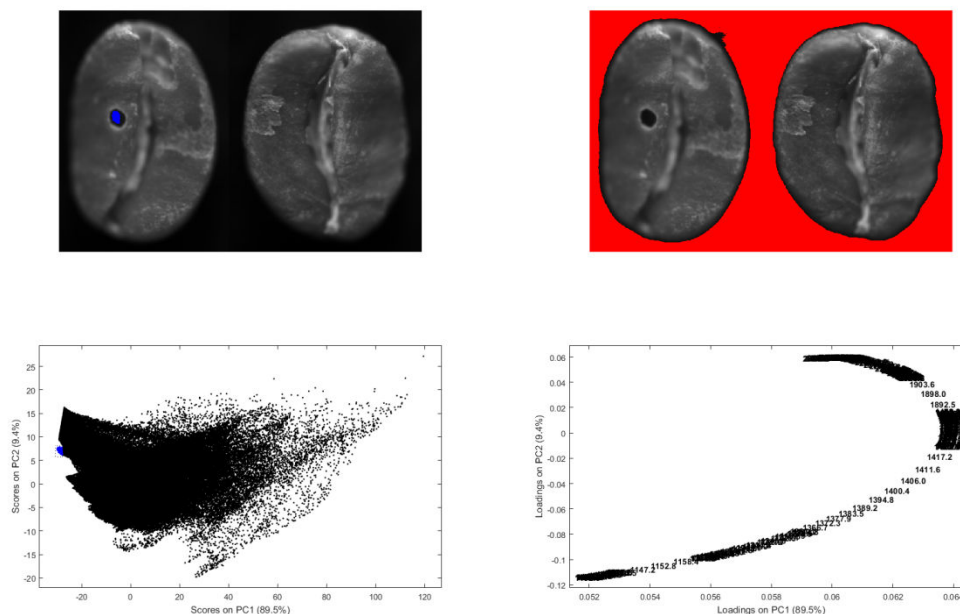


Figura 1 – PCA esplorativa su immagine segmentata. Dati pretrattati mediante autoscaling di colonna.

La Figura 1, riportata a titolo esemplificativo, include un chicco di caffè sano (a destra) e un chicco di caffè con foro causato da insetto. A seguito della procedura di segmentazione (il *background* eliminato corrisponde alla parte rossa dell'immagine in alto a destra), il *brushing* consente di individuare nettamente il cluster degli *scores* corrispondenti al foro del parassita, evidenziati in blu nell'immagine associata (grafico e immagine a sinistra).

Per quanto riguarda l'individuazione dei frammenti di semi di caffè verde (la cui presenza è soggetta a controllo di legge [2]), questa è realizzabile, a partire dalle immagini iperspettrali, attraverso una semplice analisi dimensionale delle aree associate a ciascun chicco. In particolare, è possibile stimare la distribuzione dimensionale dei chicchi interi attraverso un istogramma. I frammenti sono individuabili chiaramente quali aggregati di pixel di dimensioni ridotte, non compatibili con quelle della distribuzione dei chicchi interi. Attraverso un semplice conteggio (dall'analisi morfologica dell'immagine), è possibile stimare la percentuale di frammenti presenti in ciascuna immagine e, quindi, in ciascun campione analizzato.

I rimanenti difetti previsti dalla normativa (ciliegie secche, chicchi in pergamino, chicchi neri, chicchi secchi) [2] sono quelli che si caratterizzano prevalentemente da un punto di vista chimico, piuttosto che morfologico, rispetto ai chicchi sani. Inoltre, a differenza dei fori da parassiti, che costituiscono un difetto puntuale sulla superficie del campione, tali imperfezioni coinvolgono i semi nella loro interezza. Conseguentemente si è deciso di analizzare le immagini iperspettrali non pixel per pixel (strategia seguita per l'individuazione dei chicchi forati), ma chicco per chicco. Questa procedura è stata attuata grazie a uno step di analisi morfologica dell'immagine che, applicato subito dopo la segmentazione del *background*, ha consentito di individuare i raggruppamenti di pixel corrispondenti ai singoli semi in ciascuna immagine. Ognuno di questi semi viene caratterizzato mediante una serie di parametri descrittivi derivanti dalla PCA, come spiegato in dettaglio nel paragrafo *Analisi dei Dati*. I modelli PCA sono stati costruiti con gli spettri dei campioni non difettosi pretrattati mediante trasformata SNV e *autoscaling* di colonna.

Si è costruita in questo modo una matrice di dati in cui ogni riga corrisponde a uno dei chicchi analizzati e ogni colonna corrisponde a uno dei parametri descrittivi calcolati per le prime cinque componenti principali.

Questa matrice, contenente sia semi di campioni non difettosi sia semi rappresentativi tutti i difetti di interesse, è stata sottoposta ad analisi di classificazione k-NN. La validazione dei modelli è effettuata sia mediante cross-validation sia attraverso l'utilizzo di un test set.

Tabella 1 – Risultati della predizione sul test set con il metodo k-NN.

		classe predetta			
		sani	secchi	neri	ciliegie
classe vera	sani	55	6	0	0
	secchi	7	80	2	0
	neri	0	5	20	0
	ciliegie	0	0	1	1

ABILITÀ PREDITTIVA (%) classe 1 = 90.2

ABILITÀ PREDITTIVA (%) classe 2 = 89.9

ABILITÀ PREDITTIVA (%) classe 3 = 80.0

ABILITÀ PREDITTIVA (%) classe 4 = 50.0

L'analisi dei risultati indica che il metodo k-NN è in grado di fornire una classificazione soddisfacente per questa tipologia di analisi. È interessante rilevare, dalla matrice di confusione (Tabella 1), come gli errori in predizione vengano effettuati soprattutto tra la classe dei secchi e quella dei sani, tra la classe dei neri e quella dei secchi, e tra la classe delle ciliegie e quella dei neri. Questa evidenza sperimentale è, infatti, perfettamente in linea con le difficoltà riscontrate dagli operatori specializzati nello svolgere il controllo visivo dei campioni, che portano a potenziali confusioni tra queste tipologie di difetti che non sono sempre nettamente differenziabili.

### Conclusioni

Questo studio preliminare evidenzia le potenzialità della tecnica di analisi iperspettrale NIR, accoppiata con opportuni metodi chemiometrici di *pattern recognition*, per l'identificazione dei principali difetti previsti dalle normative vigenti in partite di caffè verde soggette a controllo. Tutte le procedure di analisi dei dati proposte in questo studio sono facilmente automatizzabili, consentendo di proporre una strategia analitica particolarmente efficiente in termini di tempo e semplicità di esecuzione, se paragonata alle procedure di controllo ufficiali, basate su procedimenti lunghi e tediosi che necessitano di personale specificatamente addestrato. Con il miglioramento dell'efficienza delle metodiche HSI, accompagnato da un prevedibile calo del costo della strumentazione necessaria nei prossimi anni, tali metodiche potranno auspicabilmente entrare a far parte dei controlli di routine in un futuro prossimo.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca SIR 2014, RBSI14CJHJ (CUP: D32I15000150008) finanziato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR).

### Bibliografia

1. S. Ponte (2002) *The 'latte revolution'? Regulation, markets and consumption in the global coffee chain*. *World Development*, 30, 1099-1122.
2. D.P.R. 16 Febbraio 1973, n. 470.

## RAPIDA STIMA DEL METODO DI CONSERVAZIONE MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR IN PETTI DI POLLO

Serva L.<sup>1</sup>, Balzan S.<sup>2</sup>, Mirisola M.<sup>1</sup>, Garbin E.<sup>1</sup>, Tenti S.<sup>1</sup>, Novelli E.<sup>2</sup>, Fasolato L.<sup>2</sup>, Marchesini G.<sup>1</sup>, Andrighetto I.<sup>1</sup>, Segato S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Medicine, Production and Health and <sup>2</sup>Dept. of Comparative Biomedicine and Food Science - University of Padova, Viale dell'Università, 16 35020 Legnaro (PD)

Presenting Author; \*Corresponding email: severino.segato@unipd.it

### Riassunto

Lo scopo della prova è stato la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche e reologiche di petti di pollo mediante la tecnica NIRS anche ai fini di una discriminazione del metodo e dei tempi di conservazione refrigerate. I polli sono stati allevati alimentandoli con una dieta controllo e una dieta addizionata di polifenoli e, *post mortem*, le carcasse sono state sottoposte a due trattamenti di congelamento (statico *vs* dinamico) dopo vari giorni di conservazione refrigerata (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 giorni di refrigerazione). Prima e dopo decongelamento ( $n = 96$ ), si sono determinati: coordinate colorimetriche, pH, perdite di sgocciolamento, nonché gli spettri NIRS sulla carne macinata. L'analisi NIRS ha evidenziato un'elevata efficienza di discriminazione tra carne decongelata e carne fresca ma non in funzione del tipo di dieta. In riferimento ai petti di pollo freschi, la tecnica NIRS si è rivelata sufficientemente accurata nel distinguere la durata del periodo di conservazione in ambiente refrigerato (*shel-life*) solo nel confronto tra 1 e almeno 5 giorni *post mortem*.

### Introduzione

L'autenticazione di prodotto è una delle priorità dell'industria delle carni fresche poiché il metodo e tempistica di conservazione della carne hanno rilevante influenza sulla qualità della stessa [1]. Lo studio si è posto l'obiettivo di valutare le performance NIRs nella discriminazione tra petti di pollo decongelati o freschi e, tra quest'ultimi, in funzione della durata (giorni *post mortem*) del periodo di refrigerazione.

### Materiali e Metodi

*Protocollo sperimentale, analisi chimico-fisiche e analisi NIRS*

Per la prova si sono prese in considerazione 120 carcasse ottenuti da polli (peso vivo =  $2.7 \pm 0.4$  kg) allevati con una dieta controllo ( $n = 40$ ) o con una sperimentale addizionata di una dose giornaliera ridotta, pari a 220 mg per kg di dieta, (P1,  $n = 40$ ) o elevata, pari a 440 mg per kg di dieta, (P2,  $n = 40$ ) di polifenoli, sottoprodotto residuante dalla spremitura delle olive. Al macello, da 120 carcasse ne sono state selezionate 96 e suddivise in 8 trattamenti sperimentali ( $n = 12$ ) in relazione alla durata del periodo (giorni *post mortem* o *shel-life*) di refrigerazione ( $4 \pm 1$  °C): 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15. Trascorso il periodo di conservazione refrigerata di ciascuna tesi *shel-life*, una porzione di petto di pollo è stato congelata con una di due tecniche di congelamento (statico *vs* dinamico). Dopo un breve periodo di crioconservazione, i petti sono stati decongelati in ambiente refrigerato ( $2 \pm 1$  °C). Sui campioni freschi e decongelati sono state condotte le seguenti analisi: pH ventrale e dorsale con un pH-metro portatile (model 910; KNICK, Berlin, D) accoppiato a un elettrodo (3 mm Ø conic tip) a penetrazione (inLab 427, Mettler Toledo, Leicester, UK); le coordinate CIE  $L^*a^*b^*$  (media di 5 repliche) con un colorimetro Minolta (CR-500, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) dotato

di un illuminante D65 impostato con un angolo di visione a 10°; perdite di sgocciolamento e di scongelamento con metodo gravimetrico.

In relazione alle analisi NIRS, sub-campioni ( $n = 100$ ) di carne di ciascuna tesi sperimentale sono stati analizzati sia freschi sia scongelati dopo macinazione (10 s a 4000 x g) e quindi un'aliquota posta in cilindri per l'acquisizione di degli spettri NIRS (reflectance, 32 scans/sample) nella regione 1100-2500 nm mediante un Foss NIRSystem 5000. Gli spettri sono stati mediate prima dell'analisi statistica e sottoposti ai seguenti pre-trattamenti: standard normal variate (SNV) e derivata di 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> ordine [2].

#### Analisi statistiche

A riguardo della carne fresca, i dati sono stati sottoposti ad ANOVA (PROC GLM) secondo un modello lineare che ha incluso l'effetto dieta (3 livelli: C, P1, P2), l'effetto giorno di conservazione (8 livelli: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 giorni *post mortem*) e i loro interazione. In relazione alla carne scongelata, il modello ha incluso l'effetto metodo di congelamento (2 livelli: statico e ventilato). I dati spettrali NIRS sono stati elaborati come suggerito da Cozzi et al., 2009 [3] per ottenere le performance di calibrazione delle caratteristiche qualitative e dei costituenti nutrizionali utilizzando il software WinISI II version 1.5 (Infrasoft International LLC, State College, PA, USA). Lo stesso software è stato impiegato per stimare la corretta classificazione tra carne fresca vs scongelata e tra classi di conservazione refrigerata (da 1 a 13 giorni *post mortem*) e in funzione del trattamento alimentare (C, controllo vs P, polifenoli) mediante l'analisi discriminante (DA) basata sui dati spettrali NIRS. In dettaglio, la *principal component analysis* (PCA) è stata usata come analisi preliminare, la *partial least squares* (PLS) regressione è stata utilizzata per stimare le caratteristiche chimico-fisiche con gli spettri NIR; la PLS-DA è stata applicata per discriminare i fattori allo studio. Inoltre, i VIP index abbinati alla PLS e alla PLS-DA sono stati utilizzati per evidenziare le variabili spettrofotometriche maggiormente influenti sia in predizione sia in discriminazione [2, 4].

### Risultati e discussione

I risultati della PLS-DA tra carne scongelata e fresca evidenziano ottimali performance ( $SEC=0.12$ ;  $R^2_c=0.94$ ;  $SECV=0.14$ ;  $R^2_{cv}=0.92$ ) della tecnica NIRs nel discriminare i due metodi di conservazione con una incidenza di campioni non classificati correttamente inferiore al 4% (Tabella 1). L'elevata frazione di varianza spiegata dal modello ( $1-VR >0.90$ ) conferma che il modello di discriminazione è in grado di intercettare la maggior parte della variabilità fisico-chimica dovuta al processo di congelamento.

Tabella 1- Performance dell'analisi discriminata tra petti di pollo scongelati e freschi condotta sulla base degli spettri NIRS

	Classificato		TOTALE
	Fresco	Scongelato	
Fresco, n e (%)	96 (96.0)	4 (4.0)	100
Scongelato, n e (%)	3 (3.0)	97 (97.0)	100
Totale, n	99	101	200
Totale corretti, n e (%)			193 (96.5%)

$n = 200$ ;  $SEC = 0.12$ ;  $RSQ = 0.94$ ;  $SECV = 0.14$ ;  $1-VR = 0.92$

A riguardo del congelamento, i risultati dell'analisi statistica (non tabulati per brevità) evidenziano infatti una significativa influenza di tale tecnica di conservazione sulla qualità della carne come riportato in simili sperimentazioni [5, 6]. Si denota una decolorazione dovuta ad un aumento dei valori di luminosità  $L^*$  e di riduzione di quelli dell'indice del rosso  $a^*$ ; si è rilevata inoltre una blanda proteolisi con conseguente aumento del pH e soprattutto un incremento delle perdite di sgocciolamento dovuto al processo di scongelamento. In funzione della dose di impiego di

polifenoli si ha una attenuazione di questi fenomeni; la maggior limitazione dello scadimento qualitativo si ha nella tesi congelamento ventilato.

In riferimento alla carne fresca, il modello di analisi discriminante NIRS, basato su algoritmo PLS-DA, permette anche di distinguere le classi di conservazione in ambiente refrigerato (giorni *post mortem* o *shel-life*) nei confronti tra Giorno 1 e Giorno 5 o Giorno 9 con un sufficiente livello di precisione (Tabelle 2 e 3). Il confronto tra Giorno 1 e Giorno 3 non appare invece discriminabile con la tecnica NIRS adottata.

Tabella 2 – Petti di pollo freschi - Performance dell'analisi discriminante tra classi di refrigerazione (giorni post mortem) condotta sulla base degli spettri NIRS - Giorno 1 vs Giorno 5

	CLASSIFICATO		TOTALE
	Giorno 1	Giorno 5	
Giorno 1, n e (%)	12 (100)	0 (0)	12
Giorno 5, n e (%)	1 (8.3)	11 (91.7)	12
Totale, n	13	11	24
Totale corretti, n e (%)			23 (95.8)

$n = 24$ ;  $SEC = 0.074$ ;  $RSQ = 0.98$ ;  $SECV = 0.26$ ;  $1-VR = 0.73$

Tabella 3 - Petti di pollo freschi - Performance dell'analisi discriminante tra classi di refrigerazione (giorni post mortem) condotta sulla base degli spettri NIRS- Giorno 1 vs Giorno 9

	CLASSIFICATO		TOTALE
	Giorno 1	Giorno 9	
Giorno 1, n e (%)	12 (100)	0 (0)	12
Giorno 9, n e (%)	0 (0)	12 (100)	12
Totale, n	12	12	24
Totale corretti, n e (%)			24 (100)

$n = 24$ ;  $SEC = 0.10$ ;  $RSQ = 0.96$ ;  $SECV = 0.13$ ;  $1-VR = 0.93$

Tabella 4 - Petti di pollo freschi - Performance dell'analisi discriminante tra gruppi in funzione del regime alimentare condotta sulla base degli spettri NIRS

	CLASSIFICATO			TOTALE
	C	P1	P2	
C, n e (%)	19 (59.4)	6 (18.7)	7 (21.9)	32 (100)
P1 n e (%)	13 (40.6)	7 (21.9)	12 (37.5)	32 (100)
P2 n e (%)	12 (37.5)	3 (9.4)	17 (53.1)	32 (100)
Totale, n	44	16	36	96
Totale corretti, n e (%)				34 (44.8)

C, dieta controllo; P1, dieta a bassa dose di polifenoli; P2, dieta ad alta dose di polifenoli.  $n = 96$ ;  $SEC = 0.47$ ;  $RSQ = 0.25$ ;  $SECV = 0.47$ ;  $1-VR = 0.18$

In tabella 4 sono riportate le performance di discriminazione tra i tre trattamenti alimentari; tali performance appaiono del tutto inconsistenti ( $1-VR = 0.18$ ). E' probabile che i cambiamenti chimico-fisici dovuti all'effetto giorni di conservazione siano risultati predominanti su quelli indotti dall'effetto dieta, annullando la variabilità riconducibile a quest'ultimo trattamento.

## Conclusioni

Dai risultati della prova si è evince che l'analisi NIRS è stata in grado di discriminare correttamente i petti di pollo freschi dagli omologhi decongelati; la discriminazione tra i due metodi di congelamento appare invece inadeguata. Inoltre, la tecnica NIRS è stata in grado di differenziare i campioni freschi in funzione del tempo di conservazione, sebbene non prima di 5 giorni *post mortem*, poiché entro i primi 3 giorni di *shel-life* le caratteristiche chimico-fisiche non sembrano influenzate dal fattore conservazione. Il fattore che non è stato effettivamente discriminato mediante analisi dei spettri NIRS è quello alimentare.

## Ringraziamenti

La ricerca è relativa al progetto TRE POLI 4 ed è stata finanziata dalla FONDAZIONE CARIVERONA (call 2012)

## Bibliografia

1. E. Garbin, A. Zoroaster, L. Serva, M. Mirisola, S. Tenti, G. Marchesini, I. Andrighetto, S. Segato (2016) *Influence of ageing method on beef nutritional and organoleptic quality*. In proceedings of International Conference "Steps to sustainable livestock", Bristol, UK, 65.
2. M. Ottavian, P. Facco, M. Barolo, P. Berzaghi, S. Segato, E. Novelli, S. Balzan (2012) *Near-infrared spectroscopy to assist authentication and labeling of Asiago d'allevato cheese*. Journal of Food Engineering, 113 (2), 289-298.
3. G. Cozzi, J. Ferlito, G. Pasini, B. Contiero, F. Gottard, (2009). *Application of near-infrared spectroscopy as an alternative to chemical and color analysis to discriminate the production chains of asiago d'allevato cheese*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 11449-11454.
4. M. Ottavian, E. Franceschin, E. Signorin, S. Segato, P. Berzaghi, B. Contiero, G. Cozzi (2015) *Application of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) on faecal samples from lactating dairy cows to assess two levels of concentrate supplementation during summer grazing in alpine pastures*. Animal Feed Science and Technology, 202, 100-105.
5. S. Segato, D. Andreoli, A. Dalle Zotte, C. Elia, I. Andrighetto (2003) *Effect of ageing and exposure time on colours traits of vacuum packaged beef meat*. Italian Journal of Animal Science, Vol. II (Suppl. 1), 331-333.
6. P. Berzaghi, S. Segato, G. Cozzi, I. Andrighetto (2006) *Mid and near infrared spectroscopy to identify illegal treatments in beef cattle*. Veterinary Research Communications, 30(Suppl. 1): 109-112.



## QUANTIFICAZIONE DI *Fusarium proliferatum* IN BULBILLI DI AGLIO INTERI

Elena Tamburini<sup>1,\*</sup>, Elisabetta Mamolini<sup>1</sup>, Morena De Bastiani<sup>1</sup>, Maria Gabriella Marchetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie – Università di Ferrara – Via L. Borsari, 46 44121 Ferrara

Elena Tamburini

\*Corresponding email

### Riassunto

*Fusarium proliferatum* è un fungo saprofito diffuso in tutto il mondo e causa di numerose infezioni in agricoltura. Un metodo rapido e affidabile per la determinazione del grado di contaminazione fungina nelle piante consentirebbe di preservare la qualità e la salubrità delle produzioni agricole e dei prodotti alimentari. In particolare, *F. proliferatum* è uno dei principali agenti infettivi, responsabili del marciume nell'aglio. L'aglio è una delle più antiche produzioni agricole a livello mondiale, con una produzione complessiva che supera le 23 milioni di tonnellate annue. La diagnosi preventiva della presenza del fungo nei bulbi destinati alla semina sarebbe di grande interesse per gli agricoltori e permetterebbe di ridurre le ingenti perdite di prodotto, e quindi economiche, durante la raccolta e lo stoccaggio. Negli ultimi anni, la spettroscopia NIR è stata utilizzata per rilevare infezioni fungine in diverse matrici vegetali, ma, a conoscenza degli Autori, metodi NIR non sono mai stati applicati alla determinazione quantitativa di fungo in bulbi intatti di aglio. Perciò, obiettivo di questo studio è la messa a punto di un metodo NIR non distruttivo per la misura della concentrazione di *F. proliferatum* in bulbi interi, e la predizione dell'infezione in campioni incogniti. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$  utilizzando uno strumento NIRFlex® N-500 (Buchi, Svizzera), così come tutte le elaborazioni chemiometriche, inclusi i pretrattamenti, sono state eseguite con NIRCal® 5.4 (Buchi, Svizzera). Gli spettri sono stati acquisiti in triplo su 95 campioni, divisi in 5 classi di infezione (da 1-sani a 5- altamente infetti) in un *range* di concentrazione fungina 0.34-7231.15 ppb. I modelli di calibrazione e cross-validazione, elaborati con regressione PLS su spettri pretrattati (SNV e derivata prima), hanno fornito buona accuratezza e capacità predittiva, con un coefficiente di correlazione di 0.829 e 0.774 rispettivamente, uno *standard error of calibration* (SEC) di 615.17 ppb e uno *standard error of cross-validation* (SECV) di 717.41 ppb.

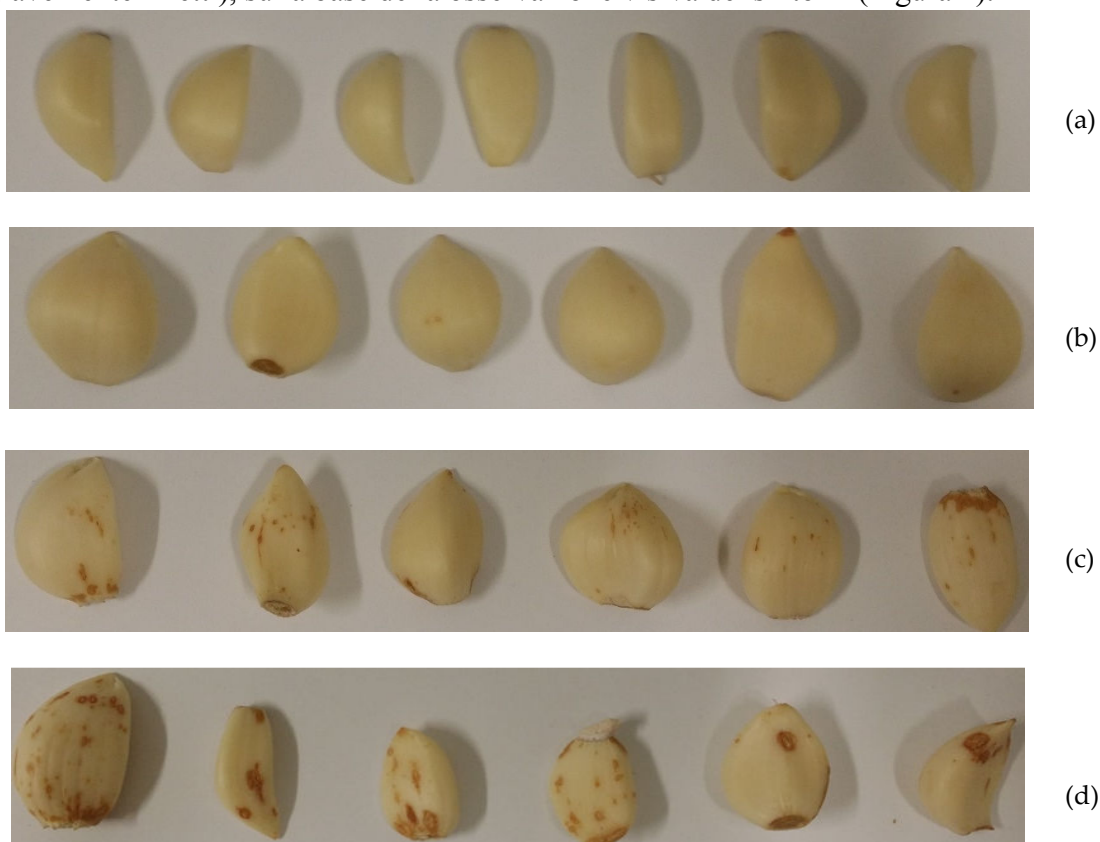
### Introduzione

*Fusarium proliferatum* è un fungo saprofito diffuso in tutto il mondo, noto come uno dei principali responsabili di numerose malattie delle piante, come le fusariosi [1]. Esso produce fumonisine, un gruppo di micotossine altamente tossigeniche per animali, piante ed esseri umani [2]. E' presente in molte specie di piante coltivate (i.e., grano, mais, riso, asparago, piselli), dimostrando una grande capacità di adattamento ad ambienti e climi diversi [3]. La contaminazione delle produzioni agricole dovuta a *F. proliferatum* genera annualmente nel mondo perdite consistenti di prodotto e significative diminuzioni della resa di produzione, con conseguenti perdite economiche rilevanti. Perciò, un sistema analitico che permetta una valutazione sensibile ed accurata del livello di contaminazione fungina nelle matrici vegetali sarebbe particolarmente utile per la salvaguardia della qualità e della sicurezza delle produzioni e dei prodotti agricoli. Per la quantificazione delle micotossine prodotte dal fungo la maggioranza delle tecniche analitiche oggi utilizzate si basano sulla cromatografia, [4], mentre per rilevare la presenza dell'infezione su analisi genetiche di chemotipizzazione [5]. Entrambi gli approcci sono certamente accurati e affidabili, ma non adatti a risposte in tempo reale. Inoltre, sono analisi costose, laboriose e che possono essere realizzate soltanto in laboratori attrezzati e da personale altamente specializzato. Recentemente, anche la

tecnica NIR è stata applicata per la determinazione di micotossine o funghi micotossigenici in prodotti agricoli, con risultati promettenti ottenuti su grano, mais e orzo [6], e riso [7]. Non ci sono però, ad oggi, evidenze di letteratura che riportino applicazioni sull'aglio. L'aglio è una delle più antiche produzioni orticole, diffusa in tutto il mondo. La produzione annuale, arriva a oltre 23 milioni di tonnellate/anno, è coperta principalmente dalla Cina. In Europa, il principale produttore è la Spagna con circa 154.000 tonnellate/anno [8]. La fusariosi è una delle principali patologie che colpisce tale coltura durante la crescita e durante lo stoccaggio, e si propaga alle generazioni successive attraverso la semina di bulbilli contaminati, dove la presenza del fungo non sempre viene riconosciuta, specialmente quando si trova negli stadi iniziali. La possibilità di mettere a punto un metodo NIR non-distruttivo per la quantificazione del fungo nei bulbilli prima della semina potrebbe rappresentare un valore aggiunto importante per l'intera filiera. Oggi viene effettuato un esame visivo e tattile da operatori specializzati. Inoltre, una volta calibrato, lo strumento NIR potrebbe essere utilizzato anche per il controllo dei bulbilli prima dello stoccaggio e dell'arrivo sul mercato. L'obiettivo di questa ricerca è stato la messa a punto di un metodo NIR per la quantificazione di *F.proliferatum* in bulbilli integri di aglio, destinati alla semina.

### Materiali e Metodi

**Campioni di aglio.** L'aglio bianco (*Allium sativum* L.) di Voghiera, in provincia di Ferrara, ha ottenuto la DOP nel 2007, e la sua produzione/raccolta è tutelata dal Consorzio dei Produttori dell'Aglio DOP. I bulbi sono stati raccolti in luglio del 2015, separati in bulbilli (spicchi) e privati della tunica esterna. La selezione dei campioni è stata eseguita secondo un disegno sperimentale completamente casuale, per assicurare la rappresentatività del campione prelevato dal campo. I bulbilli sono stati classificati in base al grado di infezione secondo una scala empirica da 1 (sani) a 5 (gravemente infetti), sulla base della osservazione visiva dei sintomi (Figura 1).





(e)

Figura 1. Effetto di infezione progressiva da *F. proliferatum* su campioni di bulbilli: (a) CLASSE 1: sani o asintomatici; (b) CLASSE 2: leggermente infetti; (c) CLASSE 3: infetti; (d) CLASSE 4: molto infetti; (e) CLASSE 5: gravemente infetti o completamente danneggiati.

Sono stati raccolti in totale 95 bulbilli, 20 per ciascun grado di infezione, ad eccezione della CLASSE 4 per la quale sono stati raccolti 15 campioni. I campioni senza tunica sono stati conservati in sacchetti di plastica a 4°C fino al momento dell'analisi NIR e di riferimento. Sono stati raccolti altri 45 campioni per i test di validazione: 15 sono stati privati della tunica, come i campioni di calibrazione, e 30 lasciati integri.

**Analisi NIR.** Gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento NIRFlex N-500 (Büchi, Svizzera), appoggiandoli sulla superficie di vetro di un sistema portacampioni XL di 2,5 cm di diametro. Per ciascun bulbillo, sono stati acquisiti tre spettri in posizioni diverse casuali. Lo spettro è stato acquisito nell'intervallo 1000-2500 nm, a intervalli di 8 nm. Per ottimizzare il rapporto segnale/rumore, lo spettro finale è il risultato della media di 16 scansioni.

**Elaborazioni chemiometriche.** Tutte le elaborazioni statistiche e chemiometriche sono state realizzate con NIRCal 5.0 (Büchi, Svizzera). La selezione delle lunghezze d'onda, la regressione PLS e tutti i parametri statistici sono stati ottenuti dalla procedura automatica Calibration Wizard® inclusa nel software. Prima della regressione gli spettri sono stati pretrattati con SNV e derivata prima (Savitzky-Golay, 3 punti) [9-10].

**Identificazione di *F. proliferatum*, estrazione del DNA e quantificazione del fungo.** Il ceppo fungino di riferimento (designazione s., 1004.1) è stato fatto crescere in terreno PDA a temperatura ambiente per 5 giorni al buio. Il DNA è stato estratto dai bulbilli e purificato secondo la procedura riportata da Griffin [11].

## Risultati e Discussione

In Figura 2 sono mostrati gli spettri NIR originali e pretrattati ottenuti come media per ciascun grado di infezione.

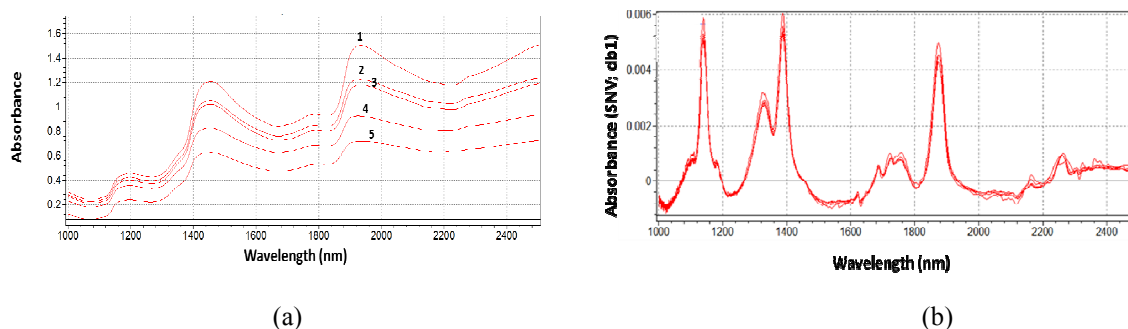


Figura 2. Spettri NIR (a) originali e (b) pretrattati, di bulbilli interi a diverso grado di infezione. Ogni spettro rappresenta la media per il grado di infezione indicato.

Gli spettri sono dominati dai picchi: a 1150 e 1360, dovuti al secondo *overtone* dello stretching del CH di gruppo CH<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub> della chitina [12], presente nella parete cellulare del fungo; a 1390-1400 nm, dovuti al secondo *overtone* dello stretching dell'OH dell'acqua, e ai legami OH presenti nelle fumonisine e nell'allixina, una fitoalessina presente ad alte concentrazioni nell'aglio [13]; a 1900 nm, dovuto al primo *overtone* dello stretching dell'OH dell'acqua. Il gruppo di segnali deboli a 1650-1750 nm, potrebbe essere dovuto agli aminoacidi zolfo allyl-cisteina e allicina, presenti nell'aglio [14]. La retta di regressione e di cross-validazione sono mostrate in Figura 3, insieme con i coefficienti di regressione, mentre i parametri statistici riassunti in Tabella 1.

Tabella 1. Elaborazione dei risultati della regression PLS per *F. proliferatum*.

Parametro	Calibrazione	Cross Validazione
Unità	ppb	ppb
SEL-riproducibilità	0.10	0.10
#campioni	190	95
Outliers	0	0
Min	0.34	0.95
Max	7231.15	6541.89
SD	1391.17	1467.98
WL range/step (nm)	1000–2500/8	1000–2500/8
Number of factors	4	-
SEC	615.17	-
R <sup>2</sup>	0.829	0.774
SECV	-	717.41
NIR repeatability	0.11	0.11
RPD	2.26	2.04

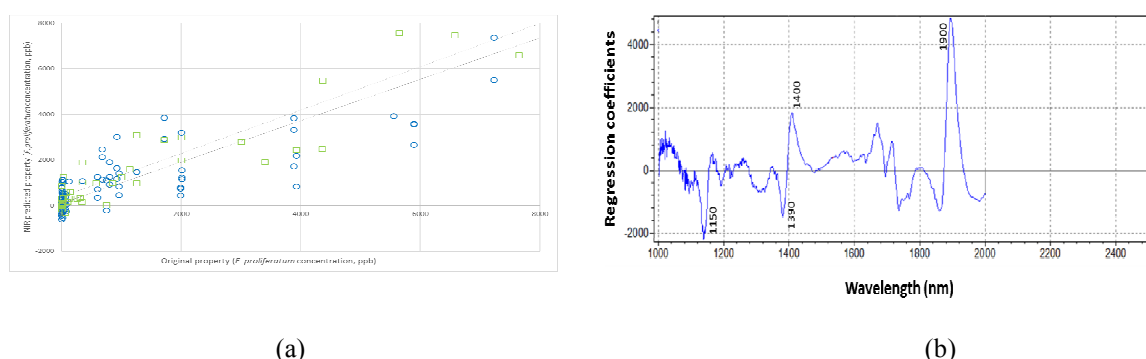


Figura 3. Retta di calibrazione (blu) e di cross-validazione (verde) per la concentrazione (ppb) di *F. proliferatum* in campioni senza tunica di bulbilli di aglio integri (a) e coefficienti di regressione PLS.

La validazione esterna ha avuto lo scopo di valutare la capacità predittiva e la robustezza del modello di calibrazione, nei due casi con bulbilli senza tunica e con la tunica. L'introduzione di campioni con la tunica è stata fatta dal momento che la futura sfida di questa applicazione è rappresentata dalla possibilità di sottoporre all'analisi NIR i campioni totalmente integri da inviare alla semina, al di là della valutazione della fattibilità del metodo realizzata con questo studio e per il quale è stato necessario privare i campioni dell'involucro esterno. I risultati dei due test di validazione esterna sono riportati in Figura 4.

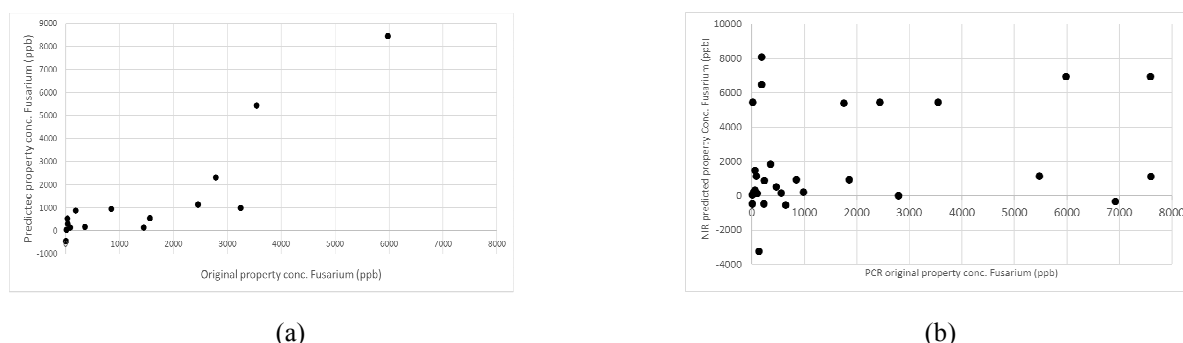


Figura 4. Validazione esterna per la predizione della concentrazione di *F. proliferatum* di 15 campioni incogniti di bulbilli senza tunica (a) e di 30 campioni incogniti di bulbilli con la tunica (b).

Come si può notare, la validazione esterna con i campioni senza tunica, simili a quelli utilizzati per la calibrazione ha dato risultati abbastanza soddisfacenti, dimostrando una promettente abilità predittiva della concentrazione di fungo in campioni incogniti ( $R^2=0.7614$  e  $RMSEP=1458.23$  ppb). Al contrario, come in parte atteso, la validazione esterna con campioni con la tunica non ha

mostrato alcuna correlazione, ad indicare come la presenza della tunica influenzi in maniera determinante il segnale spettrale. Come prospettiva futura, la possibilità di includere nella calibrazione anche la variabile “presenza della tunica” potrebbe migliorare la qualità del modello.

### Conclusioni

L'applicazione della tecnica NIR alla determinazione quantitativa della concentrazione di *F.proliferatum* in campioni di aglio interi, privati della tunica ha dato risultati nel complesso soddisfacenti e con ulteriori implementazioni del modello potrebbe essere utilizzato per migliorare la qualità e la sicurezza della produzione.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato realizzato grazie al contributo finanziario del Consorzio di Tutela dell'Aglio di Voghiera DOP.

### Bibliografia

1. Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O.; Vismer, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 2101–2105.
2. Da Rocha, M.E.B.; Freire, F.D.C.O.; Maia, F.E.F.; Guedes, M.I.F.; Rondina, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 2014, 36, 159–165.
3. Waskiewicz, A.; Beszterda, M.; Golinski, P. Occurrence of fumonisins in food—An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control* 2012, 26, 491–499.
4. Spanjer, M.C.; Rensen, P.M.; Scholten, J.M. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. *Food Addit. Contam.* 2008, 25, 472–489.
5. Yörük, E.; Albayrak, G. Chemotyping of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by PCR assay. *Mycopathologia* 2012, 173, 53–61.
6. Pettersson, H.; Åberg, L. Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control* 2003, 14, 229–232.
7. Sirisomboon, C.D.; Putthang, R.; Sirisomboon, P. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control* 2013, 33, 207–214.
8. FAOSTAT. 2014. Available online: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> (accessed on 21 April 2016).
9. Dhanoa, M.S.; Lister, S.J.; Sanderson, R.; Barnes, R.J. The link between multiplicative scatter correction (MSC) and standard normal variate (SNV) transformations of NIR spectra. *J. Near Infrared Spectrosc.* 1994, 2, 43–47.
10. Vivó-Truyols, G.; Schoenmakers, P.J. Automatic selection of optimal Savitzky-Golay smoothing. *Anal. Chem.* 2006, 78, 4598–4608.
11. Griffin, D.W.; Kellogg, C.A.; Peak, K.K.; Shinn, E.A. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* 2002, 34, 210–214.
12. Workman, J., Jr.; Weyer, L. *Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2008.
13. Kodera, Y.; Ayabe, M.; Ogasawara, K.; Yoshida, S.; Hayashi, N.; Ono, K. Allixin accumulation with long-term storage of garlic. *Chem. Pharm. Bull.* 2002, 50, 405–407.
14. Lawson, L.D.; Gardner, C.D. Composition, Stability, and Bioavailability of Garlic Products Being Used in a Clinical Trial. *J. Agric. Food. Chem.* 2005, 53, 6254–6261.

## QUANTIFICAZIONE NON DISTRUTTIVA DEL CONTENUTO DI CAROTENOIDI IN COCOMERI INTERI (*Citrullus lanatus*) ATTRAVERSO LA TECNICA NIR-on line.

Elena Tamburini<sup>1,\*</sup>, Giuseppe Ferrari<sup>2</sup>, Paola Pedrini<sup>1</sup>, Valentina Donegà<sup>1</sup>, Marco Malavasi<sup>3</sup>, Maria Gabriella Marchetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Life Sciences and Biotechnology, University of Ferrara, Via L. Borsari 46, 44121 Ferrara, Italy

<sup>2</sup> Büchi Italia S.r.l., Via Galileo Galilei, 34, 20010 Cornaredo (Milano), Italy

<sup>3</sup> Soc. Coop. Agricola “La Diamantina” Ferrara, Italy

Elena Tamburini

\*Corresponding email

### Riassunto

Frutta e verdura sono le principali fonti naturali di antiossidanti. Gli antiossidanti, come è noto, proteggono l'organismo dai radicali liberi e riducono il rischio di cancro e disturbi cardiovascolari. Tra tutti, il più efficiente conosciuto è il licopene, un pigmento naturale che protegge il corpo umano proprio dagli effetti negativi delle sostanze ossidanti. La principale fonte naturale di licopene è, insieme con il pomodoro, il cocomero fresco a polpa rossa. L'impiego della spettroscopia NIR in fase di post-raccolta ha permesso di quantificare la concentrazione di licopene presente nei singoli frutti interi, in modo rapido e non distruttivo. Nelle campagne 2013 e 2014 sono stati raccolti 110 campioni, coprendo tutti gli stadi della maturazione dei frutti. Ciascun frutto è stato analizzato al NIR mentre era sul nastro trasportatore a 3 diverse velocità di transito (tra 35 e 45 Hz) e in 6 diverse posizioni, per simulare le diverse condizioni operative in fase di stoccaggio, e la caduta casuale dei frutti dai cassoni di raccolta. Un totale di 1650 spettri nell'intervallo 10000-4000  $\text{cm}^{-1}$  sono stati raccolti, utilizzando un NIR OnLine® (Buchi, Svizzera). I modelli di calibrazione sono stati costruiti attraverso il software SX-Plus® (Buchi, Svizzera). Il *range* di concentrazione del licopene era 17.6-150.7 mg/kg di polpa fresca (dati ottenuti attraverso analisi tradizionale basata su HPLC). Il modello PLS ha permesso di predire in tempo reale la concentrazione di licopene con  $R^2$  di 0.877 e SECV di 15.68 mg/kg. La validazione esterna con campioni incogniti ha confermato la capacità predittiva di licopene con  $R^2$  di 0.805 e SEP of 16.19 mg/kg.

### Introduzione

Oggi giorno, il consumo di frutta non è più solo una questione di gusti o preferenze personali, ma sta diventando un aspetto fondamentale del raggiungimento di uno stato di salute e benessere [1]. La frutta e i prodotti alimentari a base di frutta rappresentano una porzione sempre più significativa dell'alimentazione umana a livello mondiale e ciò è associato con la diminuzione del rischio dell'incidenza di alcuni tipi di cancro e malattie cardiovascolari [2]. Molte di queste proprietà benefiche sembrano essere correlate con il contenuto di antiossidanti, in particolare di carotenoidi. Anche se il corpo umano non è in grado di sintetizzarli, essi sono ubiquitari e contribuiscono ad un gran numero di processi fisiologici bilanciando lo stress ossidativo delle cellule [3]. Chimicamente essi rappresentano un gruppo di pigmenti, dal colore variabile dal giallo al rosso, caratterizzati da una catena carboniosa C40 ad alto livello di insaturazione [4]. Il licopene ha un potere antiossidante maggiore rispetto agli altri carotenoidi, e ha quindi destato l'interesse dei ricercatori [5]. Oltre ai pomodori, che sono stati studiati in maniera estensiva come fonte di licopene [6,7], il cocomero rappresenta una fonte di carotenoidi in generale, e licopene in particolare, molto interessante. Il suo contenuto medio di licopene è di 37-122 mg/kg, in dipendenza del grado di maturazione e della temperatura esterna durante lo sviluppo dei frutti, e rappresenta circa il 40% in più del contenuto medio di licopene nei pomodori maturi (25-90 mg/kg) [8].

Grazie alla crescente importanza del licopene come un ingrediente nutraceutico nei cibi e negli integratori, c'è un grande interesse nella ricerca e sviluppo di prodotti naturali ricchi di questa sostanza. Ciò richiede la disponibilità di strumentazioni analitiche adeguate al monitoraggio in tempo reale e in maniera non distruttiva del contenuto di queste importanti sostanze negli alimenti. Sono attualmente disponibili tecniche basate sulla cromatografia e sulla spettroscopia UV-vis, anche se in entrambi i casi il primo passaggio è sempre l'estrazione del licopene dalla matrice vegetale con solventi e una successiva purificazione spinta del campione [9]. L'applicazione di una tecnica analitica rapida, non distruttiva, *solvent-free* e facilmente utilizzabile in campo, come la tecnica NIR, potrebbe rappresentare un grande vantaggio rispetto alle tecniche tradizionali [10]. La tecnica NIR è già stata impiegata per la determinazione quantitativa non distruttiva di licopene in polpa e buccia di pomodoro [11]. Nonostante delle difficoltà dovute alla presenza della buccia e all'elevato contenuto di acqua della polpa (tipicamente il 90%), la tecnica NIR in riflettanza diffusa è stata utilizzata con successo per la predizione del contenuto di zuccheri come sostanza secca solubile (TSS) nei cocomeri interi [12]. Scopo di questo lavoro è stato proprio la messa a punto di un metodo NIR on-line per la quantificazione della concentrazione dei carotenoidi licopene e beta-carotene, e della TSS come indice del grado zuccherino, in frutti interi. Sulla base dei risultati ottenuti, lo strumento NIR è stato posizionato direttamente sulla linea di calibratura e selezione dei frutti, prima del confezionamento. Obiettivo finale del lavoro era la valorizzazione commerciale del prodotto.

## Materiali e Metodi

*Campioni di cocomero.* Per questo studio sono stati utilizzati cocomeri (*Citrullus lanatus*) appartenenti alla varietà MINIROSSA<sup>®</sup>. Questa è una varietà appositamente selezionata per l'alto contenuto di carotenoidi, le piccole dimensioni (diametro, 100-150 mm) e la buccia particolarmente sottile (<0.5 mm). I frutti sono stati coltivati in pieno campo in Pianura Padana, e raccolti durante le tre campagne 2013-2014-2015 nel periodo tra giugno e settembre. Poiché non è disponibile un sistema standardizzato di verifica del grado di maturazione dei cocomeri, la raccolta ha seguito la normale pratica di campagna di ascolto del rimbombo della buccia, introducendo un'inevitabile margine di errore. Durante il 2013, sono stati raccolti 40 campioni ad un grado di maturazione del 100%, mentre nel 2014 sono stati raccolti 60 campioni, 12 per ciascun grado di maturazione preso in considerazione: 50% (acerbo), 80% (quasi maturo); 100% (maturo), 110% (molto maturo) e 130% (sovramaturo). Nel 2015, sono stati presi altri 35 frutti a vari gradi di maturazione, per i test di validazione esterna. In totale sono stati raccolti 135 campioni.

*Acquisizione degli spettri.* Gli spettri sono stati acquisiti utilizzando uno strumento NIRON-Line<sup>®</sup> X-One (Büchi, Svizzera), dotato di diode array. L'intervallo di lunghezze d'onda è compreso tra 900 e 1700 nm, con un tempo di misura di 10 millisecondi e un intervallo di 10 nm. Il frutto è si trova ad una distanza di circa 40 mm dalla finestra ottica dello strumento (Figura 1). Nel 2013, ogni frutto è stato sottoposto all'analisi in maniera stazionaria, in due differenti posizioni, ottenendo 80 spettri. Nel 2014 ciascun frutto è stato campionato mentre era in movimento sul nastro della calibratrice, a diverse velocità di scorrimento (2100, 2400 e 2700 rpm) e in 4 diverse posizioni, per simulare il più possibile la situazione reale di posizionamento casuale dei frutti sul nastro, ottenendo 720 spettri. Infine, nel 2015, ogni frutto è stato campionato una sola volta durante il passaggio sul nastro, in una situazione effettivamente reale, per un totale di 35 spettri.



Figura 1. Modalità di acquisizione degli spettri per ciascun frutto mentre passa sul nastro trasportatore della linea calibratrice.

*Analisi dei dati.* Gli 835 spettri raccolti sono stati pretrattati con derivata prima e SNV e sottoposti a regressione PLS utilizzando il software SX-Plus® (Büchi, Svizzera). Il modello di calibrazione è stato validato attraverso *leave-one-out* cross-validation, rimuovendo il 20% dei campioni, e valutato attraverso il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ), l'errore standard di calibrazione (SEC), l'errore standard di cross-validazione (SECV). L'analisi degli outliers è stata effettuata attraverso il criterio della distanza di Mahalanobis. La validazione esterna è stata effettuata con Microsoft Excel 2010®, e valutata statisticamente con  $R^2$  e RMSEP [13].

*Analisi di riferimento.* La concentrazione di licopene e beta-carotene è stata determinata dopo estrazione in cloroformio in HPLC (Jasco, Japan) [14], mentre la TSS come misura del grado rifrattometrico Brix.

## Risultati e Discussione

Gli spettri sono mostrati in Figura 1. L'*offset* della linea di base degli spettri acquisiti nel 2014 (Figura 1(a)) potrebbe essere dovuta all'effetto del movimento a diverse velocità dei frutti durante l'acquisizione, mentre nel 2013 (Figura 1(b)) sono stati acquisiti sul nastro trasportatore fermo. Lo score plot (Figura 1(c)) ha evidenziato la presenza di due clusters, basati sull'anno di raccolta dei campioni. È interessante notare come, inoltre, all'interno del cluster del 2014, un ulteriore sub-gruppo corrisponda ai campioni sovramaturi (130%). Essi hanno spesso caratteristiche anche morfologiche diverse dagli altri campioni, per colore, consistenza del frutto e anche caratteristiche interne della qualità della polpa (meno consistente). Analisi quantitative sulle caratteristiche chimiche della polpa (dati non riportati) hanno altresì mostrato che nei campioni sovramaturi le caratteristiche chimico-fisiche sono molto diverse rispetto ai campioni da acerbi fino al grado di maturazione 110%.

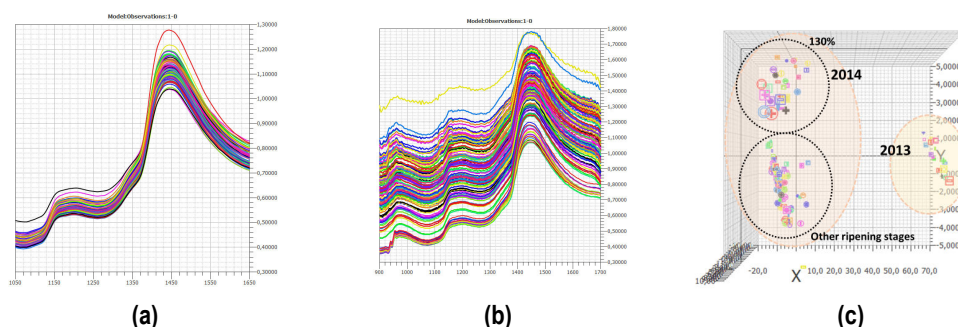


Figura 1. Spettri di cocomeri interi acquisiti nel 2013 (a) e nel 2014 (b); e scores plot degli spettri (c).

Poiché gli spettri sono stati raccolti su frutti freschi, essi sono dominati dalla presenza del segnale dell'acqua a 1460 nm, dovuto al primo *overtone* e alle bande di combinazione dell'OH [15].



Tipicamente, gli spettri delle matrici vegetali fresche non permettono una facile interpretazione visuale, a causa della presenza di numerosi interferenti. In ogni modo, è possibile riconoscere ed evidenziare i segnali nel range 900-1050 e 1400-1500 nm corrispondenti al secondo e primo *overtone* del legame OH degli zuccheri, oltre che dell'acqua, e nel range 1100-1250, 1300-1350 e 1650-1700 nm, corrispondenti rispettivamente al terzo *overtone*, bande di combinazione e primo *overtone* del legame CH dei carotenoidi.

Le calibrazioni ottenute attraverso la regressione PLS sui dati sono mostrate in Figura 2.

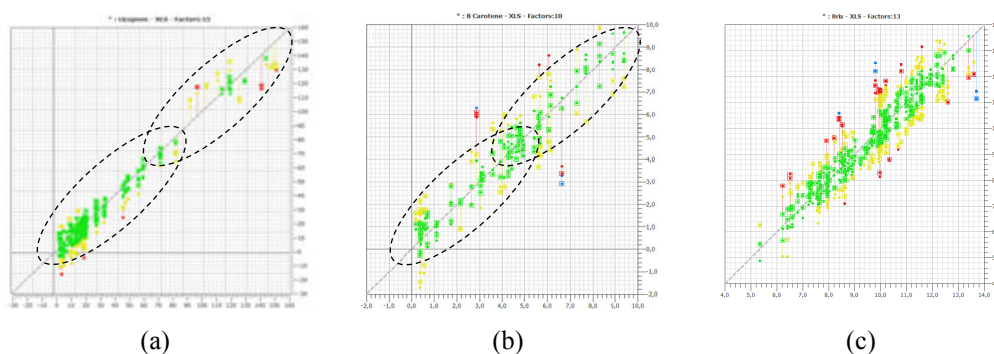


Figura 2. Rette di calibrazione per il licopene (a), beta-carotene (b) e TSS (c). I punti rossi e blu sono outliers e non inclusi nella calibrazione.

Per quello che riguarda il licopene e il beta-carotene, si può notare come i dati che derivano da campioni provenienti dal 2013 e dal 2014 siano completamente separati in due diverse parti della retta, in particolare i campioni raccolti nel 2013 hanno mediamente una concentrazione più alta di quelli relativi al 2014, cosa che deriva dalla diversa situazione climatica stagionale nei due anni. È noto infatti che la concentrazione di carotenoidi è strettamente dipendente dalla temperatura esterna e dalla piovosità. Il 2013 è stato caratterizzato da temperature particolarmente alte e scarsissima piovosità, al contrario del 2014, che è stato, in Pianura Padana, uno degli anni con l'estate più fredda e piovosa da decenni. I dati di TSS invece, sono completamente sparsi, cosa che è coerente con il fatto che il contenuto zuccherino, certamente dipende dal clima, ma dipende soprattutto dal grado di maturazione, indipendentemente dai fattori esterni. Le rette di validazione esterna sono mostrate in Figura 3.

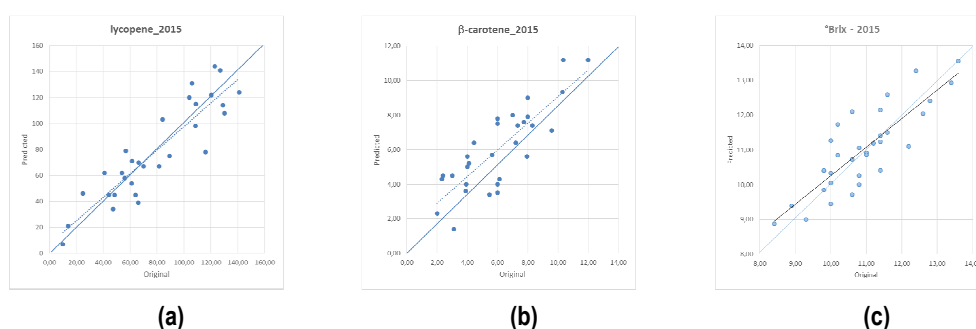


Figura 3. Correlazioni derivanti dalle validazioni esterne per licopene (a), beta-carotene (b) e TSS (c).

In Figura sono riportate le correlazioni ottenute tra i dati delle analisi di riferimento per i parametri di interesse, e i dati predetti dal NIR sui 35 campioni raccolti nel 2015. Un solo spettro per frutto è stato acquisito nelle condizioni di reale utilizzo dello strumento, lungo il nastro trasportatore dopo lo scarico dal container e prima della linea di selezione. L'errore di predizione (RMSEP) è intorno al 20% per ogni parametro.

La Tabella 1 mostra un riepilogo delle elaborazioni statistiche dei tre modelli sviluppati.

Tabella 1. Statistica della calibrazione, cross-validazione e validazione esterna per licopene, beta-carotene e TSS.

	Licopene (mg/kg)		beta-carotene (mg/kg)		TTS (%)	
	<i>CAL</i>	<i>EXT VAL</i>	<i>CAL</i>	<i>EXT VAL</i>	<i>CAL</i>	<i>EXT VAL</i>
# <i>CAMPIONI</i>	100	35	100	35	100	35
<i>RANGE</i>	2.65-151.75	7.00-141.23	0.19-9.39	2.00-11.68	5.3-13.7	8.8-13.2
# <i>SPETTRI</i>	759	35	735	35	754	35
<i>R</i> <sup>2</sup>	0.877	-	0.822	-	0.836	-
<i>SEC</i>	14.8	-	0.75	-	0.7	-
<i>R</i> <sup>2</sup> <sub>CV</sub>	0.756	-	0.810	-	0.820	-
<i>SECV</i>	15.7	-	0.81	-	0.8	-
<i>R</i> <sup>2</sup>	-	0.805	-	0.737	-	0.707
<i>RMSEP</i>	-	16.2	-	0.98	-	1.4

## Conclusioni

L'applicazione della tecnica NIR on line nella fase di post-raccolta dei cocomeri può rappresentare un significativo passo avanti per migliorare la qualità dei prodotti. Caratterizzare il contenuto di licopene, beta-carotene e TSS come indice del contenuto zuccherino dei frutti interi potrebbe permettere ai produttori di valorizzare il contenuto nutrizionale del cocomero e quindi contribuire a migliorare la consapevolezza dei consumatori circa i benefici sulla salute derivanti dal consumo di frutta fresca con la dieta.

## Bibliografia

1. Vereecken, C.; Pedersen, T. P.; Ojala, K.; Krølner, R.; Dzielska, A.; Ahluwalia, N.; Kelly, C. The European Journal of Public Health, **2015**, 2, 16-19.
2. Oyebo, O.; Gordon-Dseagu, V.; Walker, A.; Mindell, J.S. J. Epidemiol. Community Health, **2014**, 68, 856-862.
3. Fiedor, J.; Burda, K. Nutrients, **2014**, 6, 466-488.
4. Karrer, P.; Juncker, E. Carotenoids. Elsevier Publishing Company Inc., New York, USA, **1950**
5. Liu, C.; Liu, W.; Chen, W.; Yang, J.; Zheng, L. Food Chemistry, **2015**, 173, 482-488.
6. Story, E.N.; Kopec, R.E.; Schwartz, S.J.; Harris, G.K. Annual Review of Food Science and Technology, **2010**, 1, 189-210.
7. Chen, J.; Song, Y.; Zhang, L. J Nutr Sci Vitaminol, 2013, 59, 213-223.
8. Perkins-Veazie, P.; Collins, J.K. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **2006**, 54, 5868-5874.
9. Dimitrowski, D.; Bicanic, D.; Luterotti, S.; van Twisk, C.; Buijnsters, J.G.;mDoka, O. Postharvest Biology and Technology, **2010**, 58, 21-28.
10. Pasquini, C. Journal of Brazilian Chemical Society, **2003**, 14, 198-219.
11. Pedro. A.M.K.; Ferreira, M.M.C. Analytical Chemistry, **2005**, 77, 2505-2511.
12. Jie, D.; Xie, L.; Rao, X.; Ying, Y. Postharvest Biology and Technology, **2014**, 90, 1-6.
13. Martens, H.; Martens, M., Multivariate calibration in quality, J.Wiley&Sons, Chicester, UK, **2001**.
14. Naviglio, D.; Caruso, T.; Iannece, P.; Aragon, A.; Santini, A. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56 6227-6231.
15. Shenk, J.S. Application of NIR Spectroscopy to agricultural products. In Handbook of Near Infrared Analysis; Burns, D.A., Ciurczak, R.W., Eds.; CRC Press: Boca Raton, USA, **2001**.
16. Bang, H.; Leskovar, D. I.; Yoo, K. Horticultural Science, **2004**, 39, 803-803.

## MODELLI PREVISIONALI PER LA VALUTAZIONE DELLO STADIO DI MATURAZIONE DI BANANITO MEDIANTE HYPERSPECTRAL IMAGING

Yuan-Yuan Pu<sup>1</sup>, Tiziana M. P. Cattaneo<sup>2\*</sup>, Marina Buccheri<sup>2</sup>, Maurizio Grassi<sup>2</sup>, Aoife Gowen<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biosystems & Food Eng., UCD, Dublin – Ireland

<sup>2</sup> CREA, Via Venezian 26 – 20133 Milano, Italy –

Presenting Author

[\\*tiziana.cattaneo@crea.gov.it](mailto:tiziana.cattaneo@crea.gov.it)

### Riassunto

Frutti di Bananito [*Musa acuminata* (AA)], un tipo di banana con frutti molto piccoli (circa 10 cm) e dolci, sono stati analizzati con metodi distruttivi e non distruttivi. Sono stati rilevati i seguenti parametri: colore ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , Cromo \* e Hue), misure fisico chimiche [amido, contenuto in solidi solubili (TSS) e acidità], e indici di consistenza della polpa (durezza e forza di compressione). Tali valori sono stati messi in relazione con i dati raccolti con telecamera iperspettrale per l'analisi dell'immagine nello spettro visibile (Vis) e NIR al fine di elaborare modelli previsionali dello stadio di maturazione. E' stato messo a punto un algoritmo di elaborazione delle immagini per rimuovere i "bad pixel" nelle immagini iperspettrali NIR dei frutti di bananito. L'elaborazione dei modelli previsionali è stata effettuata applicando la regressione PLS ai dati spettrali preprocessati (X) e ai dati qualitativi di riferimento (Y). I modelli PLS generati da dati iperspettrali Vis e NIR non sono stati in grado di fornire risultati soddisfacenti per i parametri SSC, acidità e consistenza dei frutti. L'elaborazione delle immagini iperspettrali Vis ha avuto successo nella previsione del parametro  $a^*$  (rosso-verde) del colore, della *hue* ( $R_p^2 = 0,81$ ) e dell'indice di amido ( $R_p^2 = 0,84$ ) dei frutti di bananito. Sono stati programmati ulteriori set di prove al fine di ottimizzare anche la risposta NIR.

### Introduzione

Il Bananito [*Musa acuminata* (AA)] è una tipologia di banana molto piccola (circa 10 cm di lunghezza) con un sapore più dolce e una consistenza più cremosa delle normali banane. I "Bananitos" sono molto diffusi nei paesi tropicali e sono apprezzati perché ricchi di vitamine e minerali e soprattutto per l'elevato contenuto di potassio, che riduce il rischio di ictus e contribuisce ad abbassare la pressione sanguigna [1].

Normalmente lo stadio di maturazione dei bananitos viene valutato per semplice confronto con carte colorimetriche. Questo metodo, seppur veloce, risente della soggettività dell'operatore e non dà informazioni sulla reale qualità del frutto (consistenza, dolcezza, etc..). Le misure tradizionali dei parametri qualitativi invece richiedono tempo e comportano la distruzione dei campioni. Sarebbe quindi necessario individuare un metodo di rilevazione rapida e non distruttiva dei bananitos che consenta una sicura individuazione dello stadio di maturazione e dei parametri qualitativi del frutto. Sulla base di tali rilievi i bananitos, dopo la raccolta, potrebbero essere avviati alla distribuzione o allo stoccaggio in magazzino evitando sprechi di prodotto.

Pochissimi lavori in bibliografia trattano gli aspetti qualitativi di questa tipologia di banana e nessuno studio è stato effettuato applicando la tecnologia NIR o le tecniche di immagine iperspettrale.

Alcune ricerche sono state condotte su banane "tradizionali" utilizzando la spettroscopia visibile (Vis) e vicino infrarosso (NIR) e l'analisi multivariata. Usando uno spettrofotometro UV-VIS-NIR (350-1700nm) in riflettanza, Zude [2] ha ottenuto una buona previsione del contenuto di clorofilla ( $R^2 > 0.70$ ) e zuccheri (somma di glucosio, fruttosio e saccarosio) ( $R^2 > 0.94$ ) in frutti di banana. Altri

autori [3], utilizzando VIS e NIR a onda corta ( $nm < 1200$ ) non hanno invece ottenuto una predizione sufficientemente accurata del contenuto in solidi solubili (TSS) probabilmente a causa della buccia troppo spessa. Attraverso modelli PLS sviluppati da spettri in trasmittanza (299-1100 nm) è stata ottenuta una previsione abbastanza precisa del contenuto in sostanza secca, TSS, TSS/acidità e pH, con coefficienti di correlazione compresi fra 0.78 e 0.90.

L'hyperspectral imaging è una tecnologia molto promettente, che consente una notevole velocità di acquisizione dei dati e non richiede il contatto con la superficie del campione. Con questa tecnica è possibile raccogliere nello stesso momento spettri da differenti domini spaziali dei campioni analizzati e ciò fornisce informazioni supplementari per la successiva analisi dei dati. Rajkumar et al. [4] hanno utilizzato con successo l'hyperspectral imaging (400-1000 nm) per prevedere, mediante modelli PLS, l'umidità, la consistenza e i TSS di banane a diversi stadi di maturazione, con coefficienti di determinazione rispettivamente di 0.85, 0.87 e 0.91.

L'obiettivo di questo studio è stato valutare l'uso dell'HyperSpectral Imaging Vis (Vis-HSI) e NIR (NIR-HSI), combinata con l'elaborazione delle immagini e l'analisi multivariata dei dati per la previsione dello stadio di maturazione e dei parametri qualitativi di frutti di bananitos.

## Materiali e Metodi

### *Campioni*

Sono state analizzate novanta coppie di bananitos, formate dai due frutti centrali di novanta differenti "mani" e appartenenti a tre classi di maturazione (30 coppie per classe). Un frutto di ogni coppia è stato utilizzato per l'analisi chimica di riferimento, l'altro è stato utilizzato per la raccolta delle immagini iperspettrali. Per le analisi NIR-HSI e Vis-HSI, ogni frutto è stato scansionato da entrambi i lati.

### *Determinazione dei parametri di qualitativi*

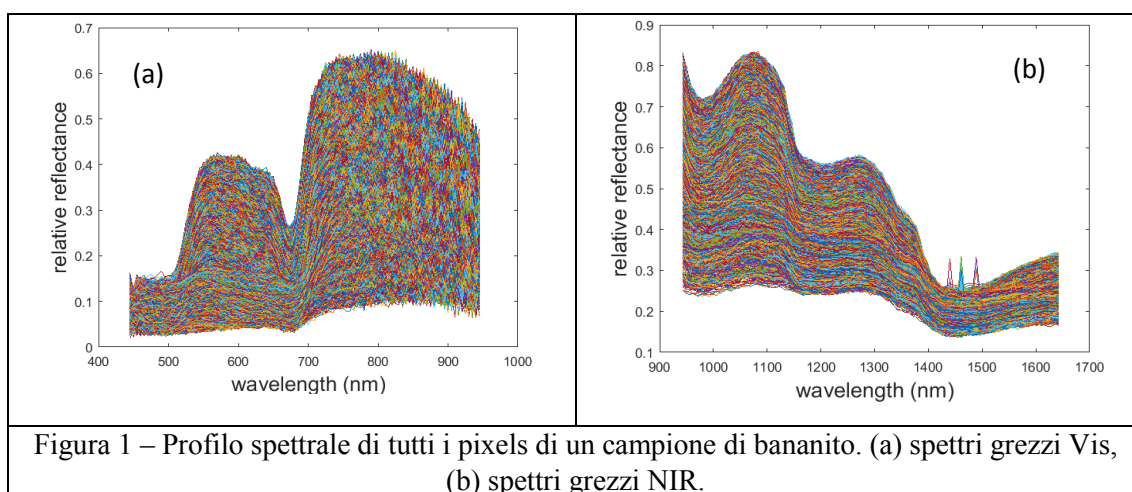
Per la misura dei parametri colorimetrici ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , *hue*) è stato utilizzato un colorimetro portatile (CM-2600d, Konica Minolta, Inc., Giappone). Il test iodio/ioduro per la determinazione della quantità di amido è stato effettuato seguendo il protocollo di Blankenship et al. [5]. I TSS sono stati determinati mediante un rifrattometro digitale su un campione di polpa (per ogni frutto) omogeneizzato 1:3 con acqua distillata [5]. L'acidità è stata misurata sugli stessi campioni mediante titolazione fino a un pH di 8.2 con NaOH 0.1N. La consistenza dei frutti è stata determinata con due differenti metodi: mediante il test Magness-Taylor [6] (sulla polpa, con puntale di 6,5 mm) e mediante test di compressione (sull'intero frutto) misurando la forza massima (g) necessaria per comprimere il frutto di 1mm (crossh. speed 30mm/min).

### *Sistemi HSI*

Per acquisire le immagini dei bananitos sono stati utilizzati due sistemi HSI, il primo nel range del visibile (400-1000 nm) con 5nm di risoluzione spettrale, il secondo operante nell'intervallo da 880 a 1720 nm con 7nm di risoluzione spettrale [7].

### *Elaborazione delle immagini*

A causa di possibili errori strumentali di misura, le immagini RAW devono essere controllate prima dell'elaborazione. Per il check iniziale delle immagini è stato utilizzato il programma Matlab 2015A (The Math Works, Inc. USA). Per ogni immagine, gli spettri di tutti i pixel sono stati estratti e plottati come funzioni di bande di frequenza, in modo da rilevare visivamente gli eventuali "bad pixels" (pixel con letture spettrali anomale). La fig.1 mostra i profili spettrali di uno stesso campione analizzato in Vis (a) e NIR (b). Alcuni picchi anomali con valori spettrali molto alti sono stati identificati nella gamma spettrale NIR 1400-1500 nm.



### Elaborazione degli spettri

Dopo aver rimosso i pixel difettosi da ciascuna immagine, lo spettro medio di ogni campione è stato ottenuto facendo la media di tutti i pixel campionati da entrambi i lati del frutto. Per ridurre le variazioni spettrali dovute alla diffusione della luce e alla leggera variabilità nella distanza fra i campioni e il rivelatore, gli spettri medi sono stati pre-trattati utilizzando la standard normal variate (SNV) seguita da mean center (MC). Gli spettri pre-trattati sono stati utilizzati per il modello.

### PLS

Per la creazione dei modelli è stata utilizzata la regressione PLS (Partial Least Squares) utilizzando PLS\_Toolbox (Eigenvector Research, Inc., US). Il numero di variabili latenti è stato selezionato esaminando il plot RMSEC/RMSECV/RMSEP in funzione del numero variabili latenti. Il numero è stato scelto guardando il punto in cui il valore RMSE aveva un decremento significativo.

## Risultati e Discussione

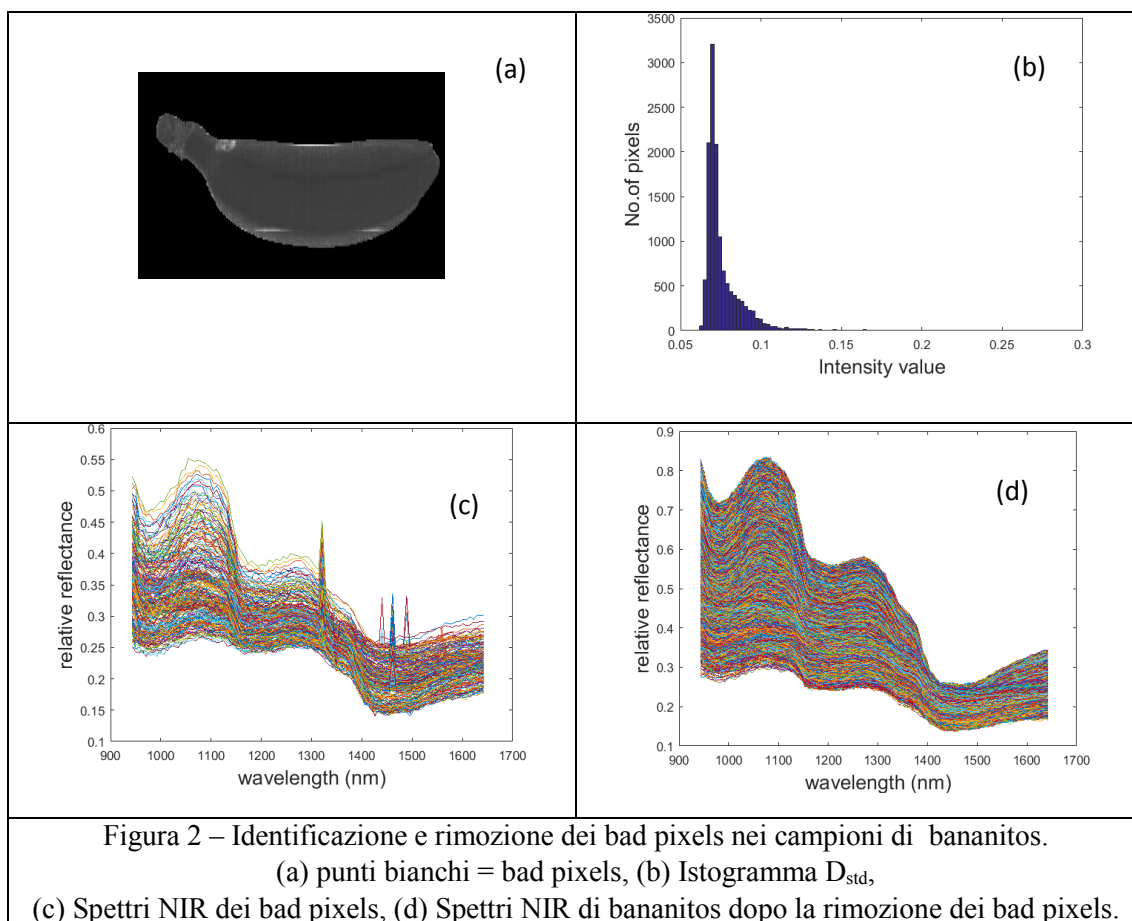
### Rimozione dei bad pixels dall'ipercubo

Dopo il pretrattamento con SNV, gli spettri NIR sono stati studiati per la rimozione dei “bad pixels”. Per sottrazione del canale di lunghezze d’onda successivo, i pixels con elevati valori di deviazione standard della differenza (Dstd) sono stati identificati come “bad pixels” rappresentati in fig. 2 (a) da punti bianchi. In fig. 2 (b) viene riportato l’istogramma di tutti i pixels di un campione: 0.12 Dstd è stato individuato come valore soglia; spettri NIR con pixels con Dstd superiore a 0.12 sono stati estratti e vengono riportati in fig. 2 (c).

Dopo rimozione di questi spettri, i restanti dati NIR hanno mostrato buoni profili spettrali (fig. 2 (d)).

### Modelli PLS

I parametri di colore e alcuni indici chimici e strutturali di qualità sono stati predetti mediante analisi di regressione PLS. Come mostrato in Tabella 1, confrontando le performance di predizione ( $R_p^2$ ) di tutti i modelli Vis-HSI e NIR-HSI, risulta evidente che l’analisi di immagine iperspettrale nel visibile ha fornito una migliore accuratezza di predizione rispetto a quanto ottenuto mediante NIR-HSI per tutti i parametri sottoposti ad indagine statistica di predizione. I modelli PLS sviluppati utilizzando i dati Vis-HSI hanno mostrato soddisfacenti valori predittivi per i parametri colorimetrici  $a^*$ , e  $hue$  e per l’indice di amido, con un valore di  $R_p^2$  pari a 0.81, 0.81, e 0.84 rispettivamente.



I frutti di bananito presentano un epicarpo molto più sottile delle normali banane e una piccola quantità di luce può attraversare la buccia. Gli spettri in riflettanza ottenuti sono stati, quindi, fortemente influenzati dalle informazioni contenute a livello della superficie del frutto. Per questa ragione nel corso dei normali cambiamenti di colore che avvengono durante la maturazione dei frutti si riscontra un'alta correlazione tra i parametri colorimetrici ed i dati spettrali.

Il contenuto di amido dei frutti diminuisce durante la maturazione poiché l'idrolisi di questo polisaccaride porta alla formazione di zuccheri semplici. il coefficiente di correlazione di Pearson fra l'indice di amido e i parametri del colore ( $a^*$  o *hue*) ha raggiunto un valore pari a  $r=0.77$ , che indica una buona capacità di predizione del modello per questo indice di maturazione. Non sono invece stati ancora raggiunti risultati soddisfacenti per quanto concerne i modelli PLS sviluppati per la predizione di altri parametri di qualità quali SSC, acidità e consistenza (compressione o Magness-Taylor), che hanno mostrato valori di  $R_p^2$  inferiori a 0.5. Una possibile giustificazione di questo scarso potere predittivo può essere attribuita al fatto che tali indici non sono così strettamente correlati ai cambiamenti visibili considerando i tre stadi di maturazione campionati ed analizzando i frutti "in toto". In aggiunta, per quanto appartenenti alla stessa "mano" (casco di frutti), i singoli frutti utilizzati per le analisi di riferimento non erano i medesimi utilizzati per l'analisi VIS e NIR, fatto che può aver influito negativamente sulla capacità predittiva dei modelli PLS per questo data set.

Tabella 1 - Modelli PLSR

	Attributi di qualità	Vis-HSI			NIR-HSI		
		No. LVs	$R_p^2$	RMSEP	No. LVs	$R_p^2$	RMSEP
Aspetto Colore	a*	3	0.81	2.84	6	0.40	4.70
	b*	3	0.68	3.52	5	0.25	3.86
	L*	3	0.57	2.95	3	0.28	3.46
	Chroma*	3	0.66	3.43	5	0.26	3.75
	hue	2	0.81	3.98	6	0.40	5.67
Chimici	Indice di amido	2	0.84	0.94	6	0.45	1.82
	SSC	1	0.41	2.19	7	0.32	1.78
	Acidità	1	0	0.51	1	0	0.68
Strutturali	Consistenza	1	0.04	0.71	1	0.02	0.65
	Forza di	1	0.37	0.01	2	0.06	0.01
	Compressione						

### Conclusioni

I modelli PLS generati da dati iperspettrali Vis e NIR non sono stati in grado di fornire risultati soddisfacenti per i parametri SSC, acidità e consistenza dei frutti. L'elaborazione delle immagini iperspettrali Vis hanno avuto successo nella previsione del parametro a\* (rosso-verde) del colore, della hue ( $R_p^2 = 0,81$ ) e dell'indice di amido ( $R_p^2 = 0,84$ ) dei frutti di bananito. Sono state programmate ulteriori set di prove al fine di ottimizzare anche la risposta NIR.

### Ringraziamenti

Gli autori ringraziano in particolare Mr. Sindhuraj Mukherjee per l'assistenza tecnica fornita durante l'acquisizione delle immagini iperspettrali presso l'University College di Dublino; il Sig. Alberto Albuzza, Almafrutta s.r.l per la disponibilità a fornire campioni di bananitos selezionati.

### Bibliografia

1. MOORE, L. L., SINGER, M. R., BRADLEE, M. L., DJOUSSE, L., PROCTOR, M. H., CUPPLES, L. A. & ELLISON, R. C. 2005. Intake of Fruits, Vegetables, and Dairy Products in Early Childhood and Subsequent Blood Pressure Change. *Epidemiology*, 16, 4-11.
2. ZUDE, M. 2003. Non-destructive prediction of banana fruit quality using VIS/NIR spectroscopy. *Fruits*, 58, 135-142.
3. SUBEDI, P. P. & WALSH, K. B. 2011. Assessment of sugar and starch in intact banana and mango fruit by SWNIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*, 62, 238-245.
4. RAJKUMAR, P., WANG, N., EIMASRY, G., RAGHAVAN, G. S. V. & GARIEPY, Y. 2012. Studies on banana fruit quality and maturity stages using hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 108, 194-200.
5. BLANKENSHIP, S. M., ELLSWORTH, D. D. & POWELL, R. G. 1993. A Ripening Index for Banana Fruit Based on Starch. *HortTechnology*, 3, 338-339.
6. MAGNESS, J. R., TAYLOR, G. F. 1925. Unimproved type of pressure tester for the determination of fruit maturity. *U.S. Dept. Agr. Circ.* 350, 8.
7. TAGHIZADEH, M., GOWEN, A. & O'DONNELL, C. P. 2009. Prediction of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) moisture content using hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3, 219-226.

# DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEL CONTENUTO DI FLUORO IN MISCELE DI POLILATTIDE (PLA) E TALCO UTILIZZANDO LA TECNICA NIR

Chiara Tagliati<sup>2</sup>, Tiziano Bonato<sup>2</sup>, Stefania Costa<sup>1</sup>, Paola Pedrini<sup>1</sup>, Elena Tamburini<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie – Università di Ferrara – Via L. Borsari, 46 44121 Ferrara

<sup>2</sup> Lab Control Srl, Chemical Analysis and Technological Services, Via Cà Donà, 545 | 45030 San Martino di Venezze, Rovigo, ITALY; ambiente@labcontrol.it

Stefania Costa

\*Corresponding email

## Riassunto

Il polilattide o acido polilattico (PLA) appartiene alla famiglia dei poliesteri alifatici, costituiti da unità di  $\alpha$ -idrossiacidi, e comunemente considerati biodegradabili e compostabili. Di norma, nella produzione di PLA vengono impiegati come agenti rinforzanti, o *filler*, materiali inorganici come il talco, poiché permettono di migliorare le caratteristiche meccaniche del prodotto finale e di abbassare i costi della formulazione. Il talco è un magnesio silicato idrato con formula generale  $Mg_3SiO_{10}(OH)_2$ , ma può contenere all'interno del reticolo cristallino, numerosi altri ioni in piccola quantità, tra i quali il fluoro (F). Il fluoro merita una particolare attenzione a causa della elevata tossicità, che può inficiare la complessiva compostabilità/biodegradabilità dei manufatti a base di PLA. Per questo motivo, la quantità massima di fluoro consentita nei materiali biopolimerici è severamente normata, e controlli analitici sui prodotti destinati all'uso alimentare obbligatori. L'obiettivo di questo studio è sviluppare un metodo basato sulla spettroscopia NIR per la determinazione quantitativa del fluoro in miscele di PLA-talco. Il profilo di miscelazione è stato ottenuto mescolando opportunamente granuli di PLA e polvere di talco. Gli spettri sono stati acquisiti nell'intervallo 10000-4000  $cm^{-1}$  utilizzando uno strumento NIRFlex® N-500 (Buchi, Svizzera), così come tutte le elaborazioni chemiometriche, inclusi i pretrattamenti, sono state eseguite con NIRCal® 5.4 (Buchi, Svizzera). Il modello di calibrazione è stato ottenuto correlando i dati analitici ottenuti dall'analisi tradizionale (digestione alcalina) e gli spettri NIR con una regressione PLS, in un intervallo di concentrazione da PLA puro (0 ppm di fluoro) a talco puro (800 ppm di fluoro). La predizione del contenuto di fluoro ( $R^2_{cal} = 0.9498$ ; SEC = 34.77; SECV = 46.94) è stata validata esternamente grazie all'acquisizione di 15 campioni incogniti indipendenti ( $R^2_{EX.V.} = 0.8955$ ; SEP = 61,08). Una correlazione significativa è stata riscontrata tra un componente inorganico come il fluoro e gli spettri NIR ed è stata utilizzata come base per ottenere informazioni quantitative dagli spettri.

## Introduzione

Oggigiorno i polimeri sono ancora quasi esclusivamente di derivazione petrolifera e quindi non rinnovabili. Anche se in molti casi si provvede al riciclo ed al riuso, la maggioranza, a livello mondiale, è ancora destinata all'abbandono nell'ambiente [1]. Negli ultimi anni, la possibilità di ottenere plastiche da fonti naturali, e quindi biodegradabili, sta diventando sempre di più una realtà, e alcuni prodotti sono già disponibili a livello commerciale [2], tra cui l'acido polilattico (o polilattide, PLA). Dal punto di vista chimico, il PLA è un poliестere che deriva dall'acido lattico, un alfa-idrossi acido che si può ottenere per fermentazione degli zuccheri da parte di batteri lattici. Così ottenuto, il PLA è riconosciuto come un materiale biodegradabile e compostabile, e già



piuttosto diffuso per la produzione di manufatti di uso corrente, nel settore del packaging e anche biomedicale [3]. Il PLA infatti possiede numerose eccellenti proprietà come bassa tossicità, buona trasparenza e alta resistenza, tuttavia, confrontato con altri materiali plastici convenzionali, ha ancora una resistenza meccanica inferiore ad altri materiali e una bassa velocità di polimerizzazione [4]. Per questa ragione, attualmente il processo di polimerizzazione per ottenere PLA prevede sempre l'aggiunta di additivi, *fillers* o *nanofillers* [5]. Uno di quelli più utilizzati è il talco, aggiunto in percentuali tra il 2 e il 5% come agente rinforzante ed enucleante, ed inoltre contribuisce ad abbassare il costo delle formulazioni [6-7]. Dal punto di vista chimico è un silicato idrato di magnesio di formula generale  $Mg_3SiO_{10}(OH)_2$ , dove sono presenti molti altri elementi in tracce, come il fluoro (F). Tali elementi, ed il fluoro in particolare, meritano una grande attenzione a causa della loro potenziale elevata tossicità, che può modificare le caratteristiche di biodegradabilità e compostabilità del prodotto finito. Per questa ragione, la quantità massima con cui questi additivi possono essere aggiunti è regolamentata da norme specifiche [8]. Ciò rende indispensabile la messa a punto di una serie di controlli analitici prima dell'arrivo sul mercato. Il metodo analitico ufficiale prevede la degradazione del campione attraverso la bomba calorimetrica e successiva analisi in cromatografia ionica [9]. In alternativa, è possibile procedere con una digestione alcalina ad alta temperatura [10]. Entrambe le tecniche, necessitano dell'uso di reagenti chimici, alte pressioni, procedure lunghe e laboriose, e spesso danno problemi di sottostima della quantità di fluoro contenuta nel campione. La spettroscopia NIR può rappresentare una valida e concreta alternativa all'analisi del fluoro. Nonostante la natura inorganica del fluoro, la tecnica NIR ha dimostrato di essere comunque applicabile, grazie alla presenza di gruppi OH all'interno del reticolo cristallino [11], in quantità diversa a seconda del tipo di elemento vicinale. In questo studio, è stato messo a punto un metodo per la determinazione quantitativa del contenuto di fluoro in miscele di PLA e talco in miscele destinate alla polimerizzazione.

## Materiali e Metodi

*Miscela di PLA e talco.* Una quantità nota di PLA puro in granuli è stata miscelata con quantità note di polvere di talco, a concentrazione nota di fluoro. Sono state create tredici diverse miscele, aumentando via via la quantità di talco (0→100%) e diminuendo la quantità di PLA (100%→0%), in modo tale da mantenere costante il peso finale del campione ( $3.53 \pm 0.05$  g) a temperatura ambiente. In questo modo, la concentrazione di fluoro nei campioni era variabile tra 0 e 800 ppm. Prima dell'acquisizione degli spettri, i campioni sono stati mescolati in modo da garantirne la completa omogeneizzazione.

*Analisi di riferimento.* In questo studio è stato utilizzato il metodo della digestione alcalina [12].

*Analisi NIR.* Gli spettri sono stati acquisiti con uno strumento NIRFlex N-500 (Büchi, Svizzera), utilizzando un sistema portacampioni XL di 2,5 cm di diametro. Lo spettro è stato acquisito nell'intervallo 1000-2500 nm, a intervalli di 8 nm. Per ottimizzare il rapporto segnale/rumore, lo spettro finale è il risultato della media di 16 scansioni.

*Elaborazioni chemiometriche.* Tutte le elaborazioni statistiche e chemiometriche sono state realizzate con NIRCal 5.0 (Büchi, Svizzera). La selezione delle lunghezze d'onda, la regressione PLS e tutti i parametri statistici sono stati ottenuti dalla procedura automatica Calibration Wizard® inclusa nel software. Prima della regressione gli spettri sono stati pretrattati con SNV e derivata seconda [13]. Sulla regressione PLS è stato eseguito un test di permutazione usando la libreria lmPerm nel software RPackage 3.3.1 x Windows [14]. L'analisi degli outliers è stata effettuata utilizzando il criterio della distanza di Mahalanobis [15]. La calibrazione è stata validata con *cross-validation* e con validazione esterna. Quest'ultima è stata realizzata acquisendo 15 campioni indipendenti. La accuratezza predittiva è stata valutata in termini di  $R^2$  e RMSEP.

## Risultati e Discussione

Gli spettri del talco puro contenente fluoro e del PLA puro utilizzati per la costruzione delle miscele campione sono mostrati in Figura 1.

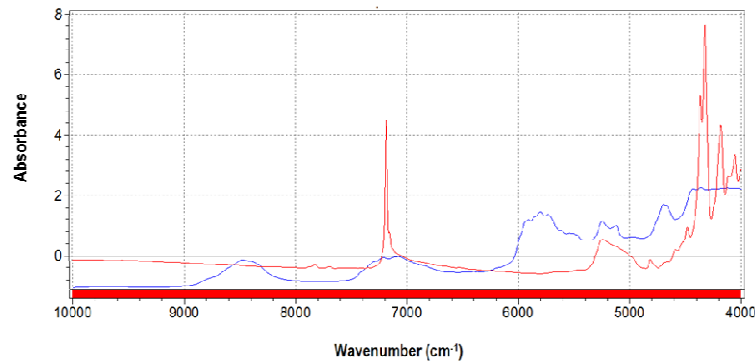


Figura 1. Spettri di talco puro (rosso) e PLA puro (blu)

Il talco puro mostra il tipico picco a  $7185\text{ cm}^{-1}$  dovuto alla presenza del fluoro [16], mentre lo spettro del PLA è caratterizzato dagli assorbimenti a  $8400\text{ cm}^{-1}$  e nell'intervallo  $6000\text{--}4700\text{ cm}^{-1}$  [17].

Per ciascuna miscela PLA-talco sono stati acquisiti tre spettri, per un totale di 39 spettri (Figura 2). Per confronto con gli spettri dei componenti puri, è possibile riconoscere una zona tra  $7200\text{--}6800\text{ cm}^{-1}$ , corrispondente alle caratteristiche spettrali del talco, e nella regione tra  $6000\text{--}4700\text{ cm}^{-1}$ , riconducibile principalmente agli assorbimenti del PLA.

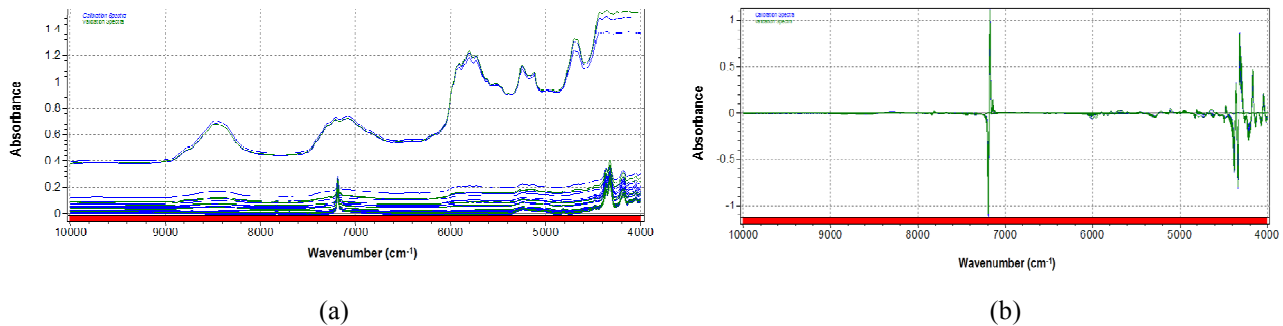


Figure 2. Spettri originali (a) e pretrattati (b) tramite SNV e derivata seconda di miscele di PLA-talco a differenti rapporti

Gli spettri sono dominati dal segnale del legame OH a  $7200\text{--}7100\text{ cm}^{-1}$ . In particolare, il picco a  $7185\text{ cm}^{-1}$  e gli altri segnali a  $7156$ ,  $7118$  e  $7073\text{ cm}^{-1}$  derivano dal talco e sono dovuti alle vibrazioni di stretching dell'OH di  $\text{Mg}_3\text{OH}$ ,  $\text{Mg}_2\text{FeOH}$ ,  $\text{MgFe}_2\text{OH}$ , and  $\text{Fe}_3\text{OH}$ . Nella struttura cristallina del talco i gruppi OH possono essere sostituiti dal fluoro, generando una distorsione del reticolo che sembra influenzare l'ampiezza delle bande [18]. Nella zona del PLA, le bande a  $5915$  e  $5785\text{ cm}^{-1}$  possono essere assegnate ai primi *overtone* della vibrazione di stretching del CH in gruppi  $\text{CH}_3$  [19]. La spalla a  $5680\text{ cm}^{-1}$  invece può essere attribuita alle bande di combinazione dello stretching del CH, mentre a  $5210\text{ cm}^{-1}$  è presente un segnale riconducibile al secondo *overtone* dello stretching del legame C=O. Le due bande sovrapposte a  $4750$  e  $4700\text{ cm}^{-1}$  sono associate ai gruppi OH terminali, come riportato da Shinzawa et al. [20].

Nella costruzione del modello di calibrazione non sono stati riconosciuti outliers. La retta di calibrazione ottenuta con una regressione PLS (4 fattori) è mostrata in Figura 3. La *blockwise cross validation* è stata effettuata in automatico dal software rimuovendo 2 campioni ogni 6 del set di dati.

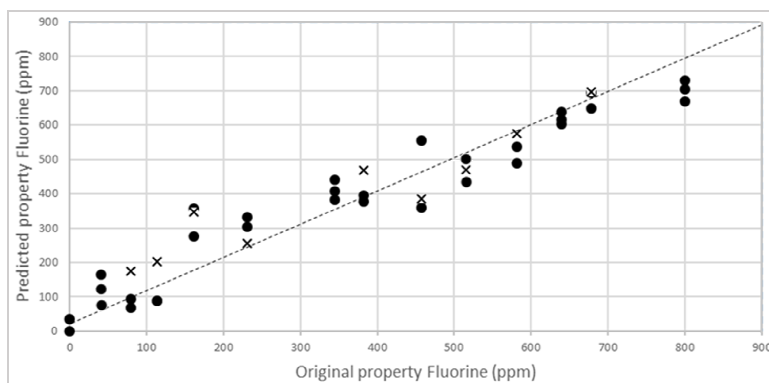


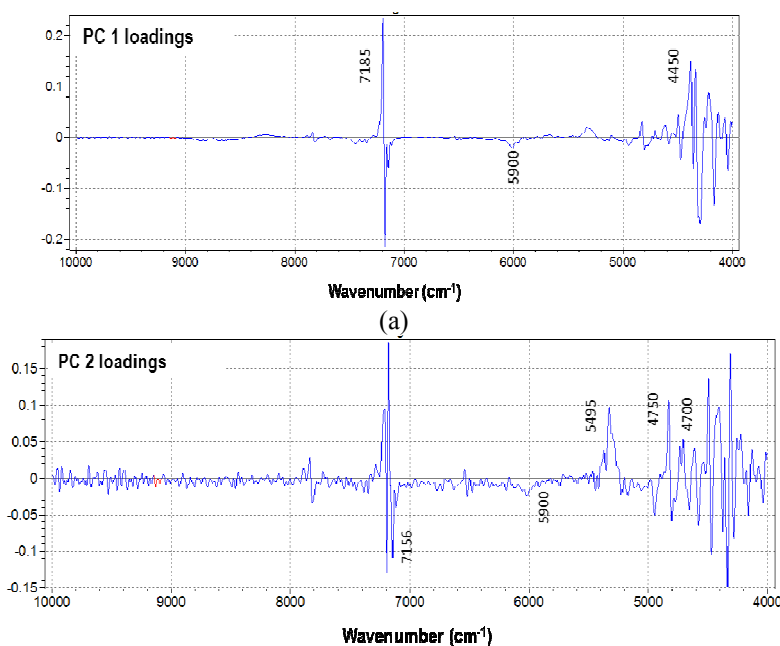
Figure 3. NIR calibration (●) and validation (×) curves for fluorine content in PLA–talc blends.

A causa dell'esiguo numero di campioni con cui il modello di calibrazione è stato costruito, il vettore  $y$  delle predizioni NIR è stato sottoposto ad un test di permutazioni random che ha mostrato la significatività dei dati ottenuti ( $p < 0.00001$ ). I risultati statistici sono riassunti in Tabella 1.

Tabella 1. Elaborazione statistica del modello di calibrazione per il fluoro.

	<b>Fluoro</b>
Unità	ppm
#campioni	39
Outliers	0
Min	0.00
Mean	346.92
Max	800.00
SD	260.17
WN range/step ( $\text{cm}^{-1}$ )	9000–4500/8
SEC	86.14
$R^2_{\text{cal}}$	0.9471
SECV	76.83
$R^2_{\text{CV}}$	0.9464

Il diagramma dei *loadings* per la PC1 e PC2 risultanti dalla regressione PLS può essere considerato un indicatore di quali lunghezze d'onda (numeri d'onda) siano responsabili della maggior informazione analitica utilizzata per la costruzione del modello (Figura 4).



(b)

Figura 4. Selezione di numeri d'onda (lunghezze d'onda) dai loadings delle prime due PC del modello di regressione PLS.

Per ottenere un modello di calibrazione affidabile è stato necessario provvedere ad uno step di validazione esterna con campioni incogniti. Sono stati analizzati 15 campioni di miscela PLA-talco, creati secondo la procedura già descritta. La Figura 5 mostra i risultati ottenuti.

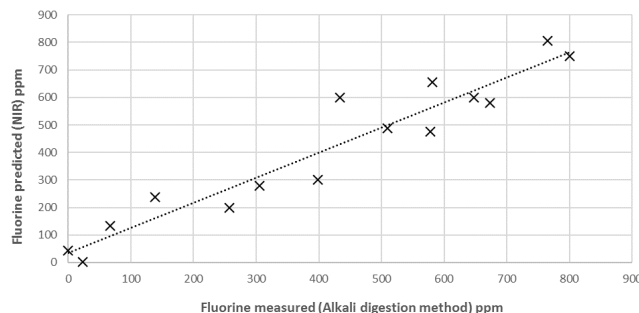


Figura 5. Validazione esterna del modello di calibrazione messo a punto per la determinazione del contenuto di fluoro in miscela PLA-talco.

L'elaborazione statistica della retta di validazione ( $R^2_{EX.V} = 0.8955$  and  $RMSEP = 61.08$ ) ha confermato i risultati soddisfacenti.

### Conclusioni

Gli spettri NIR di miscele di PLA e talco hanno chiaramente evidenziato la presenza di entrambi i componenti. In particolare, la presenza di fluoro genera variazioni nello spettro che possono essere utilizzate per la quantificazione dell'elemento. In questo modo, la tecnica NIR dimostra di essere una tecnica promettente per il controllo qualità dei polimeri a base di PLA e per la determinazione dei livelli di fluoro contenuti nel talco utilizzato come additivo di polimerizzazione. L'uso del NIR, quindi di una tecnica non distruttiva, apre la strada alla possibilità di utilizzo di un sistema di monitoraggio in tempo reale della composizione dei manufatti finiti e non solo delle miscele di polimerizzazione.

### Bibliografia

1. Lim, L.T.; Auras, R.; Rubino, M. Processing technologies for poly (lactic acid). *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33*, 820–852.
2. Conn, R.E.; Kolstad, J.J.; Borzelleca, J.F.; Dixler, D.S.; Filer, L.J., Jr.; LaDu, B.N. Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer. *Food Chem. Toxicol.* **2011**, *33*, 273–283.
3. Lasprilla, A.J.; Martinez, G.A.; Lunelli, B.H.; Jardini, A.L.; Maciel Filho, R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 321–328.
4. Chieng, B.W.; Ibrahim, N.A.; Yunus, W.M.Z.W.; Hussein, M.Z. Poly(lactic acid)/Poly(ethylene glycol) Polymer Nanocomposites: Effects of Graphene Nanoplatelets. *Polymers* **2014**, *6*, 93–104.
5. Aldana, D.S.; Villa, E.D.; de Dios Hernández, M.; Sánchez, G.G.; Cruz, Q.R.; Gallardo, S.F.; Castillo, H.P.; Casarrubias, L.B. Barrier Properties of Polylactic Acid in Cellulose Based Packages Using Montmorillonite as Filler. *Polymers* **2014**, *6*, 2386–2403, doi:10.3390/polym6092386.
6. Ke, T.; Sun, X. Melting behavior and crystallization kinetics of starch and poly (lactic acid) composites. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *89*, 1203–1210.
7. EN 13432:2000. *Packaging: Requirements for Packaging Recoverable through Composting and Biodegradation*; EU Commission: Brussels, Belgium, 2000.

8. Leonidov, V.Y.; O'Hare, P.A.G. Fluorine combustion calorimetry: Progress in recent years and possibilities of further development. *Pure Appl. Chem.* **1992**, *64*, 103–110.
9. Malde, M.K.; Bjorvatn, K.; Julshamn, K. Determination of fluoride in food by the use of alkali fusion and fluoride ion-selective electrode. *Food chemistry 2001*, *3*, 373–379.
10. Petit, S.; Martin, F.; Wiewiora, A.; de Parseval, P.; Decarreau, A. Crystal-chemistry of talc: A near infrared (NIR) spectroscopy study. *Am. Mineral.* **2004**, *89*, 319–326.
11. Wang, Q.; Makishima, A.; Nakamura, E. Determination of fluorine and chlorine by pyrohydrolysis and ion chromatography: comparison with alkaline fusion digestion and ion chromatography. *Geostand. Geoanal. Res.* **2010**, *34*, 175–183.
12. Wang, Q.; Makishima, A.; Nakamura, E. Determination of fluorine and chlorine by pyrohydrolysis and ion chromatography: comparison with alkaline fusion digestion and ion chromatography. *Geostand. Geoanal. Res.* **2010**, *34*, 175–183.
13. Barnes, R.; Dhanoa, M.; Lister, J. Standard normal variable transformation and detrending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 772–777.
14. R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online: <http://www.R-project.org> (accessed on 1 August 2016).
15. Rocke, D.M.; Woodruff, D.L. Identification of Outliers in Multivariate Data. *J. Am. Stat. Assoc.* **1996**, *91*, 1047–1061.
16. Durbin, J.; Watson, G.S. Testing for serial correlation in least squares regression. *Biometrika* **1950**, *37*, 409–428.
17. Popo, M.; Romero-Torres, S.; Conde, C.; Romañach, R.J. Blend Uniformity Analysis Using Stream Sampling and Near Infra-Red Spectroscopy. *AAPS PharmSciTech* **2002**, *3*, 1–11.
18. Bishop, J.; Madejova, J.; Komadel, P.; Froèschl, H. The influence of structural Fe, Al and Mg on the infrared OH bands in spectra of dioctahedral smectites. *Clay Miner.* **2002**, *37*, 607–616.
19. Xiao, H.W.; Li, P.; Ren, X.; Jiang, T.; Yeh, J.T. Isothermal crystallization kinetics and crystal structure of poly (lactic acid): Effect of triphenyl phosphate and talc. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *118*, 3558–3569.
20. Shinzawa, H.; Nishida, M.; Tanaka, T.; Kanematsu, W. Crystalline structure and mechanical property of poly (lactic acid) nanocomposite probed by near-infrared (NIR) hyperspectral imaging. *Vib. Spectrosc.* **2012**, *60*, 50–53.

# VALUTAZIONE RAPIDA DELLO STATO IDRICO DI FOGLIE DI VITE MEDIANTE SPETTROSCOPIA NEL VISIBILE E VICINO INFRAROSSO: IL CASO STUDIO DELL'ISOLA DI ISCHIA

Roberto Beghi\*, Valentina Giovenzana, Riccardo Guidetti

Dipartimento di Scienze Agrarie e Ambientali – Produzione, Territorio, Agroenergia (DiSAA),  
Università degli Studi di Milano, via Celoria 2, 20133 Milano, Italy.

\*Corresponding email: roberto.beghi@unimi.it

## Riassunto

Ottimizzare il consumo di acqua e migliorarne l'efficienza sono considerati obiettivi centrali per la sostenibilità ambientale. Considerando il consumo di acqua richiesto per la produzione di vino, anche il settore viticolo gioca un ruolo decisivo in questa sfida. La carenza di acqua e l'incremento dei costi di irrigazione portano allo sviluppo di nuovi metodi per migliorare il monitoraggio e la gestione dell'irrigazione per un uso più efficiente della risorsa idrica.

L'obiettivo della ricerca è quello di stimare in modo rapido e non distruttivo lo stato idrico delle foglie di vite utilizzando la spettroscopia sia vis/NIR che NIR. Ciò con la prospettiva di valutare la futura realizzazione di un dispositivo ottico portatile a basso costo, semplificato, con dimensioni compatte, che si basi sull'impiego di un numero ridotto di lunghezze d'onda opportunamente selezionate.

Come parametro di riferimento è stato utilizzato il potenziale idrico ( $\Psi$ ) misurato con la camera a pressione di Scholander; è una metodica laboriosa, attualmente impiegata per il controllo dello stato idrico del vigneto. Le misure sono state eseguite durante la notte, prima dell'alba (*pre-dawn leaf water potential*,  $\Psi_{plwp}$ ), tra le ore 3.00 e le 5.00 del mattino, immediatamente dopo l'acquisizione spettrale.

Per la selezione delle variabili è stata utilizzata la tecnica PLS-RCA (*partial least square regression coefficient analysis*) e applicata l'analisi MLR (*multiple linear regression*) per l'elaborazione di modelli a poche variabili. La capacità predittiva dei modelli MLR è stata confrontata con quella relativa ai modelli PLS (basati sull'intero intervallo spettrale), ottenendo risultati soddisfacenti.

Pertanto, i modelli costruiti con le lunghezze d'onda selezionate permettono di ottenere algoritmi semplici facilmente impiegabili per la progettazione di un dispositivo portatile, basato su tecnologia LED che consentirebbe una valutazione in tempo reale dello stato idrico della pianta, direttamente in campo, per una migliore gestione della programmazione dell'irrigazione.

## Introduzione

Per produrre un vino di qualità entrano in gioco diversi fattori, alcuni più controllabili (fasi di cantina) e altri meno che riguardano per lo più le fasi di campo tra cui parametri come lo stress idrico della pianta.

Per affrontare il tema dello stress idrico è opportuno ricordare alcuni concetti legati al potenziale idrico della pianta e come la mancanza di acqua potrebbe creare effetti negativi sulla vita della pianta stessa.

La vite è abituata a sopportare gli stress idrici, ma se troppo drastici possono creare danni alla pianta e quindi al frutto. Per esempio il forte stress idrico induce la pianta a chiudere gli stomi in modo da conservare le riserve idriche causando al tempo stesso la diminuzione o l'annullamento di assimilazione, con effetti negativi sulla crescita della pianta e sulla maturazione del frutto. Di contro però, un eccesso d'acqua determina una maggiore crescita vegetativa e di produttività, mentre parametri qualitativi come il contenuto di zucchero, l'acidità, la formazione di pigmenti, e quindi la

maturazione del frutto, peggiorano comportando così conseguenze negative anche sul vino prodotto da quelle uve. Pertanto l'acqua è un fattore importante che incide sulla produzione qualitativa della vite in funzione sia dello stato fenologico della pianta che della durata e dall'intensità dello stress idrico [1]. È per questi motivi che è importante il monitoraggio dello stress idrico direttamente in campo e in modo sistematico.

Un altro aspetto importante è legato alla contabilizzazione delle risorse idriche, che si sta affermando come un parametro di fondamentale interesse per la sostenibilità ambientale, insieme alla più consolidata attenzione per i consumi energetici delle produzioni agro-alimentari e quindi anche vitivinicole [2]. Pertanto la messa a punto di sistemi ottici di monitoraggio dello stress idrico potrebbero essere un valido supporto al settore vitivinicolo per un maggior controllo dello stato della pianta e quindi delle sue produzioni in quanto permetterebbe di utilizzare solo quantitativi minimi di acqua potendo controllare la reale necessità della pianta favorendo così anche il miglioramento dell'efficienza d'uso dell'acqua.

L'obiettivo della ricerca è quello di stimare in modo rapido e non distruttivo lo stato idrico delle foglie di vite utilizzando la spettroscopia sia vis/NIR (400-1000 nm) che NIR (1100-2000 nm). Ciò con la prospettiva di valutare la futura realizzazione di un dispositivo ottico portatile a basso costo, semplificato, con dimensioni compatte, che si basi sull'impiego di un numero ridotto di lunghezze d'onda (basato sulla tecnologia LED, *Light Emitting Diode*) opportunamente selezionate.

### Materiali e metodi

Le misurazioni ottiche sono state effettuate nel mese di settembre (2014) e luglio (2015) su 420 foglie di cv. Biancolella presso l'isola di Ischia, in condizioni naturali di campo senza irrigazione artificiale. Per ogni campione sono state effettuate 3 acquisizioni sulla parte assiale della foglia, poi mediate. Ogni acquisizione avviene in pochi millisecondi ed è la media di 5 spettri.

Sono stati sperimentati due strumenti operanti nella regione del visibile (vis) e del vicino infrarosso (NIR) per quantificare lo stato idrico delle piante analizzate. Gli spettri sono stati acquisiti direttamente in campo a una temperatura tra i 20 °C (settembre) e 26 °C (luglio).

Durante la misura ottica le foglie vengono investite dalla radiazione luminosa prodotta da un sistema di illuminazione e la componente riflessa dalla foglia viene acquisita da uno spettrofotometro e registrata tramite il software di gestione dello strumento. Ogni sistema ottico è composto da differenti elementi: (1) lampada alogena per l'illuminazione dei campioni; (2) cavo a fibre ottiche; (3) spettrofotometro portatile vis/NIR (Jaz, OceanOptics, USA; intervallo spettrale 400-1000 nm) o spettrofotometro NIR (TG-cooled NIR II, Hamamatsu Photonics, Japan; intervallo spettrale 1000-2000 nm); (4) modulo di gestione della misura con software per l'acquisizione, la gestione e la visualizzazione dei dati; (5) batteria. La sonda di misura è costituita da un cavo bidirezionale a fibre ottiche (OceanOptics, USA) dotato di sei fibre che illuminano il campione mentre una fibra centrale porta la radiazione di ritorno dalla foglia di vite, dopo l'interazione con le foglie, allo spettrofotometro. Durante le acquisizioni in campo una superficie nera otticamente assorbente è stata posta sulla foglia in corrispondenza del lato opposto alla misura in modo tale da ridurre al minimo l'effetto di disturbo casuale della luce proveniente dalla parte opposta della foglia. Inoltre la sonda è stata dotata di un cappuccio in plastica in modo da standardizzare le condizioni ambientali di acquisizione.

Il cuore dello strumento è costituito da uno spettrofotometro miniaturizzato, grazie al quale il segnale registrato dal sensore CCD viene digitalizzato e acquisito. Quest'ultimo permette di visualizzare in forma grafica lo spettro vis/NIR (risoluzione spettrale 0.3 nm) o NIR (risoluzione spettrale 8.0 nm) del campione. I dati rilevati vengono memorizzati su SD card per lo strumento portatile e su PC per lo strumento NIR.

Come riferimento è stato utilizzato il potenziale idrico ( $\Psi$ , MPa), misurato mediante camera a pressione di Scholander (Figura 1) [3]. Si tratta di una metodica laboriosa, attualmente impiegata per il controllo dello stato idrico del vigneto. Le misure del potenziale idrico sono state effettuate durante la notte in condizioni di *pre-dawn* (*pre-dawn leaf water potential*,  $\Psi_{plwp}$ ) (dalle 3.00 alle 5.00, ora solare) e di *leaf water potential* ( $\Psi_{lwp}$ ) immediatamente dopo l'alba (dalle 7.30 alle 9.30,

ora solare) su foglie scelte nella parte medio-alta della chioma della vite [4, 5]. Le misure effettuate durante la notte sono fondamentali in quanto prima del sorgere del sole il potenziale idrico della foglia è in equilibrio con quello xilematico.

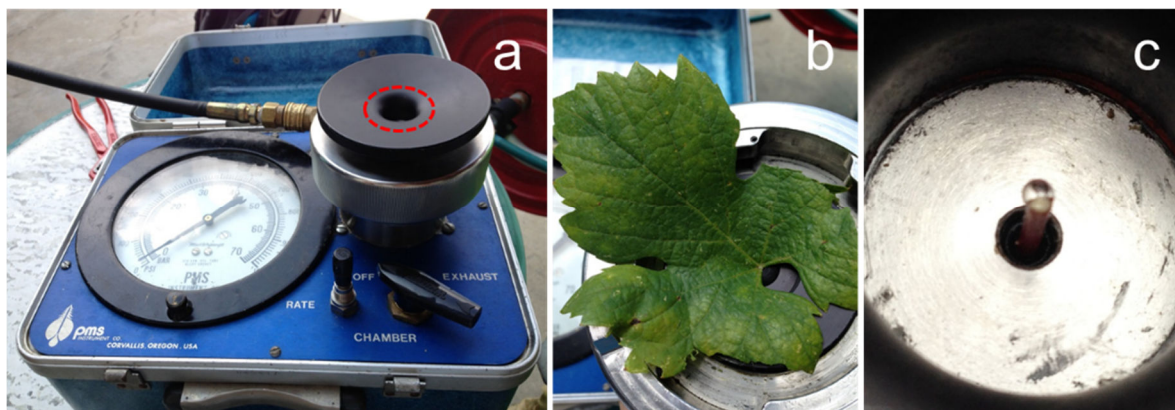


Figura 1. Particolari della (a) camera a pressione di Scholander durante (b) la fase di inserimento della foglia e (c) al momento della fuoriuscita dell'acqua che decreta la fine dell'analisi.

La camera a pressione di Scholander è costituita da un alloggio (camera) (Figura 1a) munito di un apposito misuratore di pressione e collegato durante le misure a una bombola contenente del gas liquido inerte ad alta pressione (in genere azoto).

Procedura di misura:

- taglio del peduncolo fogliare, in modo da prelevare la foglia dalla pianta e posizionarla all'interno della camera a pressione, lasciando fuoriuscire solo l'estremità recisa (Figura 1b);
- immissione del gas all'interno della camera a pressione, fino al momento in cui fuoriesce la prima goccia d'acqua dall'area del taglio (Figura 1c);
- lettura della pressione corrispondente.

Il valore della pressione della foglia sarà più elevato in corrispondenza di un notevole stress idrico della pianta e viceversa.

La complessità di un sistema biologico, come per esempio una foglia, dal punto di vista della sua composizione chimica, si ripercuote necessariamente sulla complessità intrinsecamente contenuta nei dati relativi al sistema stesso [6].

L'analisi chemiometrica degli spettri vis/NIR e NIR è stata effettuata mediante software The Unscrambler 9.8 (CAMO ASA, Oslo, Norvegia). Le acquisizioni spettrali sono state pretrattate utilizzando il metodo Savitzky-Golay (passo 15 punti con una finestra di 4.5 nm e 120 nm rispettivamente per gli spettri vis/NIR e NIR). Gli spettri sono stati elaborati al fine di costruire modelli di regressione (*partial least square regression*, PLS) in grado di stimare il  $\Psi$  delle foglie. L'accuratezza del modello è stata misurata calcolando il coefficiente di determinazione in calibrazione ( $R^2_{cal}$ ) e validazione ( $R^2_{val}$ ), l'errore quadratico medio in calibrazione ( $RMSE_{cal}$ ), e validazione ( $RMSE_{val}$ ), e il parametro *ratio performance deviation* (RPD). Per quanto riguarda la validazione dei dati è stata effettuata sia una validazione interna, *leave-more-out cross-validation*, con 10 elementi per ogni *cancellation group* [7], sia una validazione esterna (*test set*) utilizzando un *dataset* indipendente di 150 campioni selezionati in modo random (290 campioni per la calibrazione). Per la selezione delle variabili è stata utilizzata la tecnica PLS-RCA (*partial least square regression coefficient analysis*) [8, 9] e applicata l'analisi MLR (*multiple linear regression*) per l'elaborazione di modelli a poche variabili. La capacità predittiva dei modelli MLR è stata confrontata con quella relativa ai modelli PLS (basati sull'intero spettro).

## Risultati e Discussione

In Figura 2 sono mostrati gli spettri medi di foglie acquisiti nella regione del visibile/ vicino infrarosso (figura 1a) e nella regione del vicino infrarosso (figura 1b).



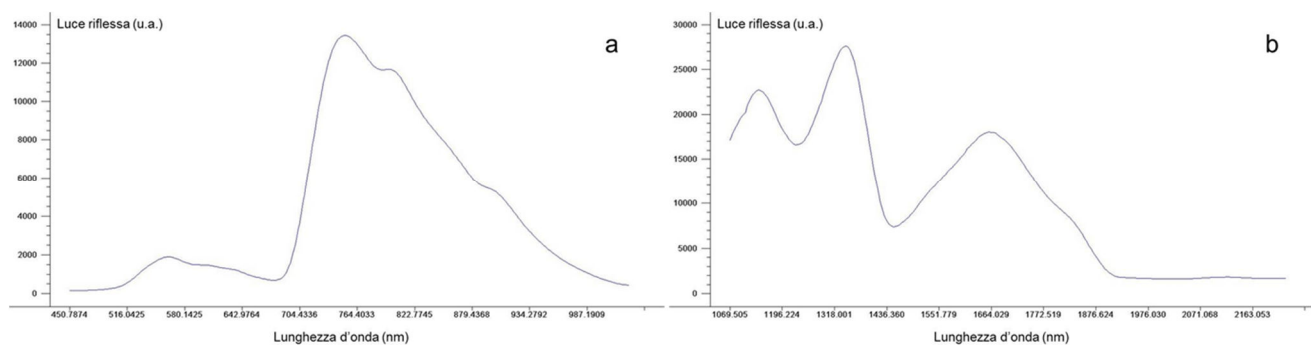


Figura 2. Esempi di spettro derivante dallo spettrofotometro a) vis/NIR (400-1000 nm) e b) NIR (1000-2000 nm). L'intensità della luce riflessa è misurata in unità arbitraria (u.a.) che dipende dallo strumento utilizzato.

Gli spettri sono stati correlati alla misura di riferimento, ovvero il potenziale idrico (MPa) per ottenere i modelli statistici di previsione. Questi modelli infatti potranno essere utilizzati per stimare il parametro di interesse e quindi stabilire lo stato idrico della vite in modo rapido e direttamente in campo. Piante con un moderato stress idrico evidenziano valori di  $\Psi \geq -0.8$  MPa, con uno stress medio si hanno valori  $-0.8$  MPa  $> \Psi \geq -1.5$  MPa mentre con elevato stress idrico le piante presentano potenziali inferiori a  $-1.5$  MPa.

In Tabella 1 sono riportati i risultati relativi ai modelli PLS elaborati per la stima dello stress idrico, ottenuti mediante spettroscopia vis/NIR e NIR.

In generale sono stati ottenuti modelli buoni con valori di RPD compresi tra 1,7 e 2,3. Per quanto riguarda i risultati derivanti dall'analisi degli spettri vis/NIR, i modelli mostrano in *cross-validation*  $R^2 = 0,77$  e  $RMSECV = 0,25$  MPa. Come prevedibile, utilizzando la validazione con *test set* si sono ottenuti modelli leggermente meno buoni, con  $R^2 = 0,67$  e  $RMSECV = 0,31$  MPa.

Tabella 1. Risultati dei modelli predittivi PLS relativi alla stima dello stress idrico, ottenuti mediante spettroscopia vis/NIR e NIR.

Regione spettrale	Calibrazione					Validazione			RPD
	Validazione	N° campioni	LV	$R^2_{cal}$	$RMSE_{cal}$ (MPa)	N° campioni	$R^2_{val}$	$RMSE_{val}$ (MPa)	
Vis/NIR	Cross-validation	408	10	0,79	0,24	408	0,77	0,25	2,1
	Test set	288	11	0,79	0,26	150	0,67	0,31	1,7
NIR	Cross-validation	417	17	0,88	0,19	417	0,85	0,20	2,7
	Test set	279	17	0,89	0,19	150	0,77	0,26	2,3

Risultati migliori sono stati ottenuti per la spettroscopia NIR. Le performance predittive del modello mostrano in *cross-validation*  $R^2 = 0,85$  e  $RMSECV = 0,20$  MPa, mentre con validazione *test set*  $R^2 = 0,77$  e  $RMSECV = 0,26$  MPa. I risultati ottenuti da questa sperimentazione preliminare sono nel complesso incoraggianti ma sicuramente migliorabili, incrementando per esempio il numero di campioni analizzati per confermare questi risultati e accrescere la robustezza dei modelli di previsione.

Dalla selezione delle variabili sono state identificate 5 lunghezze d'onda per gli spettri vis/NIR e 14 per gli spettri NIR. I modelli MLR elaborati con queste variabili hanno fornito  $RPD = 1.8$  per entrambi i range studiati e sono risultati leggermente meno performanti (Tabella 2) se confrontati con i modelli PLS rispettivamente costituiti da 2048 variabili per il range vis/NIR e 125 variabili per il NIR.

Tabella 2. Risultati dei modelli predittivi MLR relativi alla stima dello stress idrico, ottenuti mediante spettroscopia vis/NIR (5 lunghezze d'onda) e NIR (14 lunghezze d'onda).

Regione spettrale	Calibrazione			Validazione			
	N° campioni	R <sup>2</sup> <sub>cal</sub>	RMSE <sub>cal</sub>	N° campioni	R <sup>2</sup> <sub>val</sub>	RMSE <sub>val</sub>	RPD
Vis-NIR	407	0.70	0.30	407	0.69	0.30	1.8
NIR	407	0.71	0.27	407	0.69	0.28	1.8

I modelli costruiti con le lunghezze d'onda selezionate permettono in compenso di ottenere algoritmi semplici facilmente impiegabili per la progettazione di un dispositivo portatile, basato su tecnologia LED che consentirebbe una valutazione in tempo reale dello stato idrico della pianta, direttamente in campo, per una migliore gestione della programmazione dell'irrigazione.

### Conclusioni

Concludendo, in questa sperimentazione è stata studiata l'applicabilità della spettroscopia vis/NIR e NIR come tecnica rapida per il monitoraggio dello stato idrico della vite direttamente in campo. In particolare sono stati sperimentati due dispositivi ottici per la stima dello stress idrico, in modo rapido e non distruttivo. La selezione delle variabili e i modelli soddisfacenti ottenuti potrebbero, in futuro, essere un punto di partenza per la realizzazione di strumenti ottici ancora più semplici ed economici per il monitoraggio rapido e non distruttivo dello stato idrico della vite, direttamente in campo. Inoltre, grazie al costo contenuto del potenziale *device*, potrebbero essere utilizzati anche da piccoli produttori, supportandoli nel prendere decisioni rapide per una programmazione efficiente dell'eventuale irrigazione.

### Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto VARIVI (Valorizzazione della Risorsa Idrica per la Viticoltura dell'isola di Ischia), finanziato dalla Regione Campania.

### Bibliografia

1. A., Deloire, D. Heyns (2011). *The leaf water potentials: Principles, method and thresholds*. Wineland, 265, 119-121.
2. I. Herath, S. Green, R. Singh, D. Horne, S. van der Zijpp, B. Clothier (2013). *Water footprinting of agricultural products: a hydrological assessment for the water footprint of New Zealand's wines*. Journal of Cleaner Production, 41, 232-243.
3. P. F. Scholander, E. D. Bradstreet, E. A. Hemmingsen, H.T Hammel (1965). Sap pressure in vascular plants, negative hydrostatic pressure can be measured in plants. Science, 148, 339–346.
4. J. Cole, V. Pagay, (2015). *Usefulness of early morning stem water potential as a sensitive indicator of water status of deficit-irrigated grapevines (Vitis vinifera L.)*. Scientia Horticulturae, 191, 10-14.
5. M. Meron, D. W. Grimes, C. J. Phene, K. R. Davis, (1987). *Pressure chamber procedures for leaf water potential measurements of cotton*. Irrigation Science, 8, 215–222.
6. A. Ferrante, T. Maggiore (2007). *Chlorophyll a fluorescence measurements to evaluate storage time and temperature of Valeriana leafy vegetables*. Postharvest Biology and Technology, 45 (1), 73–80.

7. M. Casale, C. Casolino, G. Ferrari, M. Forina (2008). *Near infrared spectroscopy and class modelling techniques for the geographical authentication of Ligurian extra virgin olive oil*. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 16(1), 39.
8. I. G. Chong, C. H. Jun, (2005). *Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 78, 103-112.
9. Z. Xiaobo, Z. Jiewen, M. J. W. Povey, M. Holmes, M. Hanpin, (2010). *Variables selection methods in near-infrared spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 667, 14-32.

## PREDIZIONE DELLA COMPOSIZIONE CHIMICA DI FORMAGGIO GRANA PADANO DOP CON NUOVI STRUMENTI NIR PORTATILI

Laura Marinoni <sup>1\*</sup>, Angelo Stroppa <sup>2</sup>, Stefania Barzagli <sup>1</sup>, Katia Cremonesi <sup>1</sup>, Nicolò Pricca <sup>1</sup>, Aurora Meucci <sup>1</sup>, Giovanni Cabassi <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CREA-FLC Centro di ricerca per le produzioni foraggere e lattiero casearie, Lodi (LO)

<sup>2</sup> Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano, Desenzano del Garda (BS)

\*laura.marinoni@crea.gov.it

### Riassunto

Nell'ambito della convenzione GRANIR con il Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano si sta sviluppando un sistema rapido ed economico per la caratterizzazione compositiva delle forme di Grana Padano DOP basato su tecnologia NIR. A tal fine, il Consorzio si è dotato di 12 spettrometri portatili XNIR™ (Dinamica Generale), un master e 11 slave, per i quali è prevista la standardizzazione e il controllo periodico di slope, bias e performance. Tali strumenti saranno affidati al personale del Consorzio per le operazioni di screening dei lotti produttivi nella fase di marchiatura, a livello di magazzino. Per sviluppare i modelli predittivi e valutare le performance degli strumenti portatili, circa 170 campioni di Grana Padano DOP sono stati scansionati sia con lo spettrometro portatile XNIR™ usato direttamente sulla forma intera e aperta, scansionando sia crosta che pasta, sia con uno strumento da banco FT-NIR NIRFlex N-500 (Buchi) scansionando la pasta grattugiata. Per entrambi gli strumenti, sono stati costruiti modelli predittivi per sostanza secca, grasso, grasso/sostanza secca, proteine e proteine/sostanza secca utilizzando gli spettri della pasta e le analisi compositive della pasta. I risultati riassunti nella tabella indicano buone performance dello strumento portatile, con errori paragonabili a quelli dello strumento da banco. Sono ancora in corso di affinamento le calibrazioni per XNIR™ costruite utilizzando gli spettri della crosta e le analisi compositive della pasta.

	Range	FT-NIR		XNIR™	
		R <sup>2</sup>	RMSECV	R <sup>2</sup>	RMSECV
<b>Sostanza secca (ss), %</b>	64.18 – 70.16	0.77	0.541	0.56	0.692
<b>Grasso, %</b>	23.98 - 32.90	0.91	0.487	0.90	0.474
<b>Proteine, %</b>	29.29 – 36.24	0.92	0.283	0.81	0.398
<b>Grasso/ss, %</b>	35.85 - 48.71	0.87	0.743	0.90	0.593
<b>Proteine/ss, %</b>	43.36 – 54.20	0.93	0.451	0.89	0.530

### Introduzione

La spettroscopia nel vicino infrarosso è ormai una tecnica consolidata e ampiamente impiegata nel controllo qualità dell'industria alimentare, grazie alla possibilità di effettuare analisi rapide e non distruttive. Tuttavia, quando si utilizzano spettrometri da banco sorge l'inconveniente nelle analisi off line. Spesso invece si rendono necessarie misurazioni in loco, ad esempio sulla linea produttiva o in magazzini di conservazione. Un ulteriore vantaggio della spettroscopia NIR risiede nella possibilità di impiegare strumentazione portatile robusta.

Nell’ambito della convenzione GRANIR con il Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano si sta sviluppando un sistema rapido ed economico per la caratterizzazione compositiva delle forme di Grana Padano DOP basato su tecnologia NIR. A tal fine, il Consorzio si è dotato di 12 spettrometri portatili XNIR™ (Dinamica Generale), un master e 11 slave, per i quali è prevista la standardizzazione e il controllo periodico di slope, bias e performance. Tali strumenti saranno affidati al personale del Consorzio per le operazioni di screening dei lotti produttivi nella fase di marchiatura, a livello di magazzino.

### Materiali e metodi

Circa 170 campioni di Grana Padano DOP campionati dal Consorzio e provenienti da diversi produttori nelle provincie di Mantova, Lecco, Piacenza, Pavia, Vicenza Verona e Bergamo, sono stati scansionati con lo spettrometro portatile XNIR™ (dinamica generale, Mantova. Figura 1, sinistra) a diode array, usato direttamente sulla forma intera e aperta. La fetta di formaggio è stata poi privata della crosta e grattugiata con una grattugia professionale. Il grattugiato è stato scansionato con uno strumento da banco FT-NIR NIRFlex N-500 (Buchi Italia, Cornaredo. Figura 1, destra) e successivamente suddiviso in aliquote rappresentative e inviato a tre laboratori scelti dal Consorzio per le analisi di riferimento per la determinazione di sostanza secca, grasso e proteine.

Le scansioni con lo strumento portatile sono state condotte in riflettanza, scansionando sia crosta che pasta in 10 punti scelti random, nel range spettrale 950-1800 nm.

Gli spettri FT-NIR sono stati acquisiti in riflettanza (32 scansioni, risoluzione di 4 cm<sup>-1</sup>, 2 repliche per campione) nel range 1000-2500 nm, utilizzando cuvette cilindriche di 15 cm di diametro con fondo di quarzo.

Utilizzando gli spettri della pasta e della crosta (solo per XNIR) e le analisi compositive della pasta, sono stati sviluppati modelli predittivi per sostanza secca (SS), grasso (G), grasso/sostanza secca (G/SS), proteine e proteine/sostanza secca (P/SS). I modelli sono stati sviluppati utilizzando MATLAB 7.0 (The MathWorks, Inc., USA) e PLS\_ToolBox 8.0 (Eigenvector, USA).



Figura 1. Strumentazione NIR utilizzata: a sinistra NIR portatile XNIR; a destra FT-NIR da banco.

### Risultati e discussione

Al fine di ridurre l’incertezza di misura, le analisi chimiche di riferimento sono state affidate a tre laboratori. Inoltre, ad ogni invio di campioni, sono stati inclusi campioni ‘ciechi’ incogniti al fine di valutare la ripetibilità di ogni laboratorio. La Tabella 1 riassume i dati compositivi dei campioni ottenuti dai 3 laboratori (minimo, massimo, media, deviazione standard -  $s_{pop}$ ) e la ripetibilità intralaboratorio ( $s_{lab}$ ). Tutti i campioni hanno presentato un contenuto di grasso/ss superiore al 32% conforme a quanto indicato dal disciplinare del Grana Padano. [1]

Tabella 1. Dati compositivi dei campioni forniti dai 3 laboratori; variabilità intra- e interlaboratorio; bias.

lab1	lab2	lab3
------	------	------

	SS1	G1	P1	SS2	G2	P2	SS3	P3
<b>Min</b>	64.18	23.98	29.37	64.12	25.00	29.50	65.50	29.20
<b>Max</b>	70.38	32.90	40.16	69.58	34.00	35.10	68.91	34.49
<b>Mean</b>	67.24	28.40	32.48	66.42	28.99	32.28	67.11	31.91
<b>S<sub>pop</sub></b>	1.14	1.68	1.21	0.96	1.40	1.00	0.87	1.19
<b>S<sub>lab</sub></b>	0.42	0.39	0.367	0.36	0.32	0.15	nd	nd

Con questi dati, è stato così definito un dataset dei dati compositivi, impiegato per sviluppare i modelli predittivi. Le statistiche del contenuto in sostanza secca, grasso e proteine sul tal quale e sulla materia secca selezionate sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2. Statistiche descrittive del dataset utilizzato per la costruzione dei modelli predittivi.

	Min	Max	Mean	SD
<b>SS %</b>	64.18	70.16	67.22	1.11
<b>G %</b>	23.98	32.90	28.46	1.65
<b>P %</b>	29.29	36.24	32.42	1.08
<b>G/SS %</b>	35.85	48.71	42.32	2.19
<b>P/SS %</b>	43.36	54.20	48.26	1.81

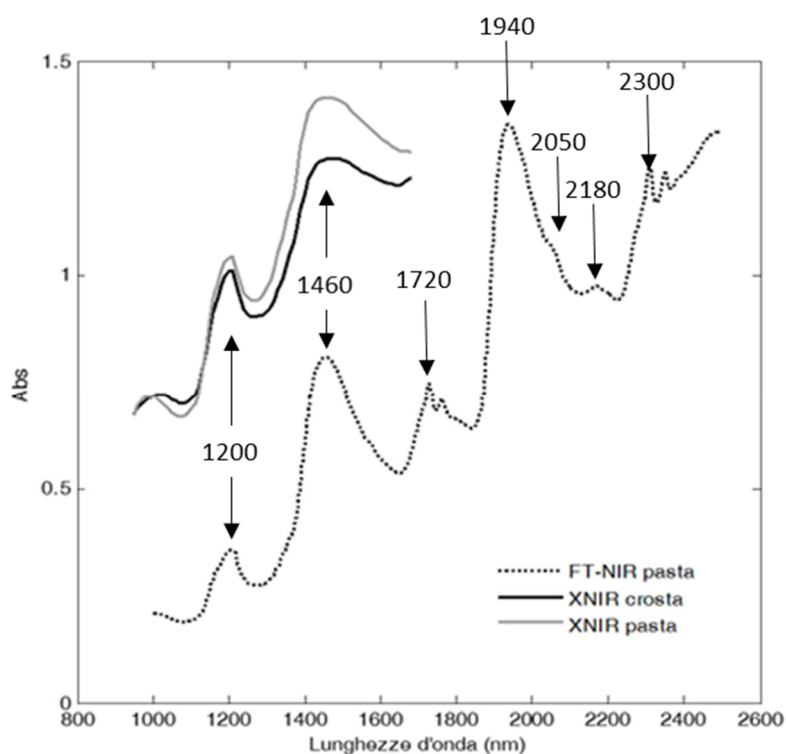


Figura 2. Esempi di spettri di pasta e crosta di Grana Padano ottenuti con NIR portatile XNIR (- pasta e - crosta) e da banco FT-NIR (-- pasta).

La figura 2 riporta esempi di spettri di pasta e crosta ottenuti con i due strumenti. Gli spettri dello strumento portatile sono stati troncati a 1680 nm, in quanto l'ultima porzione dello spettro non porta informazione utile. Gli spettri ottenuti da entrambi gli strumenti mostrano le bande caratteristiche degli assorbimenti dell'acqua intorno a 1460 e 1940 nm (solo per FT-NIR) e la banda relativa all'overitone del legame CH a 1200 nm. Negli spettri FT-NIR si riconoscono anche ulteriori bande relative a tale legame della frazione lipidica tra

1720 e 1760 nm e tra 2300 e 2350 nm. Tra 2000 e 2200 nm sono presenti gli assorbimenti dei legami NH delle amidi delle proteine. [2]

La tabella 3 riassume le performance dei modelli di calibrazione sviluppati sulla pasta con i due strumenti. La qualità dei modelli è stata valutata in termini di  $R^2$  in cross-validazione ed errore in cross validazione (RMSECV).

Tabella 3. Modelli predittivi sviluppati utilizzando gli spettri della pasta.

Strumento	Parametro	Pretrattamento	Outliers	PC	$R_{val}$	RMSECV
FT-NIR	SS	Deriv. 1 (ordine 2, 25 p.ti); SNV; MC	0	9	0.770	0.541
	G	Deriv. 1 (ordine 2, 25 p.ti); SNV; MC	2	7	0.911	0.487
	P	Deriv. 1 (ordine 2, 25 p.ti); SNV; MC	4	7	0.921	0.283
	G/SS	Deriv. 1 (ordine 2, 25 p.ti); SNV; MC	2	5	0.874	0.743
	P/SS	Deriv. 1 (ordine 2, 25 p.ti); SNV; MC	4	5	0.929	0.451
XNIR	SS	Deriv. 1 (ordine 2, 5 p.ti); SNV; autoscale	4	5	0.558	0.692
	G	MSC; deriv. 1 (ordine 2, 5 p.ti); MC	4	6	0.899	0.474
	P	MSC; deriv. 1 (ordine 2, 3 p.ti); autoscale	2	6	0.808	0.398
	G/SS	MSC; deriv. 1 (ordine 2, 3 p.ti); autoscale	2	6	0.899	0.593
	P/SS	MSC; SNV; deriv. 1 (ordine 2, 3 p.ti); autoscale	2	5	0.886	0.530

*Deriv. 1: derivata prima; SNV: standard normal variate; MC: mean center; PC: numero componenti principali;  $R_{val}$ :  $R^2$  in cross validazione; RMSECV: root mean square error of cross-validation.*

I risultati riassunti nella tabella 3 indicano performance molto buone dello strumento portatile, con errori paragonabili a quelli dello strumento da banco

Le performance dei modelli costruiti con gli spettri XNIR della crosta e le analisi chimiche della pasta (non mostrati) sono risultati promettenti e sono ancora in corso di implementazione.

## Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano una più che soddisfacente capacità predittiva dei modelli NIR costruiti con uno spettrometro portatile, nei confronti della composizione chimica del formaggio Grana Padano. Le performance ottenute sono infatti risultate paragonabili a quelle ottenute con uno strumento FT-NIR da banco.

E' in corso l'ottimizzazione dei modelli per la predizione della composizione chimica delle forme intere di Grana Padano a partire dagli spettri acquisiti sulla crosta. Tali modelli saranno indispensabili per le operazioni di screening dei lotti produttivi nella fase di marchiatura, a livello di magazzino del Consorzio.

Un'ulteriore attività prevista riguarderà la standardizzazione degli strumenti portatili slave attualmente in uso dal personale del Consorzio.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito della convenzione GRANIR "Sviluppo un sistema rapido per la caratterizzazione compositiva delle forme di Grana Padano DOP basato su tecnologia NIR" con il Consorzio per la tutela del Formaggio Grana Padano.

## **Bibliografia**

1. [http://www.granapadano.it/assets/documenti/pdf/disciplinare\\_it.pdf](http://www.granapadano.it/assets/documenti/pdf/disciplinare_it.pdf)
2. J. Workman, Jr., L. Weyer (2007) Practical Guide to Interpretive Near-Infrared Spectroscopy. CRC Press, Boca Raton, Florida.



## UTILIZZO DI UNO STRUMENTO PORTATILE (MICRONIR) PER L'AUTENTICAZIONE DI SPECIE ITTICHE

Silvia Grassi, Ernestina Casiraghi, Cristina Alamprese

*DeFENS Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, Università degli Studi di Milano, via Celoria, 2 – Milano*

### Riassunto

Nel settore ittico sono sempre più frequenti frodi commerciali a carico di specie ittiche di particolare pregio sostituite con specie di minor pregio. La diffusione di prodotti pronti al consumo, quali filetti e preparati a base di pesce, rende difficile l'impiego di sistemi di riconoscimento tradizionali (analisi morfologica), dando ampio spazio a episodi fraudolenti.

Lo studio presentato valuta la possibilità di utilizzare uno strumento NIR portatile, rapido e di semplice utilizzo, per la discriminazione del pregiato merluzzo nordico (*Gadus morhua*) dal più economico eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*).

A tale scopo, 80 filetti di *G. morhua* e 90 di *M. aeglefinus* sono stati ottenuti direttamente da fornitori fidati e analizzati in sei punti diversi mediante un MicroNIR 1700 JDSU (950 – 1650 nm; 125 variabili). Ciascun filetto è stato successivamente macinato e compattato in modo da ottenere due *patties*, su ognuno dei quali si sono effettuate tre letture NIR.

I dati ottenuti per ciascun campione sono stati mediati e pretrattati mediante SNV, MSC, derivata prima e seconda. Si è quindi proceduto a una selezione di variabili tramite algoritmo SELECT (n=15) per poi sottoporre i *dataset* ad Analisi Discriminante Lineare (LDA). I modelli di classificazione ottenuti sono stati validati internamente attraverso *cross-validation* (5CV) ed esternamente utilizzando tre test set esterni diversi.

I risultati conseguiti permettono di differenziare i filetti di *G. morhua* da quelli di minor valore di *M. aeglefinus*, poiché l'abilità predittiva media dei modelli LDA è pari o superiore al 90% per i dati pretrattati con SNV. Nel caso dei prodotti macinati, la percentuale di corretta classificazione ottenuta in predizione con i dati grezzi è sempre superiore al 92%.

Il MicroNIR può quindi essere considerato uno strumento portatile valido per una preliminare valutazione dell'autenticità di un numero elevato di campioni di prodotti ittici. Potrebbe quindi essere impiegato direttamente nei punti vendita per l'identificazione di comportamenti fraudolenti, garantendo, così, i diritti dei consumatori.

## USO DI UNO STRUMENTO NIR PORTATILE PER LA VALUTAZIONE DELL'OMOGENEITÀ DELL'UNIFEED DISTRIBUITO IN MANGIATOIA.

Serva L.<sup>1\*</sup>, Marchesini G.<sup>1</sup>, Garbin E.<sup>1</sup>, Tenti S.<sup>1</sup>, Mirisola M.<sup>1</sup>, Segato S.<sup>1</sup>, Gerardi G.<sup>1</sup>, Andrighetto I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Affiliation: Department of Animal Medicine, Production and Health - University of Padova – Viale dell'Università, 16 - 35020 – Legnaro (PD)

\*Corresponding email: lorenzo.serva@unipd.it

### Riassunto

Come affermato in molte linee guida (ARC, Cornell, INRA e NRC, ecc.), il giusto equilibrio di nutrienti nella preparazione della razione per bovini (unifeed) è un requisito essenziale per massimizzare la produzione, ridurre gli sprechi e salvaguardare il benessere degli animali. Una criticità in tal senso è data dalla variabilità della composizione degli alimenti e dai metodi di preparazione della razione, che possono causare ampie differenze nella distribuzione dei nutrienti nell'unifeed, favorendo la separazione delle frazioni fibrose dai concentrati, e invalidando le ipotesi su cui si basa la tecnica unifeed. Lo scopo di questo studio era di confrontare metodi tradizionali di analisi chimica e fisica, con l'uso di uno spettrofotometro portatile NIR, per calcolare un indice omogeneità della razione distribuita. In questo studio, sono stati raccolti 150 campioni di unifeed per bovini da carne, analizzati per i principali componenti chimici e setacciati attraverso un separatore di particelle Penn State modificato. I dati di setacciatura hanno permesso di calcolare la lunghezza media geometrica (LMG) dell'unifeed. Gli stessi campioni e la frazione che passa attraverso l'ultimo vaglio, sono stati scansionati in doppio con un Polisphec (ITPhotonics, Italia), in un campo spettrale tra 902-1680nm. Sono state sviluppate due calibrazioni utilizzando il software SL Calibration Wizard 3.0 (SensoLogic GmbH, Germania). La prima per i parametri chimici e fisici dell'unifeed e la seconda per parametri chimici del fondo del setaccio. Gli  $R^2$  sono stati calcolati in validazione incrociata. I risultati per l'unifeed sono compresi tra  $R^2=0,75$  nei grassi e  $R^2=0,98$  per l'umidità, mentre l' $R^2$  è 0,87-0,94 e 0,78 per il quarto setaccio, il fondo e la LMG, rispettivamente. I risultati della calibrazione del fondo sono compresi tra  $R^2=0,88$  dell'NDF e  $R^2=0,98$  per la sostanza secca. I risultati ottenuti possono essere utilizzati per il calcolo di un indice di omogeneità dell'unifeed distribuito. Questo indice è oggetto di domanda di brevetto italiano PD102016000047355.

### Introduzione

L'allevamento del bovino da carne italiano è dominato dall'impiego della dieta unifeed. Tale metodo è volto a massimizzare le prestazioni produttive, senza tuttavia rinunciare alla salute dell'animale. Per ottenere questi obiettivi è necessaria un'attenta valutazione della genetica dell'animale, la valutazione delle disponibilità di alimenti e la conoscenza degli stessi. La formulazione della dieta, però, non sempre corrisponde ai risultati realmente ottenuti. Ecco perché la possibilità di verificare le caratteristiche nutritive della dieta unifeed ricopre una sempre maggior importanza nella gestione della stalla. Precedenti esperienze hanno già dimostrato che l'uso di uno strumento NIRS da laboratorio con campioni essiccati e macinati [1] [2] oppure portatile con campioni tal quale [3], si rivela utile al perseguimento di questi obiettivi. Anche l'aspetto fisico della razione è considerato con attenzione durante la fase di preparazione dell'unifeed, in particolare i ricercatori della Penn State University [4] e dalla Society for Engineering in Agriculture, Food and Biological System [5] hanno affrontato con efficacia questi argomenti, definendo gli standard più adeguati. Tuttavia, l'impiego del NIRS relativamente alla misura delle dimensioni fisiche è ancora molto limitato in ambito zootecnico. Esiste una copiosa bibliografia di applicazioni per la

determinazione della dimensione particellare in campo farmaceutico (principio attivo o eccipiente) [6] [7] e nell'industria della cellulosa [8]. In particolare Banco e Peguero [9], hanno dimostrato come il NIRS sia in grado di stimare accuratamente la distribuzione particellare nel caso di miscele di aggregati di diossido di silicene. Inoltre, il NIRS è stato in grado di predire correttamente ( $R^2 = 0,85$ ;  $SEC = 299 \mu\text{m}$ ) la lunghezza media geometrica della frazione amilacea del silomais che passa da un setaccio di 19,0 mm di diametro e 12,2 mm di spessore [10].

L'analisi della frazione setacciata e raccolta nel fondo del setaccio, riveste un ruolo fondamentale per verificare, attraverso l'analisi chimica e il calcolo del rapporto tra frazioni fibrose e frazioni amilacee, il grado di impiego di concentrati proteici e amilacei nella dieta e per stimare la quantità di fibra eccessivamente sfibrata nella fase di preparazione della dieta.

### Materiali e Metodi

L'indagine ha riguardato 150 campioni di unifeed per bovini da carne provenienti dalla pianura Veneta e raccolti negli anni 2015-2016. I campioni sono stati raccolti in tre frazioni: la prima, del peso approssimativo di 1-1,5 Kg, era destinata all'analisi chimica ed alla scansione NIRS. La seconda e la terza sono state utilizzate per una setacciatura in doppio della razione. I campioni sono stati analizzati per i principali componenti chimici: sostanza secca (SS, 100-umidità), ceneri (CEN), proteina grezza (PG), estratto etereo (EE), fibra neutro deterso (NDF), fibra acido detersa (ADF), amido (AMIDO); e infine setacciati attraverso un separatore di particelle Penn State modificato come segue: 6 strati con fori larghi rispettivamente 3,81 cm (S1), 1,91 cm (S2), 0,79 cm (S3), 0,38 cm (S4), 0,18 cm (S5) e un fondo (FONDO). I dati di setacciatura hanno permesso di calcolare la lunghezza media geometrica (LMG) dell'Unifeed, secondo quanto previsto dalla Society for Engineering in Agriculture, Food and Biological System [5]. Le analisi sono state eseguite in accordo ai seguenti metodi: SS [11], CEN [12], PG [13], EE [14], aNDF [15], ADF [16], AMIDO [17]. Le razioni e la frazione raccolta nel fondo del setaccio, sono stati scansionati in doppio con uno Polispac<sup>NIR</sup> (ITPhotonics, Breganze-Italia), in un campo spettrale tra 902-1680 nm. Sono state sviluppate due calibrazioni utilizzando il software SL Calibration Wizard 3.0 (SensoLogic GmbH, Germania). La prima per i parametri chimici e fisici dell'unifeed e la seconda per parametri chimici del fondo del setaccio. Per valutare le calibrazioni sono stati calcolati: RSQcal = coefficiente di determinazione della calibrazione; SEC = errore standard di calibrazione; RMSECV = errore standard di validazione incrociata; RSQCV = coefficiente di determinazione di validazione incrociata.

### Risultati e Discussione

I risultati di calibrazione sono riportati in tabella 1 e tabella 2. Ad esclusione delle frazioni trattenute dal setaccio S4 (RSQcal = 0,87) e FONDO (RSQcal = 0,94), gli altri setacci sono stati predetti con RSQcal non soddisfacenti. Anche la LMG è risultata essere influenzata dalle prestazioni di calibrazione dei precedenti setacci, con un RSQcal = 0,78 appena sufficiente. In particolare i setacci superiori (S1-S2-S3) sono affetti da poca riproducibilità del dato di setacciatura a causa della grossolanità del prodotto trattenuto. Molto buone, invece, sono state le prestazioni di calibrazione per SS, CEN, NDF e ADF (tutte con RSQcal superiore a 0,82). Poco più che sufficienti, gli altri parametri (PG, EE). Infine, ottimi risultati sono stati ottenuti con tutte le calibrazioni di tutti i parametri del FONDO, con RSQcal compresi tra 0,84 (ADF) e 0,98 (SS). L'impiego di alcuni dei risultati delle analisi NIRS di alcuni di questi fattori, i meglio predetti, opportunamente pesati per importanza riguardo agli aspetti nutrizionali della razione, e per confronto con standard definiti normali, ha permesso di determinare un indice di omogeneità della razione unifeed (I.O.). Tale indice (sottoposto a domanda di brevetto) prevede un algoritmo di calcolo che usa come dati iniziali le predizioni NIRS delle suddette calibrazioni ottenute dalla razione tal quale. L'algoritmo dopo una fase di filtraggio dei dati e rimozione degli errori casuali, calcola la variazione dei valori (per ciascun parametro utilizzato) durante la fase di scarico dell'unifeed, lo confronta con uno standard e ne determina lo scostamento dalla condizione ideale, ovvero quando dal primo momento di scarico all'ultimo non si riveli nessuna variazione di

composizione chimico/fisica della razione. L'algoritmo, inoltre, è in grado di determinare quale settore di scarico (per ciascun parametro) sia maggiormente interessato da un'eventuale disomogeneità (figura 1).

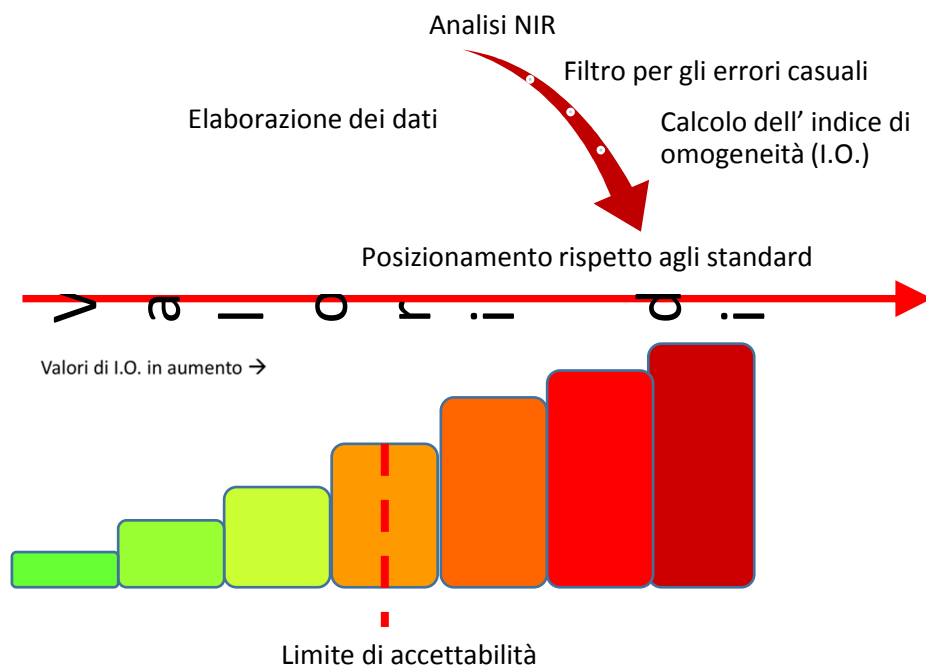


Figura 1- principio di funzionamento dell'I.O.

Tabella 1 - Performances di calibrazioni per l'unifeed.  $RSQ_{cal}$  = coefficiente di determinazione della calibrazione;  $SEC$  = errore standard di calibrazione;  $RMSECV$  = errore standard di validazione incrociata;  $RSQCV$  = coefficiente di determinazione di validazione incrociata.

Performance delle calibrazioni per l'unifeed										
Modello	Outliers	Factors	$RSQ_{cal}$	$SEC$	$RMSECV$	$RSQCV$	Actual min.	Actual mean	Actual max.	Actual std.dev.
SS	11	3	0,98	1,30	1,43	0,98	32,7	60,6	90,9	11,8
CEN	10	4	0,82	0,40	0,43	0,78	1,92	3,66	7,77	0,96
PG	12	2	0,78	0,71	0,72	0,77	4,22	7,87	14,8	1,99
EE	7	7	0,75	0,29	0,32	0,66	0,86	2,06	8,27	0,88
NDF	15	5	0,94	1,28	1,41	0,92	9,17	18,0	32,2	3,80
ADF	13	5	0,91	0,84	0,95	0,88	3,67	9,45	17,2	2,19
AMIDO	13	8	0,90	1,44	1,72	0,85	5,89	21,0	39,9	5,91
S1	11	8	0,49	0,43	0,56	0,14	0,00	0,01	0,26	0,03
S2	15	7	0,39	1,57	1,84	0,16	0,002	0,04	0,13	0,03
S3	19	9	0,74	2,42	2,91	0,60	0,004	0,13	0,33	0,06
S4	30	3	0,87	2,57	2,71	0,85	0,08	0,34	0,53	0,08
S5	30	6	0,63	2,18	2,57	0,46	0,13	0,22	0,42	0,05
FONDO	43	5	0,94	2,32	2,58	0,92	0,05	0,25	0,51	0,10
LMG	12	8	0,78	0,58	0,71	0,64	2,14	4,76	9,52	1,45

Tabella 2 - Performances di calibrazioni per il fondo.  $RSQ_{cal}$  = coefficiente di determinazione della calibrazione;  $SEC$  = errore standard di calibrazione;  $RMSECV$  = errore standard di validazione incrociata;  $RSQCV$  = coefficiente di determinazione di validazione incrociata.

Performance delle calibrazioni per l'unifeed										
Modello	Outliers	Factors	$RSQ_{cal}$	$SEC$	$RMSECV$	$RSQCV$	Actual min.	Actual mean	Actual max.	Actual std.dev.
SS	7	4	0,98	1,27	1,39	0,98	44,3	63,7	89,5	9,04

CEN	6	10	0,86	0,50	0,69	0,72	1,74	3,68	7,30	1,29
PG	7	8	0,89	0,65	0,79	0,83	6,41	9,35	17,0	1,92
EE	8	8	0,93	0,25	0,31	0,89	1,04	2,40	6,27	0,94
NDF	2	10	0,88	1,14	1,48	0,78	5,62	11,4	21,6	3,16
ADF	3	4	0,84	0,66	0,73	0,79	2,86	5,02	10,1	1,61
AMIDO	5	6	0,93	1,68	1,91	0,91	9,62	30,1	51,7	6,38

## Conclusioni

Gli errori nella formulazione e preparazione della dieta, possono essere facilmente evidenziati usando il NIRS direttamente in stalla. Il NIRS dimostra di essere un valido strumento in grado di analizzare le principali caratteristiche chimiche e fisiche dell'unifeed e, allo stesso tempo, per il fondo. Con il nuovo sistema qui proposto, potendo analizzare le caratteristiche fisiche dell'alimento, è ancor più possibile controllare efficacemente e con precisione l'alimentazione distribuita al bestiame, verificando al contempo la riuscita delle buone pratiche aziendali, della gestione del carro miscelatore e la corretta applicazione dei principi teorici dell'alimentazione animale.

L'uso del NIR, in accoppiamento con il sistema di calcolo I.O., è sicuramente un aiuto concreto per prendere le corrette decisioni gestionali riguardo l'uso del carro miscelatore e della tecnica unifeed.

## Ringraziamenti

Ringraziamo la ditta ITPhotonics per la concessione in comodato gratuito dello strumento Polispes<sup>NIR</sup> e la ditta Faresin s.p.a per il sostegno fornito alla ricerca.

## Bibliografia

- [1] Mentink R. L., Hoffman P. C., Bauman L. (2006). M. *Utility of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to Predict Nutrient*. J. Dairy Sci. 89:2320–2326.
- [2] Swart E., Brand T.S., Engelbrecht J. (2012). *The use of near infrared spectroscopy (NIRS) to predict the chemical composition of feed samples used in ostrich total mixed rations Composition and In Vitro Digestibility of Total Mixed Rations*. South African Journal of Animal Science, 42 (Issue 5, Supplement 1).
- [3] Serva L., Cozzi G., Gottardo F., Mirisola M. (2004) *Analisi di diete unifeed per bovini da carne mediante due diversi strumenti NIRS*. Atti del Simposio Italiano di Spettroscopia nel Vicino Infrarosso, Lodi 15-16 giugno, ISBN 9788890406409.
- [4] Heinrichs J. (2013). The Penn State Particle Separator.  
[http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/forages/forage-quality-physical/separator/extension\\_publication\\_file](http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/forages/forage-quality-physical/separator/extension_publication_file)
- [5] ASAE STANDARDS (2001) 48<sup>th</sup> Edition, *Standars Engineering Practices Data*, 590-592.
- [6] Otsuka M. (2006). *Chemoinformetrical evaluation of granule and tablet properties of pharmaceutical preparations by near-infrared spectroscopy*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 82, 109 – 114.
- [7] Otsuka M. (2004). *Comparative particle size determination of phenacetin bulk powder by using Kubelka–Munk theory and principal component regression analysis based on near-infrared spectroscopy*. Powder Technology, 141, 244– 250.
- [8] O'Neil AJ, Jee RD, Moffat AC. (1999). *Measurement of the cumulative particle size distribution of microcrystalline cellulose using near infrared reflectance spectroscopy*. Analyst, 124, 33–36.
- [9] Blanco M, Peguero A. (2008). *An expeditious method for determining particle size distribution by near infrared spectroscopy: Comparison of PLS2 and ANN models*. Talanta, 77, 647-651.

- [10] Zwald A, Dorshorst AE, Hoffman PC, Bauman LM, Bertram MG. (2008). *Technical Note: A Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Technique to Predict Particle Size of Starch Within Corn Silage*. Journal of Dairy Science, 91 (5), 2071-2076.
- [11] AOAC, 2003. Official methods of analysis. 17th ed., 2nd revision, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Method #934.01.
- [12] AOAC, 2003. Official methods of analysis. 17th ed., 2nd revision, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Method #942.05.
- [13] AOAC, 2005. Official methods of analysis. 18th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Method #2001.11.
- [14] AOAC, 2006. Official Method of Analysis. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. Method #2003.05.
- [15] ANKOM Technology. 2015. Method 13, 4/10/15: Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I). Ankom Technology, Macedon, NY. (Accessed March 20, 2016 from [https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_13\\_NDF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_13_NDF_A2000.pdf)).
- [16] ANKOM Technology. 2015. Method 12, 4/10/15: Acid Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A2000 and A2000I). Ankom Technology, Macedon, NY. (Accessed March 20, 2016 from [https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method\\_12\\_ADF\\_A2000.pdf](https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/Method_12_ADF_A2000.pdf)).
- [17] AOAC, 2000. Official methods of analysis. 17th ed., Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Method #996.11.

## UTILIZZO DI IMAGING IPERSPETTRALE PER LA DISCRIMINAZIONE VARIETALE E DI RACCOLTO DI CARCIOFI

Amodio M.L., Berardi A., Ricci I., Colelli G.

*Università di Foggia, Via Napoli 25, 71122, Foggia (FG)*

### **Riassunto**

L'obiettivo di questo lavoro è stato usare le immagini iperspettrali per discriminare carciofi di due varietà e diverse epoche di raccolta. Nella zona di Brindisi si produce infatti la cv. "Carciofo di Brindisi" che ha ricevuto la denominazione IGP per cui sarebbe importante distinguerla da altre varietà, anche in considerazione dell'importanza economica di questa specie che normalmente non viene propagata per seme. A tale scopo è stato utilizzato uno scanner spettrale VIS-NIR (DV Srl, ver 1.4., Italia) nella regione 400-1000 nm. I carciofi sono stati raccolti nel periodo Dicembre 2009 aprile 2010. Nel caso del "Carciofo Brindisino" sono state effettuate 7 raccolte per un totale di 400 spettri (308 usati per la calibrazione e 92 come test set), mentre per il "Violetto foggiano" sono state effettuate 4 raccolte per un totale di 320 spettri (244 per la calibrazione e 76 come test set). Per praticità i carciofi sono stati sbrattati e tagliati in spicchi e le immagini sono state acquisite sulle brattee esterne. Sono quindi stati testati 2 Modelli di classificazione, SIMCA e PLS-DA e diversi metodi di pretrattamenti matematici. L'uso della derivata seconda ha permesso la miglior separazione tra le varietà mentre per le diverse epoche è stata usata la combinazione di Smoothing con MSC. Con la PLS-DA sono stati raggiunti i risultati migliori con valori di specificità e sensibilità del 100% sul test set per la classificazione varietale, mentre per le epoche di raccolta la specificità è variata dall'86 al 100% e la sensibilità dal 33% al 100%, con una percentuale di corretta classificazione del 92% in calibrazione e dell'80% in predizione. I risultati dimostrano come queste tecnologie possano essere usate per caratterizzare le produzioni per origine e qualità e siano un valido strumento per supportare l'identificazione del loro prodotto e la scelta del tempo ottimale di raccolta.

## IMAGING IPERSPETTRALE IN AGRICOLTURA: STIMA DEGLI EFFETTI DEGLI STRESS IDRICO E NUTRIZIONALE SULLE VARIABILI COLTURALI ATTRAVERSO UN SENSORE VIS-NIR

Martina Corti\*<sup>1</sup>, Daniele Cavalli<sup>1</sup>, Pietro Marino Gallina<sup>1</sup>, Giovanni Cabassi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dip. di Scienze Agrarie e Ambientali, Univ. Milano, IT

<sup>2</sup> Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, CREA-FLC, Lodi, IT

\*martina.corti@unimi.it

### Riassunto

I sensori ottici possono essere utilizzati per valutare lo stato fisiologico delle piante in modo da guidare gli input agronomici e migliorarne l'efficienza d'uso da parte della coltura. In particolare, l'imaging iperspettrale è interessante per l'agricoltura di precisione, perché permette la mappatura della variabilità spaziale del dato spettrale.

L'imaging iperspettrale nel visibile-infrarosso è quindi stato testato in un esperimento in serra per stimare lo stato azotato e idrico della coltura attraverso modelli di regressione partial least squared (PLS), quando entrambi i fattori di crescita, azoto e acqua, sono limitanti. Piante di spinacio sono state coltivate in vaso, a due diversi livelli idrici combinati a quattro livelli di nutrizione azotata. La riflettanza della canopy è stata acquisita mediante un sistema di imaging che acquisisce 121 lunghezze d'onda tra 339 e 1094 nm. Lo spettro medio e l'iperspettrogramma, secondo il metodo proposto da Ferrari et al. (2013) [1] modificato, sono stati calcolati per ogni vaso. Modelli di regressione PLS sono stati applicati agli spettri medi e agli iperspettrogrammi su tutto il set di dati (n=76) per la predizione del contenuto idrico ( $R^2_{cv}=0.84$  e RMSECV (root mean squared error of cross-validation)=0.80% da spettro medio;  $R^2_{cv}=0.82$  e RMSECV=0.86% da iperspettrogrammi) e della concentrazione di azoto ( $R^2_{cv}=0.46$  e RMSECV=0.28% s.s. da spettro medio;  $R^2_{cv}=0.57$  e RMSECV=0.19% s.s. da iperspettrogrammi). Lo stress idrico ha avuto la maggior influenza sia sulla struttura della canopy sia sulla risposta spettrale. Sebbene la spettroscopia ad immagini abbia un grande potenziale nella diagnosi degli stress colturali, l'effetto combinato di più fattori di stress sulla struttura e sulla riflettanza della canopy deve essere approfondito prima che questo metodo sia utilizzato come strumento di gestione agronomica. Infine la tecnica di estrazione degli iperspettrogrammi a fini predittivi si è rivelata soddisfacente, aprendo prospettive per un suo utilizzo in applicazioni di imaging iperspettrale in pieno campo.

### Introduzione

La produzione intensiva del settore agricolo adottata negli ultimi decenni ha avuto conseguenze ambientali dovute, in particolare, alla gestione sub-ottimale dell'irrigazione e della concimazione delle colture. L'applicazione uniforme degli input agronomici, condotta senza tener conto della variabilità dello stato della coltura all'interno del campo, penalizza inoltre l'efficienza d'uso degli input e quindi la redditività delle coltivazioni. In questo quadro, nasce l'agricoltura di precisione definita come un sistema di produzione agricolo basato sull'informazione sito-specifica e progettato per aumentare a lungo termine l'efficienza, la produttività e la redditività minimizzando l'impatto dell'agricoltura sull'ambiente. Negli ultimi decenni, molti indici ottici per il monitoraggio dello stato idrico e nutrizionale delle piante sono stati sviluppati utilizzando immagini multispettrali e, più recentemente, iperspettrali. Finora, tuttavia, gli studi completi volti a identificare metodi ottici per la gestione dei due tipi di stress sono ancora scarsi in letteratura [2], [3]. L'interesse crescente per l'imaging iperspettrale inoltre, rende necessario studiare nuove tecniche per gestire in modo ottimale la mole di dati che ne deriva. L'analisi multivariata applicata all'imaging iperspettrale mira



a comprimere i dati pur conservandone l'abilità predittiva [4], in particolare, una nuova tecnica proposta da Ferrari et al. (2013) consiste nell'estrazione degli iperspettrogrammi come segnali che mantengono l'informazione spaziale e spettrale legata all'immagine pur riducendone il peso computazionale.

Lo scopo di questo lavoro quindi, è stato quello di testare la capacità di un sensore di imaging iperspettrale (339 e 1094 nm) di stimare il contenuto idrico e la concentrazione di azoto, in spinacio (pianta modello) sottoposto a una combinazione di stress idrico e azotato, utilizzando l'analisi multivariata e due metodi di compressione del dato iperspettrale: lo spettro medio e l'iperspettrogramma estratti dall'immagine iperspettrale della canopy.

## Materiali e Metodi

### *Gestione coltura e misure di riferimento*

La coltura di spinacio è stata coltivata in vaso sotto la combinazione di quattro trattamenti azotati (controllo non concimato, azoto limitante, ottimale e ridondante) e due trattamenti idrici (ottimo stato idrico e stress idrico indotto dall'interruzione delle irrigazioni) in un disegno sperimentale a randomizzazione completa in quattro repliche: due assegnate alle acquisizioni di imaging e le restanti due riservate al campionamento distruttivo per le analisi di riferimento. Le acquisizioni sono iniziate al momento dell'induzione dello stress idrico (30 giorni dopo la semina) e si sono svolte in quattro date (30, 32, 34 e 36 giorni dopo la semina) fino alla morte delle piante sottoposte a stress idrico. Le misure di riferimento sono avvenute su cinque piante per ogni data. Sono stati determinati il peso fresco, secco e la concentrazione di azoto della biomassa aerea.

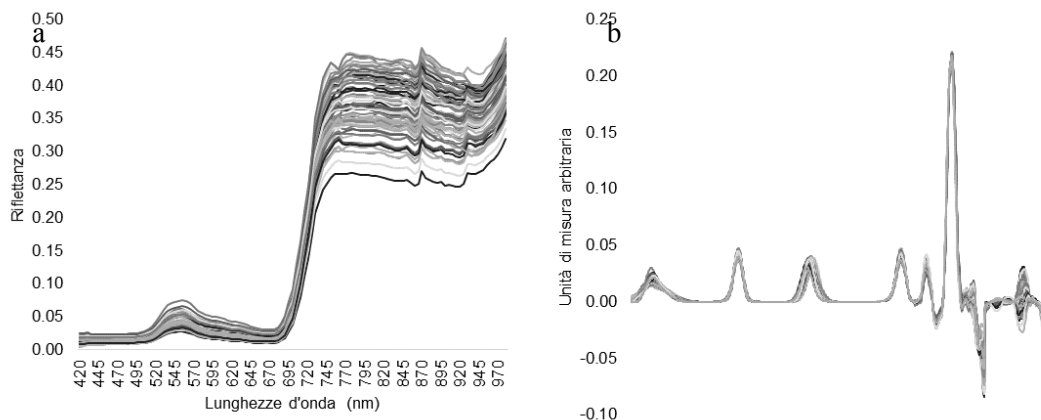
### *Acquisizioni con sensore iperspettrale*

Le acquisizioni, con sensore di imaging iperspettrale dotato di spettrometro Specim V10 e di sensore Basler PiA190032gm (assemblati da DV s.r.l., Padova) e con fonte di luce attiva, sono avvenute tramite la costruzione di un attuatore lineare che ha permesso la scansione dell'intero vaso. Le immagini sono state acquisite in quattro date, in concomitanza con i campionamenti per le analisi distruttive. Durante le scansioni il sistema di acquisizione è stato coperto da un telo nero per evitare interferenze della luce ambientale. Al termine della campagna di acquisizione il dataset è risultato composto da 76 immagini che sono state utilizzate ai fini delle calibrazioni.

### *Processamento delle immagini*

Le immagini sono state segmentate tramite algoritmo di Otsu [5], applicato alla lunghezza d'onda di 800 nm, con l'obiettivo di separare lo sfondo dal segnale proveniente dalla canopy, composta dalla vegetazione e dal suolo. La ROI (region of interest) risultante è stata la base per l'applicazione dei due metodi di compressione del dato: il calcolo dello spettro medio di ciascuna canopy e l'estrazione del corrispondente iperspettrogramma. Questa seconda tecnica è stata applicata seguendo il metodo proposto da Ferrari et al. (2013): a ciascuna immagine del dataset è stata applicata una PCA con le medesime impostazioni (autoscaling e estrazione di due componenti principali), sono state quindi calcolate le distribuzioni di frequenza dei valori di scores, residui  $q$  e  $T^2$  di Hotelling assunti dai pixel dell'immagine, poi unite in unico segnale a rappresentare la variabilità spaziale. Infine, al segnale, è stata aggiunta la sequenza dei loadings delle due componenti principali a rappresentare l'informazione spettrale rilevante.

*Figura 1- Set di predittori usati per la stima delle variabili colturali di interesse: spettro medio (a) e iperspettrogrammi (b) della canopy.*



### Tecnica statistica

Gli spettri medi della canopy e gli iperspettrogrammi sono stati usati come set di predittori del contenuto idrico e della concentrazione di azoto della biomassa aerea di spinacio, tramite la tecnica di regressione PLS (Partial Least Square). La tecnica di cross-validazione applicata è consistita nell'ordinare i dati per variabile misurata in ordine crescente, in modo da costruire il test set per gruppi di cancellazione composti da sedici campioni (otto campioni x due repliche) per blocchi omogenei. Di ogni modello predittivo sono stati determinati il numero di componenti principali, il coefficiente di determinazione ( $R^2$ ) in calibrazione e cross-validazione e il RMSE (root mean squared error), calcolato come  $\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}}$ , in cui  $\hat{y}_i$  sono valori stimati,  $y_i$  sono quelli misurati, e  $n$  è il numero dei campioni.

### Risultati e Discussione

Le performance di stima sono riassunte in tabella 1.

Tabella 1- Performance dei modelli PLS per la stima del contenuto idrico ( $Wc$ ) e della concentrazione di azoto ( $Nc$ ) a partire dallo spettro medio e dagli iperspettrogrammi della canopy. I risultati sono riportati in termini di numero delle componenti principali ( $N_{PC}$ ),  $R^2$  in calibrazione ( $cal$ ) e in cross-validazione ( $cv$ ) e RMSE in calibrazione e cross-validazione ( $RMSEC$  e  $RMSECV$ , rispettivamente).

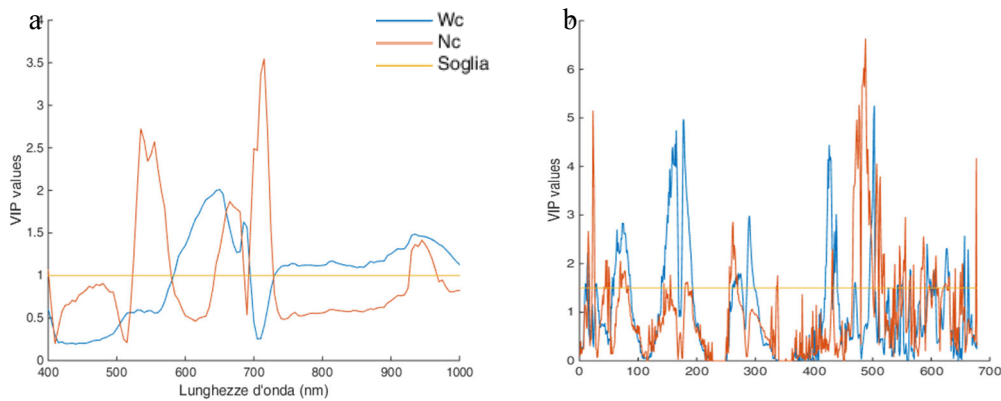
Predittori	Variabile Stimata	$N_{PC}$	$R^2_{cal}$	$R^2_{cv}$	$RMSEC^*$	$RMSECV^*$
Spettro Medio	$Wc$ (%)	3	0.87	0.84	0.804	0.903
	$Nc$ (% s.s.)	4	0.54	0.46	0.278	0.300
Iperspettrogrammi	$Wc$ (%)	2	0.86	0.82	0.856	0.966
	$Nc$ (% s.s.)	3	0.77	0.57	0.194	0.266

\* il parametro statistico è riportato con la stessa unità di misura della variabile stimata

I modelli basati sugli iperspettrogrammi hanno prodotto performance di stima simili, nel caso della stima del contenuto idrico ( $Wc$ ), o leggermente migliori, nel caso della stima della concentrazione di azoto ( $Nc$ ) rispetto a quelli basati sullo spettro medio. Per entrambi i set di predittori si è verificata una stima migliore della  $Wc$  anziché della  $Nc$ , che non è da considerarsi ancora adeguata per scopi applicativi ( $R^2 < 0.8$ ). Questo risultato è probabilmente da ascrivere al fatto che le misure ottiche sono state fatte a livello di canopy e che gli effetti dello stress idrico sull'architettura della canopy hanno avuto un maggiore impatto rispetto agli effetti indotti dallo stress nutrizionale.

In figura 2 sono rappresentati i VIP score (variable influence on projection) dei modelli PLS per la stima delle due variabili con entrambi i set di predittori (spettro medio in figura 2a e iperspettrogrammi in figura 2b).

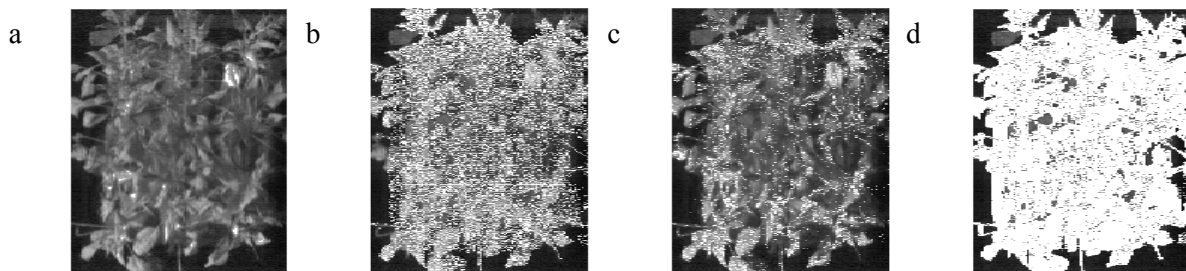
Figura 2- VIP score dei modelli per la stima di contenuto idrico e concentrazione di azoto da spettro medio (a) e da iperspettrogramma (b).



La stima del contenuto idrico ha assegnato maggior peso ai  $\beta$ -coefficienti delle lunghezze d'onda dello spettro del rosso, del red-edge e del vicino infrarosso (NIR) (595-690 e 725-980 nm). La zona dello spettro del NIR ha confermato di essere la maggiormente interessata dagli effetti dello stress idrico [6]. Differentemente accade per il modello di stima basato sugli iperspettrogrammi che rileva lo spettro compreso tra 630 e 680 nm come la zona più informativa della variabilità del contenuto idrico. Questo comportamento è spiegabile dal fatto che lo stress idrico può comunque interessare l'apparato fotosintetico compromettendone l'assorbimento della luce [7].

Infine, la stima legata agli iperspettrogrammi apre la possibilità di sfruttare l'informazione spaziale, la figura 3 ne è un esempio.

*Figura 3- Vaso caratterizzato da livello ridondante di azoto combinato a stress idrico. In bianco sono selezionati i pixel la cui informazione è stata ritenuta rilevante a fini predittivi. Da destra a sinistra le quattro immagini rappresentano: il posizionamento nella PCA degli score della componente 1 (a), degli score della componente 2 (b), dei residui  $q$  (c) e del  $T^2$  di Hotelling (d).*



Infine, estraendo lo spettro medio dei pixel ai quali è stato assegnato un alto VIP score è possibile interpretare il funzionamento del modello. Ad esempio, si può notare che l'informazione legata agli score della seconda componente (figura 3b) e alla statistica  $T^2$  di Hotelling (figura 3d) è la più rilevante.

## Conclusioni

Entrambi i set di predittori, spettro medio e iperspettrogrammi, hanno ottenuto ottimi risultati di stima del contenuto idrico mentre hanno dato risultati ancora non soddisfacenti per la stima della concentrazione di azoto. Questo risultato è attribuibile al maggiore effetto che lo stress idrico ha avuto sulla struttura della canopy rispetto all'effetto che lo stress azotato ha avuto sulla pigmentazione delle foglie. Ulteriori studi dovranno essere fatti per considerare nei modelli predittivi la variabilità indotta dagli stress sulla struttura della canopy.

Le regioni spettrali del red, red-edge sono state individuate come le più informative in entrambe le predizioni confermando un'influenza dello stress idrico sulla clorofilla, che non è influenzata unicamente dallo stato di nutrizione azotata.

Infine la tecnica degli iperspettrogrammi, usata per la prima volta sulla vegetazione, ha avuto successo nella stima delle variabili colturali aprendo nuove possibilità di studio di tale applicazione per le esigenze di monitoraggio ottico iperspettrale in pieno campo.

## Ringraziamenti

Il lavoro è stato svolto nell'ambito del progetto STeP finanziato dal Piano di Sviluppo UNIMI – Linea B 2014.

## Bibliografia

1. Ferrari, C., Foca, G. & Ulrici, A. (2013) *Handling large datasets of hyperspectral images: Reducing data size without loss of useful information*. *Analytica chimica acta* 802, 29–39.
2. Shiratsuchi, L., Ferguson, R., Shanahan, J., Adamchuk, V., Rundquist, D., Marx, D., & Slater, G. (2011). *Water and nitrogen effects on active canopy sensor vegetation indices*. *Agronomy journal*, 103(6), 1815-1826.
3. Barnes, E. M., Clarke, T. R., Richards, S. E., Colaizzi, P. D., Haberland, J., Kostrzewski, M., ... & Lascano, R. J. (2000) *Coincident detection of crop water stress, nitrogen status and canopy density using ground based multispectral data*. In *Proceedings of the 5th International Conference on Precision Agriculture*, Bloomington, MN (pp. 16-19).
4. Stellacci, A. M., Castrignanò, A., Diacono, M., Troccoli, A., Ciccarese, A., Armenise, E., ... & Rubino, P. (2012) *Combined approach based on principal component analysis and canonical discriminant analysis for investigating hyperspectral plant response*. *Italian Journal of Agronomy*, 7(3), 34.
5. Otsu, N. (1975) *A threshold selection method from gray-level histograms*. *Automatica* 11, 23–27.
6. Govender, M., Dye, P. J., Weiersbye, I. M., Witkowski, E. T. F. & Ahmed, F. (2009) *Review of commonly used remote sensing and ground-based technologies to measure plant water stress*. *Water SA* 35, 741–752.
7. Jackson, R. & Ezra, C. E. (1985) *Spectral response of cotton to suddenly induced water stress*. *International Journal of Remote Sensing* 6, 177–185.

## MONITORAGGIO DEL GRADO DI MATURAZIONE DEL TARTUFO BIANCO MEDIANTE SPETTROSCOPIA NIR

L. Mandrile<sup>1,3\*</sup>, R. Balestini<sup>2</sup>, A. Mello<sup>2</sup>, G. Martra<sup>3</sup>, A. M. Rossi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisione di metrologia per la qualità della vita, INRiM, Strada delle Cacce 91, Torino

<sup>2</sup>Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, SS Torino Consiglio Nazionale delle Ricerche, Viale Mattioli, 25  
10125, Torino

<sup>3</sup>Dipartimento di Chimica e Centro Interdipartimentale NIS, Università degli Studi di Torino

\*l.mandrile@inrim.it

### Riassunto

In questo studio è stato monitorato il processo di invecchiamento del tartufo bianco mediante spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR) al fine di valutare la possibilità di risalire al tempo trascorso dalla raccolta e di definire una curva di maturazione del corpo fruttifero. Due corpi fruttiferi di *Tuber magnatum* e tre di *T. borchii* sono stati conservati in frigo a 4°C e monitorati per un periodo di 10 giorni. In quest'arco di tempo il tartufo subisce modificazioni fisiche e chimiche che ne fanno gradualmente variare le proprietà organolettiche e il valore commerciale. Sulla base di studi precedenti, è possibile fornire un'indicazione sul grado di maturazione del tartufo mediante un'analisi di microscopia ottica basata sul conteggio delle ascospore. In questo lavoro, la valutazione ottica è stata correlata agli spettri NIR per ottenere un'indicazione sull'invecchiamento del campione mediante un test rapido e non operatore-dipendente. I dati sono stati acquisiti utilizzando la tecnica di *NIR imaging* per superare le disomogeneità microscopiche del corpo fruttifero. L'informazione ottica e quella chimica vengono fuse in una mappa spettroscopica fornendo l'informazione più completa possibile sul campione. I dati sono stati trattati mediante tecniche di classificazione e regressione multivariata per ottenere le curve di invecchiamento dei tartufi analizzati. Sebbene in questo studio sia stata dimostrata l'idoneità della tecnica, studi futuri volti alla standardizzazione del metodo e alla sua validazione sono tuttora in corso di svolgimento. Il valore economico e l'interesse commerciale del prodotto studiato giustificano gli sforzi della ricerca in questo settore con la finalità di proteggere un'eccellenza territoriale.

### Introduzione

Tra i funghi edibili, i tartufi sono particolarmente apprezzati sul mercato grazie alle loro peculiari caratteristiche organolettiche. Poiché il tartufo rappresenta un'eccellenza del mercato agroalimentare con una ricaduta notevole sull'economia locale dei territori produttori, la protezione del valore commerciale di questo prodotto è di cruciale importanza [1]. Il prezzo del tartufo bianco, il *Tuber magnatum*, si aggira in media sui 3500 €/kg (<http://www.tuber.it/it/borsino-del-tartufo.php>) ed è determinato da tre aspetti fondamentali: il territorio, il mercato e la stagione. Una delle caratteristiche principali del tartufo bianco è la sua scarsa reperibilità: cresce in terreni poveri di humus e vive in simbiosi con pioppi, salici, querce e tigli. La coesistenza delle condizioni territoriali ottimali è piuttosto rara e la coltivazione non fornisce tartufi altrettanto pregiati, la disponibilità è limitata e questo fa crescere il valore economico del prodotto. Inoltre, alcuni fattori stagionali come l'umidità, la variazione della temperatura e l'incidenza delle precipitazioni a ridosso della raccolta, possono incidere in maniera significativa sulla quotazione del tartufo bianco. Dato l'elevato prestigio legato al tartufo bianco, è necessario un costante controllo della filiera al fine di proteggere i produttori e al contempo i consumatori.

Dopo la raccolta, il tartufo dovrebbe essere consumato il più presto possibile poichè le sue proprietà organolettiche decrescono esponenzialmente con il passare dei giorni, così come il suo valore. In letteratura è stato riportato più volte che il periodo di conservazione post-raccolta ha un impatto non trascurabile sulla qualità del tartufo [2],[3].

Il metodo di conservazione consigliato per i tartufi freschi prevede di riporli in frigorifero in barattoli di vetro chiusi per evitare la dispersione dei componenti volatili, responsabili del loro aroma, avvolti singolarmente in panni di carta sostituiti quotidianamente [4] o a contatto con il riso. Quando il tartufo diventa “gommoso” al tatto, ha raggiunto il massimo grado di maturazione ed è prossimo alla marcescenza. Benchè per osservatori esperti sia possibile stimare il grado di maturazione del tartufo, mancano ad oggi metodiche standardizzate per definire analiticamente la *shelf-life* residua del corpo fruttifero. Da un punto di vista analitico, è possibile fornire un’indicazione sul grado di maturazione del tartufo sulla base di un’analisi in microscopia ottica. Con il passaggio dei giorni la gleba si scurisce, gli aschi si sviluppano riducendo lo spazio a disposizione delle ife vegetative e aumenta il numero di spore contenute all’interno di ciascun asco. Da un conteggio degli aschi contenenti spore, rispetto agli aschi vuoti, e dal grado di maturazione delle spore valutato sulla base della loro caratteristica ornamentazione e colore, è possibile fornire un’indicazione analitica del grado di maturazione. Tuttavia, questo metodo presenta numerose criticità correlate principalmente alla soggettività del metodo e alla difficoltà di contare le spore su differenti piani focali della stessa immagine ottica. Per questo motivo è necessario uno studio approfondito finalizzato alla messa a punto di metodiche accurate, ripetibili e non operatore-dipendenti. La valutazione ottica è stata correlata agli spettri NIR per ottenere un’indicazione sull’invecchiamento del campione mediante un *test* rapido e riproducibile. Il fine del lavoro è di fornire un metodo oggettivo e facilmente automatizzabile per il monitoraggio del processo di maturazione del tartufo post-raccolta. Lo studio di NIR *imaging* nasce dalla necessità di accoppiare all’informazione ottica l’informazione chimica racchiusa nei dati spettrali. Lo spettro NIR rappresenta l’inconfondibile impronta molecolare del campione analizzato, e permette di registrare variazioni chimiche e fisiche che avvengono a seguito del naturale processo di maturazione dei corpi fruttiferi. Dopo aver definito le modalità migliori per l’acquisizione dei dati spettrali, 2 campioni di tartufo bianco (*Tuber magnatum*) e 3 di tartufo bianchetto (*T. borchii*) forniti da un produttore di fiducia sono stati utilizzati per la messa a punto e la validazione del metodo, dimostrando l’idoneità della tecnica NIR nella determinazione del grado di maturazione del tartufo.

## Materiali e Metodi

Per questo studio sono stati sottoposti ad analisi NIR *imaging* 2 campioni di tartufo bianco (*Tuber magnatum*) e 3 di tartufo bianchetto (*T. borchii*). Il peridio è stato delicatamente strofinato con un panno di carta asciutto al fine di rimuovere la terra ancora adesa al tubero ma il corpo fruttifero non è stato decorticato. I campioni sono stati conservati in frigorifero a 4°C avvolti in panni di carta sostituiti quotidianamente. L’analisi è stata ripetuta ad intervalli di tempo regolari per un periodo di 10 giorni su tutti i campioni. Per ogni sessione di misura è stata ottenuta una fetta di tartufo di circa un millimetro di spessore usando un bisturi da laboratorio e adagiata su un vetrino esponendo sempre il lato interno verso l’alto. Per evitare l’accartoccamento della fettina durante l’inevitabile essiccamento, le fettine sono fissate al vetrino con del nastro adesivo alle estremità. La precisione del taglio e la regolarità della fetta sottoposta ad analisi è un aspetto cruciale: scalini o variazioni di spessore devono essere evitati per fare in modo che la distanza focale tra campione e sorgente IR sia costante su tutta l’area indagata. Tale operazione diventa sempre più delicata con l’avanzamento della maturazione del corpo fruttifero.

Lo strumento utilizzato per la raccolta dei dati è il banco iN10 Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA) in modalità di *imaging* in riflettanza diffusa. Per lo studio esplorativo iniziale sono stati acquisiti alcuni spettri NIR in riflettanza diffusa su porzioni otticamente omogenee del campione. Per lo studio relativo al grado di maturazione, invece, sono state acquisite 4 mappe NIR su ogni sezione, al fine di garantire la rappresentatività statistica dei dati. Le mappe sono state acquisite su

aree di circa  $2 \text{ mm}^2$  con *step-size* di  $100 \mu\text{m}$  e *spot-size* di  $100 \mu\text{m}$ . Ad ogni *pixel* della mappa corrisponde uno spettro NIR acquisito nella regione spettrale tra  $4000 \text{ cm}^{-1}$  e  $7000 \text{ cm}^{-1}$  ottenuto dopo 64 scansioni.

Gli spettri sono stati processati mediante un pacchetto di chemiometria implementato sulla piattaforma R. Le matrici di dati per l'analisi chemiometrica sono state prodotte mediante un programma auto-codificato che permette di convertire i singoli spettri in una matrice di dati usando il *software* Wolfram Mathematica. I metodi utilizzati sono l'analisi del discriminante lineare (DA) per la classificazione degli spettri acquisiti su tessuti diversi del medesimo corpo fruttifero, e il metodo di regressione dei minimi quadrati parziali (PLS), per definire la correlazione tra la progressiva variazione degli spettri NIR e il tempo trascorso dal momento della raccolta. I modelli chemiometrici ottenuti sono stati tutti validati mediante validazione incrociata interna (CV) in prima battuta e successivamente mediante validazione esterna grazie all'analisi di un nuovo campione ove possibile.

## Risultati e Discussione

La parte interna del tartufo si presenta alla vista come una matrice complessa costituita principalmente da due tessuti che si intersecano dando origine alla gleba del corpo fruttifero, all'interno della quale vi sono gli aschi e le ascospore. Inizialmente sono state eseguite alcune analisi esplorative finalizzate a studiare l'impronta molecolare dei tartufi fornita dagli spettri NIR. In figura 1 sono riportati gli spettri medi rappresentativi delle due diverse regioni facilmente identificabili osservando la sezione di un tartufo bianco, mostrata altresì in figura. Lo spettro NIR può essere descritto sulla base della composizione del tartufo bianco riportata in tabella 1. Come si può notare non sono presenti differenze evidenti dal punto di vista della forma e della numerosità delle bande NIR, tuttavia le mutue intensità dei segnali risultano diverse nelle due zone considerate. Al fine di dimostrare che le disomogeneità tissutali non sono trascurabili, è stato costruito un modello di classificazione mediante la tecnica dell'analisi del discriminante lineare (DA). Da questa prima indagine è emerso che è possibile distinguere nettamente gli spettri acquisiti sulla zona delle ife vegetative, cioè le cellule fungine che risultano chiare sull'immagine, da quelli acquisiti sulle zone scure e puntinate che rappresentano gli aschi con le ascospore al loro interno. Alla luce di questa indagine preliminare è emerso che per ottenere un'informazione rappresentativa dell'intero campione è necessario acquisire una mappa chimica su un'area sufficientemente ampia da includere entrambe le zone, escludendo la possibilità di condurre gli studi successivi sulla base di analisi puntuali sulla superficie del tartufo. In altre parole, dallo studio preliminare riguardante la variabilità degli spettri in funzione dei diversi tessuti biologici che compongono la gleba, è emersa la necessità di condurre le analisi relative al grado di maturazione in modalità di *imaging* per racchiudere l'informazione complessiva di un'area in cui siano rappresentati tutti i tipi di tessuti presenti nel campione. Infatti, se si conducesse un'analisi puntuale (cioè su una superficie di  $150 \mu\text{m}$  di diametro) gran parte dalla variabilità individuata tra spettri acquisiti a gradi di maturazione differenti, sarebbe affetta dal fatto che gli spettri sono acquisiti su regioni della superficie con caratteristiche diverse.

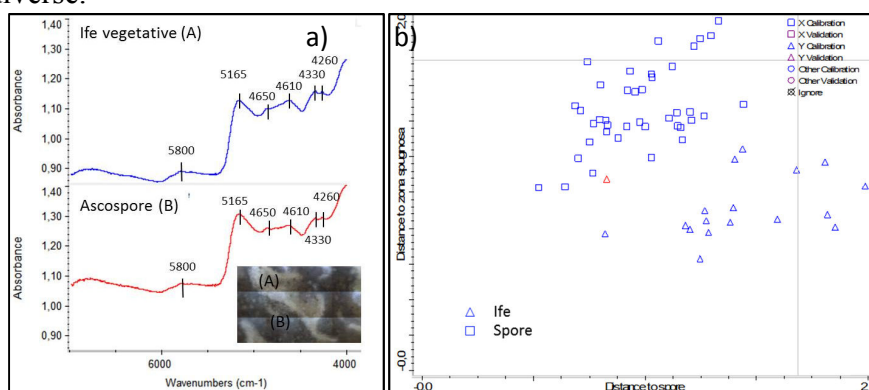


Figura 1- a) Spettro NIR in riflettanza diffusa dei tessuti interni del tartufo bianco con le frequenze dei picchi di assorbimento ( $\text{cm}^{-1}$ ); b) Cooman's plot per la classificazione di spettri NIR delle ascospore e delle ife vegetative

Tabella 1- Composizione nutrizionale del tartufo bianco e assegnazione delle bande ai gruppi funzionali.

Componenti nutritivi	g per 100 g di prodotto [5]	Gruppo funzionale	Numeri d'onda ( $\text{cm}^{-1}$ )
Acqua	82,6	-OH	5165
Proteine	4,1	Bande di combinazione delle amidi	4850 e 4610
Lipidi	2,1	Idrocarburi lineari	5800, 4330 e 4260
Glucidi	0,3	Banda di combinazione di deformazione di -OH	4720

L'analisi di un campione di *T. magnatum* (tartufo bianco) è stata ripetuta a intervalli definiti di tempo per verificare se le modificazioni subite dal corpo fruttifero durante la maturazione potessero essere rivelate e monitorate mediante spettroscopia NIR. In particolare, la misura è stata effettuata al giorno 0, 3, 5, 8, 10 e correlata al tempo trascorso dalla raccolta mediante il metodo di regressione multivariata PLS. In figura 2 sono riportati i *plot* dei dati predetti in funzione di quelli reali. Inizialmente sono stati tenuti in considerazione tutti gli spettri costituenti le mappe NIR (Fig. 2a), poi solo gli spettri relativi alle ife (Fig. 2b) o quelli relativi alle spore (Fig. 2c) selezionati mediante il modello di classificazione precedentemente mostrato. In tutti e tre i casi è possibile individuare una buona correlazione, ma la dispersione dei dati è tale da impedire la costruzione di un modello con la risoluzione temporale necessaria. Il *Root mean square error* (RMSEC) si attesta intorno a 4 per tutti e tre i modelli. La situazione migliora nettamente quando le disomogeneità tissutali vengono annullate utilizzando per la calibrazione gli spettri medi ottenuti da ogni mappa. Poiché la tecnologia NIR *imaging* consente uno *spot-size* di al massimo 150  $\mu\text{m}$ , per simulare uno spettro raccolto su un'area più ampia si mediano tutti gli spettri di una mappa di 2  $\text{mm}^2$ . Calcolando lo spettro medio si ottiene un unico spettro rappresentativo di tutta l'area e il risultato è un'immagine chimica costituita da *pixel* di 2  $\text{mm}^2$ . In questo caso è come se gli spettri per la taratura venissero acquisiti con uno *spot-size* sufficientemente grande da poter apprezzare l'effetto macroscopico delle modificazioni chimico-fisiche del corpo fruttifero e annullare il *bias* dovuto a disomogeneità a livello microscopico. Attraverso questa strategia è stato possibile ridurre nettamente l'RMSEC del modello, il quale risulta in grado di fornire una predizione con un livello di incertezza inferiore a due giorni. Il modello rappresentato in figura 2d è stato validato attraverso un nuovo campione di *T. magnatum* conservato e analizzato nelle medesime condizioni. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 2 con valenza di test validazione esterno del metodo. È possibile affermare, con un buon livello di certezza, che al giorno zero il nuovo tartufo (*T. magnatum* 2) risultava meno maturo del *T. magnatum* 1, come si osserva nelle foto effettuate al microscopio ottico mostrate in figura 3.

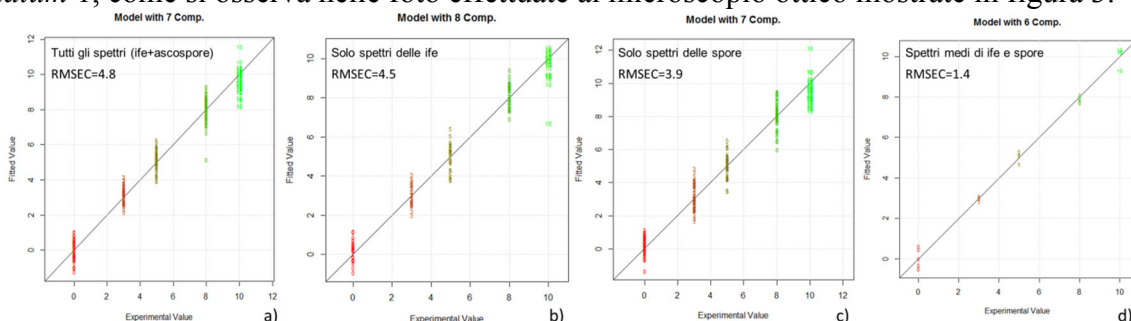


Figura 2- Plot dei modelli PLS ottenuti dalla calibrazione degli spettri di *T. magnatum*. Gli std sono a) tutti gli spettri che compongono la mappa NIR; b) solo gli spettri delle ife estratti dalla mappa NIR; c) solo gli spettri delle ascospore estratti dalla mappa NIR; d) gli spettri medi ottenuti ciascuno da una mappa NIR.



In Figura 3 si può notare, infatti, che al giorno 0, nel primo campione sono presenti meno aschi vuoti rispetto al secondo. Successivamente al periodo di conservazione in frigo di 10 giorni sia le foto ottiche che gli spettri NIR attestano che i due tartufi hanno raggiunto lo stesso grado di maturazione. Risulta però evidente che la taratura NIR ha valore soltanto relativo in assenza di un metodo primario che permetta di definire un grado di maturazione assoluto al momento della raccolta. I risultati riportati dimostrano che le modificazioni chimico-fisiche del campione nel periodo post-raccolta possono essere monitorate mediante spettroscopia NIR, ma una casistica completa di tartufi molto immaturi al momento della raccolta sarebbe necessaria al fine di costruire una curva di taratura completa e affidabile.

Tabella 2 - Grado di maturazione predetto per un nuovo tartufo bianco utilizzando il modello precedentemente calibrato e mostrato in Fig. 2d.

Giorno effettivo di misura	Giorno predetto
0	$-2,0 \pm 0,6$
3	$3,3 \pm 0,7$
5	$10,6 \pm 1,2$
8	$8,4 \pm 0,6$
10	$10,8 \pm 0,8$

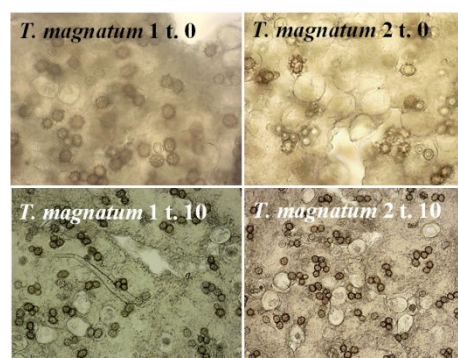


Figura 3- Foto al microscopio ottico si sezioni dei due *T. magnatum* al giorno 0 e al giorno 10. .

Uno studio analogo è stato condotto su tre esemplari di tartufo bianchetto (*T. borchii*). In questo caso è stato definito un grado di maturazione relativo iniziale sulla base delle immagini ottiche acquisite al giorno 0. Osservando la figura 4 si può notare che al momento della raccolta il corpo fruttifero del *T. borchii* 1 era nettamente meno maturo dei tre, il *T. borchii* 2 mostra un grado di maturazione molto avanzato, mentre il *T. borchii* 3 si trovava in una condizione intermedia. Anche in questo caso si è partiti dalla costruzione del modello con gli spettri acquisiti sul *T. borchii* 1 lungo un periodo di 10 giorni. Questo modello parziale è stato utilizzato per determinare lo stato di invecchiamento del *T. borchii* 2. Da questa prima previsione è emerso che *T. borchii* 2 al giorno 0 era già più maturo di quanto lo sarebbe stato *T. borchii* 1 al giorno 10; perciò al giorno 0 di *T. borchii* 2 è stato assegnato grado 12 per la successiva taratura. Gli intervalli di tempo successivi sono stati mantenuti aderenti alle reali tempistiche di analisi. Aggiungendo al set di calibrazione gli spettri del *T. borchii* 2 si ottiene un modello più ampio che viene utilizzato per determinare lo stato di maturazione iniziale del terzo tartufo *T. borchii* 3, il quale, a conferma dell'osservazione ottica, si attesta ad un grado di maturazione iniziale corrispondente al giorno 5.

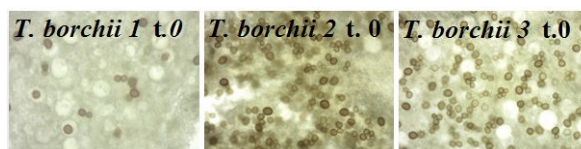


Figura 4- Foto al microscopio ottico di sezioni dei *T. borchii* 1,2,3 acquisite al tempo zero.

Accorpare tutti gli spettri acquisiti sui tre *T. borchii* si ottiene infine un unico modello di regressione che dimostra la possibilità di correlare le modificazioni subite dai corpi fruttiferi nel tempo. In figura 5 è riportato il modello di regressione PLS completo ottenuto con 10 variabili latenti e i risultati dei test di validazione incrociata e test set esterno.

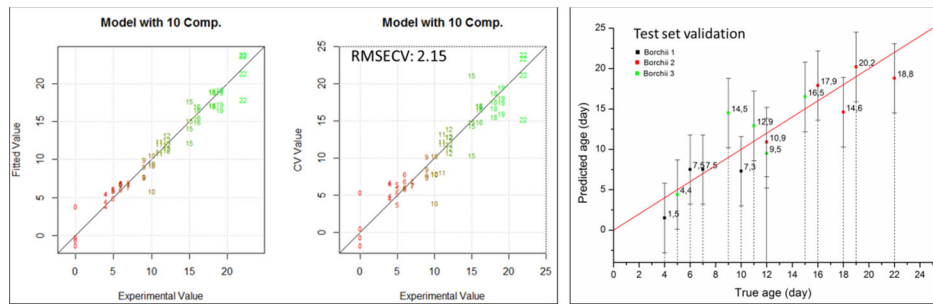


Figura 5- Plot del modello PLS complessivo ottenuto dalla calibrazione degli spettri di *T. borchii* acquisiti lungo un arco temporale di 10 giorni. a) Plot dei fitted values in funzione dei valori veri e plot ottenuto dalla full cross validation; b) Dati ottenuti durante il test set validation con le relative barre di errore.

## Conclusioni

Il metodo ottenuto rappresenta un importante *proof of principle* per la messa a punto di un metodo oggettivo per la determinazione del grado di maturazione del tartufo bianco e bianchetto, tuttavia, allo stato attuale dello studio, questo metodo ha solo valenza relativa. Per ottenere un metodo che possa fornire un dato assoluto del livello di maturazione dei corpi fruttiferi sarebbe necessario un confronto con altre tecniche analitiche che permettano di effettuare la taratura del NIR sulla base di dati numerici noti, come ad esempio la valutazione dell'espressione di geni potenzialmente correlati con la maturazione del corpo fruttifero in esperimenti di RT-*Polymerase chain reaction* quantitativa [3]. Lo sviluppo futuro della metodica proposta rappresenta un argomento di grande interesse in quanto si propone la messa a punto di un metodo per la definizione oggettiva e quantitativa della qualità di un prodotto agroalimentare d'eccellenza.

## Bibliografia

1. A. Mello, C. Murat, P. Bonfante (2006) *Truffles: much more than a prized and local delicacy*. FEMS Microbiol Lett 260:1-8.
2. Y. Sakamoto, K. Nakade, T. Sato (2009) *Characterization of post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinule endodes* fruiting body*. Curr Genet 55:409-423.
3. E. Zampieri, F. Guzzo, M. Commisso, A. Mello, P. Bonfante, R. Balestrini (2014) *Gene expression and metabolite changes during *Tuber magnatum* fruiting body storage*. Curr Gen 60:285-294.
4. R. Saltarelli, P. Ceccaroli, P. Cesari, E. Barbieri, V. Stocchi (2008) *Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species*. Food Chem 109:8-16.
5. <http://www.tuber.it/it/tartufo.php>

## **HYPERSPECTRAL REFLECTANCE SPECTROSCOPY AS RAPID TOOLS FOR BIOTIC AND ABIOTIC STRESS DETECTION ON TWO CROP SPECIES: CEREAL AND BIO-ENERGETIC PLANTS**

Masci D., Bersan D., Blasi L., Borfecchia F., Crino P., De Cecco L., Farneti A., Iantosca D., Micheli C., Correnti A.

*ENEA - Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 ROMA Italia*

### **Riassunto**

Le tecnologie non invasive-distruttive, come quelle basate sulla spettroscopia della riflettanza iperspettrale di prossimità, sono strumenti emergenti nel campo dell'agricoltura di precisione, per affrontare le sue crescenti esigenze di diagnostica tempestiva contro i fattori di stress biotici e abiotici di diverse colture. In questo studio la spettroscopia di riflettanza iperspettrale Vis-NIR-SWIR è stata testata tramite un radiometro ASD FieldSpec-pro portatile, come metodo di screening rapido per monitorare le infezioni da *Fusarium* di sementi di frumento nelle fasi iniziali e la differenziazione nelle risposte spettrali di genotipi di *Cynara cardunculus* var. *altilis* (cardo coltivato), allo stress da salinizzazione dell'acqua di irrigazione. Il diverso grado d'infezione nel grano, è stato conseguito utilizzando diversi lotti di prova di chicchi di grano duro a diversi livelli di concentrazione di contaminazione da micotossine, ottenute per inoculi artificiali con *Fusarium graminearum* a varie diluizioni. Nell'altra attività sperimentale, tre differenti genotipi di cardo coltivato, ottenuti da un programma di miglioramento genetico sviluppato all'ENEA, sono stati fatti crescere in coltura idroponica, in una serra dei campi sperimentali del Centro di Ricerca Casaccia del ENEA. Durante il loro sviluppo vegetativo in soluzione nutritiva a differenti concentrazioni di NaCl. (0, 100, 200 mM), sono stati monitorati i parametri biometrici fogliari, le concentrazioni di pigmenti /CHL e le relative firme spettrali di riflettanza foliare relative ai tre genotipi, in tre diverse fasi di crescita. I risultati preliminari dell'elaborazione delle risposte spettrali nell'intervallo 350-2500 nm, elaborate attraverso varie analisi statistiche (ANOVA,..), hanno mostrato un accordo sufficiente tra le risposte di riflettanza in alcune gamme di frequenza e il livello di infezione di semi di grano. Inoltre una significativa correlazione è stata trovata preliminarmente tra le misure di riflettanza rilevate per le piante di cardo e dei diversi livelli di salinizzazione dell'acqua, per i tre genotipi di utilizzati.

## INDICE DEGLI AUTORI

Alamprese; 44; 137  
 Amigo; 72; 88  
 Amodio; 34; 143  
 Andrighetto; 101; 138  
 Balestini; 149  
 Balzan; 101  
 Barzaghi; 78; 132  
 Battaglia; 11  
 Beghi; 23; 57; 126  
 Benozzo; 50  
 Berardi; 143  
 Bersan; 155  
 Bertone; 29  
 Berzaghi; 50; 56  
 Blasi; 155  
 Bonacini; 42; 43  
 Bonato; 120  
 Borfecchia; 155  
 Brancadoro; 23  
 Bro; 49  
 Buccheri; 35; 115  
 Burud; 63  
 Cabassi; 78; 132; 144  
 Calvini; 65; 72  
 Casale; 30; 95  
 Casiraghi; 44; 64; 71; 137  
 Casolino; 30; 95  
 Cattaneo; 115  
 Cavallero; 30  
 Cavalli; 144  
 Cavallini; 49; 88  
 Ceglie; 34  
 Chaudhry; 34  
 Civelli; 57  
 Cocchi; 42; 49; 88  
 Colelli; 34; 143  
 Corradini; 43  
 Correnti; 155  
 Corti; 144  
 Costa; 83; 120  
 Cremonesi; 78; 132  
 Crino; 155  
 da Silva Friis; 49  
 De Bastiani; 105  
 De Cecco; 155  
 de França Souza; 64  
 de Freitas; 64; 71  
 De Pellegrini; 95  
 Dedenaro; 83  
 Dimitriou; 63  
 Donegà; 110  
 Duca; 89  
 Durante; 88  
 Engelsen; 41  
 Farneti; 155  
 Fasolato; 101  
 Fearn; 10  
 Ferragina; 50  
 Ferrari; 110  
 Foca; 65  
 Foppa Pedretti; 89  
 Garbin; 101; 138  
 Geobaldo; 29  
 Gerardi; 138  
 Giovenzana; 23; 57; 126  
 Giraud; 29  
 Gowen; 115  
 Grassi M.; 35; 115  
 Grassi S.; 44; 71; 137  
 Guidetti; 23; 57; 126  
 Iantosca; 155  
 Ilari; 89  
 Larenas Uria; 83  
 Li Vigni; 88  
 Lovati; 35  
 Malavasi; 110  
 Malegori; 64; 71  
 Mamolini; 105  
 Mancini; 89  
 Mandrile; 149  
 Mantovani; 42; 43  
 Marchesini; 101; 138  
 Marchetti; 11; 105; 110  
 Marini; 42; 45  
 Marino Gallina; 144  
 Marinoni; 78; 132  
 Marquez; 64; 71  
 Martra; 149  
 Masci; 155  
 Mello; 149  
 Mengarelli; 89  
 Meucci; 132  
 Micheli; 155  
 Michelini; 78  
 Mirisola; 101; 138  
 Nocetti; 78  
 Novelli; 101  
 Oberti; 57  
 Oliveri; 30; 95  
 Orlandi; 65

Paolini; 17  
Pasquini; 64  
Pedrini; 83; 110; 120  
Piazzolla; 34  
Pimentel; 64  
Pizzi; 89  
Pricca; 132  
Pu; 115  
Ricci; 143  
Rinnan; 89  
Rizzi; 88  
Rizzolo; 35; 36  
Rossi; 149  
Rossini; 89  
Sadar; 35  
Salvatori; 95  
Sandak\_A.; 63  
Sandak J.; 63  
Savorani; 29

Segato; 101; 138  
Serva; 101; 138  
Sitta; 30  
Spinelli; 35  
Strani; 42  
Stroppa; 132  
Suma; 11  
Tagliati; 120  
Tamburini; 11; 83; 105; 110; 120  
Tartacca; 95  
Tenti; 101; 138  
Torricelli; 35  
Toscano; 89  
Toselli; 30  
Ulrici; 65; 72  
Vanoli; 35  
Zanella; 35  
Zotti; 30