UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NEL MEDIO INFRAROSSO PER LO SCREENING DI ADULTERANTI NEL LATTE

Relatore
Ch.mo Prof. De Marchi Massimo

Correlatore
Dott.ssa Vigolo Vania

Laureando
Tosetto Enrico
Matricola n. 1192179

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

INDICE

RIASSUNTO ..... **III**

ABSTRACT ..... **V**

1. INTRODUZIONE **1**

1.1. IL LATTE 1

1.1.1. La qualità del latte *1*

1.1.2. Latte conforme *4*

1.1.3. Parametri igienico-sanitari *5*

1.1.4. Sistemi di pagamento *6*

1.2. ADULTERAZIONE DEL LATTE 8

1.2.1. Definizione e problematiche *8*

1.2.2. Comuni pratiche fraudolente *10*

1.2.3. Tecniche di rilevazione *11*

1.3. LA SPETTROSCOPIA INFRAROSSO 12

1.3.1. Aspetti generali e applicazioni *12*

1.3.2. Principi chimico-fisici *13*

1.3.3. NIRS e MIRS *16*

1.3.4. Screening di adulteranti *20*

2. OBIETTIVO DELL'ELABORATO **23**

3. MATERIALI E METODI **25**

3.1. RACCOLTA E PREPARAZIONE CAMPIONI 25

3.2. ANALISI CAMPIONI 26

3.3. ANALISI STATISTICA 27

4. RISULTATI E DISCUSSIONE **30**

4.1. STATISTICHE DESCRITTIVE 30

4.2. EFFETTO DEI DIVERSI ADULTERANTI SULLA COMPOSIZIONE DEL LATTE 32

4.3. MODELLI DI PREDIZIONE 38

5. CONCLUSIONI **43**

6. BIBLIOGRAFIA **45**

7. RINGRAZIAMENTI **57**

RIASSUNTO

L'aggiunta di adulteranti nel latte motivata da interessi economici è una pratica da scongiurare attraverso adeguati metodi di controllo. I progressi nella tecnologia infrarosso, già comunemente impiegata nel settore lattiero-caseario e implementata nel sistema di pagamento latte-qualità, hanno reso questa tecnica un valido strumento per la determinazione dell'autenticità dei prodotti alimentari.

Questo elaborato pone due obiettivi:

- studiare l'effetto di diversi adulteranti sulla predizione nel medio-infrarosso a trasformata di Fourier (FT-MIR) dei parametri qualitativi del latte;
- valutare la capacità della spettroscopia FT-MIR di rilevare la presenza di sostanze adulteranti nel latte di massa a diversi livelli di contaminazione.

Sono stati raccolti 100 campioni di latte bovino crudo di massa e ciascun campione è stato addizionato con 3 diversi livelli di concentrazione di 7 adulteranti presi in esame: acqua, urea, sodio citrato, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio, idrossiprolina e glucosio.

L'analisi infrarosso e la raccolta degli spettri sono state effettuate con lo strumento MilkoScan FT3 (Foss Analytical A/S, Hillerød, Denmark) presso due laboratori.

L'effetto di ciascun adulterante sulla predizione FT-MIR delle diverse componenti del latte è stato valutato attraverso l'applicazione della procedura GLM (*generalized linear model*) del software SAS (v. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Per rilevare la presenza di adulteranti sono stati sviluppati dei modelli di predizione utilizzando la procedura PLS (*Partial Least Squares*) Regression module della libreria scikit-learn del software Python.

I risultati ottenuti da tale studio dimostrano che gli adulteranti presi in esame hanno determinato un impatto notevole su diversi parametri qualitativi del latte ottenuti attraverso spettroscopia FT-MIR, cambiamenti significativi si sono osservati a partire dai livelli di adulterazione più bassi per diversi parametri compositivi considerati. Dall'analisi discriminante emerge la capacità del modello utilizzato di identificare correttamente l'adulterazione con urea, acqua, sodio citrato, cloruro di sodio e bicarbonato di sodio per concentrazioni pari a 0.025%, 6.4%, 0.038%, 0.075%, 0.020%, rispettivamente. Risultati soddisfacenti sono stati ottenuti nella rilevazione di campioni adulterati con glucosio mentre i risultati peggiori si sono registrati per l'idrossiprolina.

ABSTRACT

Economically motivated adulteration in milk represents a practice that should be avoided through adequate control methods. Infrared technology is already commonly used in dairy industry and employed in payment system based on milk quality. Advances in this technique have made it a powerful tool for determining food authenticity.

This study had two objectives:

- studying the effect of each adulterant on FT-MIR (Fourier Transform mid-infrared) predicted milk components;
- evaluating the ability of FT-MIR spectroscopy to detect adulterants in bulk milk for different levels of contamination.

One hundred samples of bulk bovine milk were collected between March and April 2022 in one of the largest dairy companies in north-eastern Italy. Each sample was spiked with 3 different levels of concentration of 7 adulterants: water, urea, sodium citrate, sodium chloride, sodium bicarbonate, hydroxyproline and glucose.

Infrared analysis and the collection of spectra were obtained using two different MilkoScan FT3 instruments (Foss Analytical A/S, Hillerød, Denmark), one located at the Department of Agronomy, Food, Natural resources, Animals and Environment (DAFNAE) of the University of Padua (Legnaro, Padua), and the second located at the production site.

The effects of each adulterant on milk components, predicted using FT-MIR, were assessed using the generalized linear model procedure in SAS software (v. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A prediction model for the presence of adulterants was developed using PLS (Partial Least Squares) Regression module of the Python scikit-learn library.

The results of this study demonstrate that the tested adulterants had a notable impact on the predicted milk quality parameters using FT-MIR. Significant changes were observed even at the lowest adulteration levels for various milk components. The outcomes of the discriminant analysis indicate that the employed model was able to correctly identify adulterations with urea, water, sodium citrate, sodium chloride and sodium bicarbonate at concentrations of 0.025%, 6.4%, 0.038%, 0.075%, 0.020%, respectively. Satisfactory results were obtained for the detection of adulterated samples with glucose, while poorer results were obtained for hydroxyproline detection.

1. INTRODUZIONE

1.1. IL LATTE

1.1.1. La qualità del latte

Per qualità del latte si fa comunemente riferimento alla composizione chimica dello stesso (parametri quali grasso, proteina, lattosio o densità) (Mwendia et al., 2018) e alle sue proprietà microbiologiche (presenza di patogeni e indicatori di igiene) (Opiyo et al., 2013) ma è un concetto in continua espansione considerando una serie di aspetti quali la salute e il benessere animale o la sostenibilità ambientale (Özkan Gülzari et al., 2020). Si tratta di un aspetto fondamentale della produzione lattiero-casearia in quanto influisce sulla lavorazione del latte, sulle sue proprietà tecnologiche e quindi sull'efficienza economica (Barbano et al., 2006).

Il latte è composto principalmente da acqua (87.7% circa) e dalla sostanza secca che ne determina il valore nutritivo, i principali componenti di tale frazione sono il lattosio (5%), i lipidi (3.5%), le proteine (3,1%) e le sostanze minerali (Bittante et al., 2005).

Le proteine rappresentano la componente di maggior valore nel latte, sia in termini nutrizionali che economici. In particolare, si distinguono due principali famiglie di proteine: sieroproteine (circa 20%) e caseine (circa 80%). Queste ultime sono di particolare interesse nell'industria lattiero-casearia in quanto maggiori responsabili della trasformazione casearia, assieme alla componente grassa (Bittante et al., 2005). Le caseine sono un gruppo di fosfoproteine che precipitano per azione del caglio o per acidificazione del latte a pH 4.6 (Cabras & Martelli, 2004), si possono distinguere diverse frazioni di caseine tra cui, le più importanti, sono la α_{s1}-caseina, la β-caseina, la α_{s2}-caseina e la κ-caseina. Quest'ultima assume particolare importanza per quanto riguarda la rapidità di formazione del coagulo di latte e la sua resistenza condizionando quindi l'efficienza dell'intero processo di caseificazione. Dalle caseine si distinguono le sieroproteine, le quali rimangono in dispersione nel siero ovvero quella componente liquida che si ottiene dalla produzione del formaggio (Bittante et al., 2005).

Si definisce, in particolare, la resa casearia come la quantità (in kg) di formaggio che si ottiene da 100 kg di latte (Skeie, 2007). Rappresenta uno dei parametri tecnologici di maggior interesse (Cipolat-Gotet et al., 2013) essendo un fattore chiave nell'economia e nella redditività delle industrie lattiero-casearie. La resa, il recupero delle singole componenti del latte nella cagliata e la loro perdita nel siero sono, infatti, parametri che definiscono l'efficienza dell'intero processo di caseificazione (McSweeney, 2007). Oltre al contenuto proteico, un altro fattore determinante nella resa in formaggio è il contenuto di grasso (Banks et al., 1981): la frazione lipidica nel latte, composta principalmente da trigliceridi e da componenti minori come fosfolipidi, steroli e acidi grassi liberi, influenza in modo

significativo la viscosità, consistenza e odore di diversi prodotti lattiero-caseari. In particolare, un adeguato equilibrio tra la frazione grassa e proteica risulta fondamentale per la corretta struttura del formaggio (Cortez et al., 2022). Si può affermare, pertanto, che la quantità di formaggio ottenibile varia in relazione diretta al contenuto di caseina nel latte ed è correlata al rapporto tra grasso e proteina (Abd El-Gawad M.A.M., Ahmed N.S., 2011).

Alcune modifiche nella proporzione tra le diverse sostanze che definiscono la composizione del latte possono portare a complicazioni che possono variare dalla diminuzione della resa casearia all'impossibilità di processare il latte (Cortez et al., 2022), è quindi fondamentale per i produttori monitorare costantemente il latte ricevuto per assicurarsi di utilizzare latte crudo di elevata qualità (Murphy et al., 2016).

La qualità e la resa casearia sono quindi direttamente correlate alla composizione del latte. Sono però diversi i fattori che possono causare variazioni nella composizione, si considerano caratteristiche genetiche (specie e razza), fisiologiche (stadio di lattazione, gravidanza, età e nutrizione), fattori ambientali come la temperatura, salute (malattie della mammella) e una serie di fattori associati al processo di mungitura (numero di mungiture giornaliere e intervallo tra esse, pratiche generali di manipolazione) (Cortez et al., 2022).

Per ottenere prodotti lattiero-caseari di alta qualità, i produttori richiedono ai fornitori latte crudo con elevati standard qualitativi che può essere definito nei seguenti aspetti: (1) la composizione deve essere completa (per esempio valori di grasso e proteina entro i limiti di legge), (2) il latte non deve avere odori sgradevoli, (3) deve essere privo di residui di farmaci rilevabili, di acqua aggiunta o di altri adulteranti, (4) carica batterica bassa, (5) ridotto valore di cellule somatiche (Murphy et al., 2016). Nello specifico, i parametri qualitativi di maggior interesse per le industrie lattiero-casearie sono dati dalle cellule somatiche, dalla carica batterica e da parametri chimico-fisici quali proteina, grasso e lattosio in quanto rappresentano delle variabili che influenzano direttamente la resa dei prodotti derivati (Geary et al., 2014; Meneghini et al., 2016; More, 2009; Murphy et al., 2016).

Gli interventi mirati a migliorare la qualità del latte possono coprire una serie di fattori quali i sistemi produttivi (Abin et al., 2018), l'allevamento (Ahmed et al., 2017), le pratiche igieniche (Gran et al., 2002) e la manipolazione del latte lungo la catena del valore (Ngasala et al., 2015); questo è un aspetto di grande importanza in quanto la qualità non solo può essere quantificata o valutata ma anche ipotizzata come risultato di tali interventi (Özkan Gülzari et al., 2020).

Nella produzione di latte di qualità è necessario considerare aspetti legati alla salute e al benessere animale, all'igiene del processo di mungitura, all'alimentazione, alla gestione socioeconomica e aspetti ambientali (Cortez et al., 2022).

In particolare, la mungitura è una fase del processo produttivo che influenza direttamente la qualità del latte considerando la possibilità di contaminazioni fisiche, chimiche e biologiche che possono avvenire. La scorretta manipolazione durante tale processo, la scarsa igiene, la pulizia inadeguata di attrezzature e strumenti, un elevato tasso di mastiti, lo stoccaggio e il trasporto refrigerato inefficienti o inesistenti sono tutti elementi che contribuiscono ad un elevato tasso di cellule batteriche e somatiche nel latte rappresentando un rischio per la salute pubblica e perdite economiche per i produttori e per l'industria lattiero-casearia. Pratiche quali la pulizia dei locali e delle attrezzature e l'igiene del personale permettono infatti di ridurre le contaminazioni del latte, altre azioni come la disinfezione dei capezzoli prima e dopo la mungitura permettono non solo di limitare la diffusione microbica ma anche ridurre l'incidenza di mastite (Cortez et al., 2022). Si tratta di un'infiammazione della ghiandola mammaria spesso causata da un'infezione batterica (Murphy et al., 2016) ed è una delle patologie più diffuse negli allevamenti di vacche da latte, specialmente quelli caratterizzati da elevate produzioni (Bittante et al., 2005), determinando una riduzione della produzione di latte (Le Maréchal et al., 2011), effetti dannosi nella composizione e nella capacità di caseificazione (Geary et al., 2012; Summer et al., 2015) e una riduzione della vita produttiva delle bovine colpite (Bobbo et al., 2017; van Soest et al., 2016). Le varie forme di mastite sono da ricollegarsi proprio ad errori durante la mungitura (impianti difettosi, tecniche inadeguate di mungitura), ad un'insufficiente igiene e a lesioni della mammella e dei capezzoli così da permettere la penetrazione di agenti patogeni all'interno dell'apparato secernente (Bittante et al., 2005); pertanto, attraverso una serie di strategie per migliorare le pratiche igieniche in mungitura si è in grado di limitare o prevenire le contaminazioni e ottenere un latte di migliore qualità (Özkan Gülzari et al., 2020).

Anche la salute animale è un aspetto cruciale per la qualità del latte. Fondamentale infatti è lo sviluppo di un corretto programma di gestione sanitaria preventiva che prevede la segregazione di animali malati, le vaccinazioni e il controllo delle malattie infettive e contagiose; inoltre, tale programma deve includere pratiche volte al controllo di malattie parassitarie, mastiti, brucellosi, tubercolosi e zoonosi. Anche la nutrizione animale gioca un ruolo importante influenzando direttamente le prestazioni riproduttive delle bovine e la composizione del latte, ed è inoltre necessario garantire il benessere animale evitando una serie di stress che possono essere causati da diversi fattori. Salute, benessere e nutrizione rappresentano pertanto dei fattori che influiscono notevolmente nella qualità del latte.

La buona qualità del latte dipende anche dall'allevamento e dai locali. È essenziale fornire un ambiente pulito, asciutto e ventilato, eseguire la lotta contro i parassiti e gestire correttamente lo scarico dei residui dalle attività correlate all'allevamento. Anche le fasi di refrigerazione e conservazione del latte dopo la mungitura risultano cruciali al fine di garantirne la qualità microbiologica.

Inoltre, l'applicazione di buone pratiche igieniche lungo tutta la filiera produttiva è fondamentale per ottenere un latte idoneo alla lavorazione e trasformazione industriale, con una composizione adeguata e una minima contaminazione, secondo determinati standard qualitativi (Cortez et al., 2022).

1.1.2. Latte conforme

Per latte conforme si intende quel latte che viene prodotto in conformità con le regole igieniche di produzione e che possiede i parametri qualitativi minimi definiti dal D.P.R. 14/1/97 n.57 ovvero il "Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/47 CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e prodotti a base di latte". Ai sensi del decreto, il latte vaccino destinato al consumo umano e alla produzione di prodotti alimentari, deve rispettare una serie di parametri chimico-fisici e compositivi di seguito descritti:

- punto di congelamento (*FP: freezing point*) ≤ -0,520°C
- densità a 20°C ≥ 1028 g/L
- contenuto proteico (N x 6,38) ≥ 28 g/L
- contenuto in residuo secco magro ≥ 8,50 % (w/w)

Inoltre, il latte crudo vaccino, al momento della raccolta presso l'azienda di produzione, deve rispettare i seguenti requisiti, sia destinato al trattamento per uso come latte alimentare che alla trasformazione in derivati:

- tenore in germi a 30°C (ufc/mL) ≤ 100.000
- cellule somatiche per mL ≤ 400.000

Sono consentite deroghe a questi limiti solo per latte destinato alla produzione di formaggi che richiedono un periodo di maturazione di almeno sessanta giorni (Cabras & Martelli, 2004).

I principali parametri che vengono valutati per stabilire la qualità del latte sono la percentuale di grasso, il residuo secco magro, il contenuto proteico e il punto di congelamento. Un'eventuale adulterazione prevede l'aggiunta di sostanze adulteranti nel latte che determinano un incremento di tali parametri aumentandone la qualità in modo disonesto (Azad & Ahmed, 2016). Per tale motivo, nell'industria alimentare, è necessario un monitoraggio continuo della qualità dei prodotti per garantirne l'autenticità, in particolare attraverso tecniche sofisticate e standardizzate (Danezis et al., 2016; Rodriguez-Saona et al., 2016).

1.1.3. Parametri igienico-sanitari

Il valore igienico-sanitario del latte è determinato dalle concentrazioni di batteri e di cellule somatiche che rappresentano parametri di grande importanza in quanto influenzano la conservabilità e i processi tecnologici di trasformazione del latte e dei suoi derivati (Bittante et al., 2005), infatti i controlli di qualità del latte crudo che più spesso vengono considerati in relazione ad un potenziale effetto sul prodotto trasformato riguardano proprio la carica batterica totale (*TBC: Total Bacterial Count*) e la conta delle cellule somatiche (*SCC: Somatic Cells Count*) (Murphy et al., 2016).

Per cellule somatiche si intendono sia i leucociti (globuli bianchi) sia le cellule che derivano dagli sfaldamenti epiteliali e un valore elevato di tale parametro nel latte è generalmente considerato un segnale dell'insorgenza di mastite. Infatti, nelle bovine affette da questa patologia, affluiscono elevate quantità di leucociti nel quarto di mammella sofferente e ciò comporta chiaramente un aumento di cellule somatiche nel latte (Bittante et al., 2005).

Generalmente un valore di cellule somatiche intorno a 70.000 cellule/mL viene considerato medio per un latte da bovine non infette mentre valori tra 200.000 e 250.000 cellule/mL sono spesso indicatori di infezione (Schukken, 2007).

Un latte con una quantità eccessiva di cellule somatiche o addirittura definito mastitico presenta caratteristiche alterate e non risulta idoneo alla caseificazione (Bittante et al., 2005), infatti valori elevati di SCC ma anche di TBC si associano ad una forte attività enzimatica che danneggia componenti del latte e potenzialmente conduce a difetti nel prodotto finito (Murphy et al., 2016).

Pertanto, il valore di cellule somatiche, oltre a determinare se il latte del produttore è conforme ai limiti di legge, viene utilizzato di routine come indicatore di salute della mammella ma soprattutto come indicatore di qualità proprio perché influenza direttamente la composizione e la resa del latte (Murphy et al., 2016). La determinazione di SCC, quindi, ha una duplice utilità in quanto da una parte

permette di fornire indicazioni sullo stato sanitario e produttivo dell'animale, dall'altro permette una migliore definizione dell'attitudine casearia del latte (Bittante et al., 2005).

Un latte crudo che presenta un ridotto contenuto di cellule somatiche permette di ottenere dei prodotti lattiero-caseari di elevata qualità e una maggiore resa in formaggio, si stima infatti che valori già superiori a 100.000 cellule somatiche/mL possano ridurne la resa (Murphy et al., 2016).

È inoltre importante sottolineare che, dal punto di vista della salute pubblica, il latte con un alto contenuto di cellule somatiche è correlato ad un elevato tasso di mastite che aumenta il rischio della presenza di residui di antibiotici nel latte rappresentando anche una perdita economica per il produttore (van Schaik et al., 2002).

Per quanto concerne la carica batterica, si possono manifestare difetti nel latte crudo e nei prodotti lattiero-caseari quando il numero di batteri è piuttosto alto (si considerano infatti concentrazioni superiori a 1.000.000 cfu/mL). Nonostante tale concentrazione stia ad indicare un effetto diretto sulla qualità dei prodotti, il valore limite di carica batterica al momento della lavorazione è di 300.000 cfu/mL (Murphy et al., 2016) e contenuti superiori indicano una cattiva igienicità del processo produttivo (Bittante et al., 2005).

Tali difetti sono dovuti ad una elevata attività enzimatica e sono il risultato di diverse attività fermentative, proteolitiche o lipolitiche (Murphy et al., 2016). Nello specifico, si possono considerare due gruppi batterici con effetti negativi ovvero i clostridi e i coliformi responsabili, rispettivamente, di gonfiore tardivo e precoce, due difetti che si possono osservare nei formaggi (Bittante et al., 2005).

1.1.4. Sistemi di pagamento

Le industrie del settore lattiero-caseario a livello mondiale hanno istituto dei programmi che prevedono premi e penalità in modo tale da incentivare i produttori a migliorare la qualità del latte (Nightingale et al., 2008; Schukken et al., 1992a, 1992b).

La maggior parte di tali programmi si basa proprio sulla qualità del latte crudo raccolto, in particolare si considerano parametri quali la carica batterica e le cellule somatiche ma si fa anche riferimento alla composizione del latte (come la percentuale di proteina, grasso e contenuto di sostanze solide non grasse) (Dekkers et al., 1996; Draaiyer et al., 2009). Si può affermare che gli incentivi monetari offerti ai produttori possano incoraggiarli a migliorare diversi parametri qualitativi del latte, non solo quelli correlati alla salute della mammella e alle procedure igieniche (cellule somatiche e carica batterica, rispettivamente) ma anche la composizione stessa del latte (Botaro et al., 2013).

Nonostante il motivo per offrire premi monetari possa essere quello di incoraggiare e remunerare correttamente i produttori per i loro sforzi, per i trasformatori la logica consiste nel pagare di più per un latte di elevata qualità che consente una lavorazione più efficiente come ritorno del loro investimento. L'utilizzo di latte di alta qualità consente infatti una certa flessibilità nella manipolazione del latte crudo garantendo una maggiore efficienza (Murphy et al., 2016).

A livello nazionale, a partire dagli anni Ottanta, sono stati realizzati una serie di interventi pubblici finalizzati al miglioramento della qualità del latte ed è grazie a tali iniziative che sono state poste le basi, in modo diretto o indiretto, affinché il mercato del latte potesse evolvere da una situazione in cui il prezzo era unico e indifferenziato ad una realtà in cui il prezzo dovesse tener conto anche della qualità. Oggi si utilizzano schemi di pagamento a qualità del latte che risultano molto differenziati ma quei parametri che compaiono nella quasi totalità degli schemi di pagamento e che sono di maggior interesse sono: (1) percentuale di grasso, (2) percentuale di proteina, (3) conta delle cellule somatiche, (4) carica microbica e (5) presenza di sostanze inibenti.

I tenori di grasso e proteina influenzano direttamente la resa casearia in burro e formaggio oltre a condizionare anche i parametri tecnologici della coagulazione del latte e la qualità dei formaggi che ne derivano. La loro influenza sul prezzo spesso si può stabilire attraverso premi (maggiorazioni di prezzo) e penalità (diminuzioni di prezzo) che saranno tanto maggiori quanto più il latte presenta tenori di grasso e proteina superiori o inferiori rispetto ad un valore medio di riferimento. È importante sottolineare che la percentuale di proteina presenta un'incidenza superiore sul prezzo rispetto a quella di grasso data la maggiore importanza economica della produzione di formaggio rispetto a quella del burro. Un'alternativa ad uno schema di pagamento di questo tipo consiste nel sostituire il contenuto proteico con la frazione caseinica, la quale è direttamente correlata con la resa casearia.

Le cellule somatiche e la carica batterica rappresentano i principali indicatori igienico-sanitari del latte riflettendo direttamente l'incidenza delle mastiti e il livello di pulizia delle bovine, delle attrezzature utilizzate per la mungitura ma anche le condizioni di conservazione e trasporto del latte. Anche per questi parametri si definiscono delle fasce neutre con una scala di premi e penalizzazioni per il latte che presenta valori inferiori o superiori rispettivamente.

Altro parametro di grande importanza al fine del pagamento del latte secondo la qualità è la presenza di sostanze inibenti l'attività microbica che possono riguardare residui di antibiotici o detergenti. La presenza di inibenti è piuttosto grave poiché rappresenta da un lato un problema di salubrità del latte costituendo un inquinamento con sostanze potenzialmente dannose per la salute umana, dall'altro un problema di qualità delle produzioni in quanto tali sostanze possono dare alterazioni in fase di trasformazione (Bittante et al., 2005).

Inoltre, nella maggior parte dei casi, è necessario soddisfare alcuni criteri di test aggiuntivi, ad esempio un accettabile punto di congelamento del latte (Murphy et al., 2016), parametro che permette anche un controllo della genuinità escludendo un'eventuale frode alimentare come l'annacquamento (Cabras & Martelli, 2004).

La qualità del latte crudo può quindi influenzare la produzione dei prodotti lattiero-caseari, la loro resa, qualità e sicurezza. Tale considerazione ha portato all'utilizzo di limiti normativi e di un sistema a premi e penalità basato sulla qualità per richiedere e incoraggiare, rispettivamente, la produzione di latte crudo di qualità che facilita la produzione efficiente di prodotti finiti con elevati standard qualitativi (Murphy et al., 2016).

1.2. ADULTERAZIONE DEL LATTE

1.2.1. Definizione e problematiche

L'adulterazione è una frode alimentare che viene descritta come una pratica illegale ingannevole di un prodotto alimentare con il fine di ottenere un guadagno economico (Spink et al., 2016). Una frode rappresenta un rischio alimentare che sta guadagnando riconoscimento e preoccupazione in tutto il mondo poiché può indicare una minaccia per la salute umana (Spink & Moyer, 2011); è il caso particolare dell'adulterazione motivata da interesse economico (*EMA: economically motivated adulteration*) che consiste nell'aggiunta di sostanze di basso valore ad un prodotto alimentare determinando non solo una problematica di natura economica ma anche un rischio per la salute dei consumatori (Sharma & Paradakar, 2010). La FDA (*Food and Drug Administration*) definisce EMA come "l'aggiunta o sostituzione fraudolenta di una sostanza in un prodotto alimentare per aumentarne il valore apparente o ridurne il costo di produzione per ottenerne quindi un guadagno economico" (Poonia et al., 2017).

Nel caso specifico del latte, questo viene considerato come "ideal food" in quanto ricco di nutrienti fondamentali sia per gli adulti che per lo sviluppo dei bambini (Azad & Ahmed, 2016), è facilmente digeribile e quindi prontamente assorbito, inoltre le proteine del latte forniscono amminoacidi essenziali per la corretta crescita di neonati e adulti (Afzal et al., 2011). Proprio a causa dell'elevato valore nutritivo, la produzione e il consumo di latte sono aumentati a livello globale, specialmente nei Paesi in via di sviluppo, rendendolo un bersaglio costante di pratiche fraudolente come l'adulterazione (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO). Il latte risulta essere

un prodotto molto facile da adulterare (Kamthania et al., 2014) ed è tra gli alimenti più coinvolti ad adulterazione al mondo (Cavin et al., 2016; Moore et al., 2012) rappresentando la principale problematica per il settore lattiero-caseario (De La Fuente & Juárez, 2005).

Per adulterazione del latte si può considerare una pratica intenzionale che ne riduce la qualità mediante l'aggiunta o la sostituzione di sostanze di basso valore o la rimozione di componenti di alto valore. L'atto è intenzionale con il fine di ottenere un guadagno economico ma talvolta può essere anche involontario come l'ingresso di antibiotici nel latte di bovine trattate per mastite o ancora particelle o corpi estranei che possono derivare dai processi. Il latte, se adulterato quindi, si caratterizza per una qualità inferiore e ciò comporta non solo un onere economico per il consumatore ma potenzialmente un pericolo per la sua salute (Poonia et al., 2017).

Pratiche fraudolente vengono commesse principalmente per un motivo puramente economico (Ellis et al., 2012; Singh & Gandhi, 2015) ma si possono citare altre ragioni quali la natura deperibile del latte, la mancanza di adeguati test di rilevamento (Kamthania et al., 2014) e l'inadeguatezza o carenza di forniture per una popolazione crescente. La situazione è inoltre notevolmente peggiorata nei Paesi sottosviluppati e in via di sviluppo proprio a causa dell'assenza di un corretto sistema di monitoraggio e la mancanza di un'adeguata applicazione della legge (Azad & Ahmed, 2016).

Il consumo di latte e prodotti lattiero-caseari riveste un ruolo fondamentale nell'industria alimentare (Dankowska et al., 2015; L. da C. Luiz et al., 2018) ma allo stesso tempo, nell'ultimo decennio, l'autenticità di questi prodotti è diventata un problema cruciale da quando sono stati scoperti diversi casi di adulterazione (Lohumi et al., 2015). Inoltre, considerando che il latte rappresenta un'importante materia prima per tutta l'industria alimentare, si possono avere degli effetti cumulativi nei prodotti derivati, pertanto, si ha una domanda crescente di rigorose valutazioni circa l'autenticità del prodotto (C. F. Nascimento et al., 2017).

Una frode quindi non solo genera un prodotto con problemi di qualità ma potenzialmente può anche rappresentare una minaccia per la salute dei consumatori (Danezis et al., 2016; Lohumi et al., 2015), risulta pertanto fondamentale determinare la qualità e l'autenticità dei prodotti alimentari per la soddisfazione del consumatore finale, dei produttori e per le autorità di controllo (Hruzikova et al., 2012).

1.2.2. Comuni pratiche fraudolente

L'adulterazione di latte e prodotti lattiero-caseari è diventata una preoccupazione a livello globale con il drammatico caso di contaminazione da melamina avvenuta in Cina nel 2008 (Xin & Stone, 2008). L'aggiunta di tale sostanza nel latte artificiale e in altri prodotti lattiero-caseari ha causato la morte di bambini e neonati (EFSA 2008) ponendo particolare attenzione a tale problematica e considerando gli effetti devastanti che persistono ancora a distanza di diversi anni (Li et al., 2019). Questo caso non ha solo evidenziato le pratiche scorrette del settore lattiero-caseario (Kendall et al., 2019) ma anche come l'adulterazione può introdurre pericoli e mettere fortemente a rischio la sicurezza alimentare (Moore et al., 2012). Il drammatico episodio del 2008 non è sicuramente un caso isolato: nel 2007, infatti, campioni di frumento mescolati con melamina, presumibilmente per aumentarne l'apparente contenuto proteico, sono stati rintracciati in diversi alimenti destinati ad animali di molte aziende statunitensi ma anche nell'approvvigionamento umano (Poonia et al., 2017).

Il caso più semplice di adulterazione del latte consiste nell'aggiunta di acqua per aumentarne il volume ma al giorno d'oggi si riportano casi sempre più sofisticati di frodi e sempre più difficili da rilevare (C. F. Nascimento et al., 2017) e utilizzando diverse sostanze per scopi diversi (Cassoli, Sartori, Zampar, et al., 2011); è possibile, pertanto, definire una serie di categorie di sostanze come potenziali adulteranti nel latte (Y. Yang et al., 2020).

Le pratiche fraudolente prevedono generalmente l'aggiunta di sostanze ad elevato contenuto di azoto per aumentare l'apparente valore di proteina del latte e si tratta di una frode piuttosto comune in quanto la frazione di azoto non proteico (*NPN: non-protein nitrogen*) non può essere distinta attraverso il metodo Kjeldahl (C. F. Nascimento et al., 2017) (metodo di riferimento internazionale per definire il contenuto proteico del latte) (International Organization for Standardization [ISO], 2014) poiché si basa sul contenuto di azoto di un campione. I principali adulteranti impiegati in tale strategia fraudolenta sono principalmente urea (naturalmente presente nel latte a basse concentrazioni), melamina e siero dal momento che sono sostanze piuttosto economiche e ad alto contenuto di azoto (C. F. Nascimento et al., 2017); inoltre, anche l'idrossiprolina viene impiegata per tale motivo (Hansen & Holroyd, 2019). Alcuni di questi adulteranti, come urea e melamina, comportano effetti dannosi per la salute, spesso nel lungo periodo (Azad & Ahmed, 2016); il siero, invece, come sottoprodotto della produzione di formaggio, può essere aggiunto nel latte sia per aumentarne l'apparente contenuto proteico, sia per aumentarne il volume (C. F. Nascimento et al., 2017).

Nel caso specifico dell'annacquamento, l'aggiunta di acqua determina principalmente un cambiamento nel punto crioscopico del latte (Poonia et al., 2017), il quale è sempre inferiore a 0°C,

l'abbassamento crioscopico è determinato, infatti, dalle sostanze disciolte in soluzione come zuccheri e sali minerali (Cabras & Martelli, 2004). Come stabilito per legge, il punto di congelamento del latte non deve essere superiore a -520 °mC, uno spostamento di tale valore verso lo zero è indice sospetto o sicuro di annacquamento (Cabras & Martelli, 2004). L'aggiunta nel latte di sostanze quali sali (come il cloruro di sodio ovvero il comune sale da cucina), zuccheri e conservanti (ad esempio bicarbonato di sodio o sodio citrato) possono determinare una riduzione del punto di congelamento del latte che è stato annacquato, evitando così di rilevare l'adulterazione (Poonia et al., 2017).

Conservanti quali idrossido di sodio o carbonato di sodio vengono aggiunti in modo fraudolento per prevenire o nascondere la crescita microbica andando a neutralizzare l'acidità che deriva proprio dallo sviluppo microbico (Singh & Gandhi, 2015; Tripathy et al., 2017) e determinando quindi un aumento della shelf-life del prodotto (C. F. Nascimento et al., 2017).

Per quanto riguarda la frazione lipidica, dal momento che il grasso del latte è tra i grassi edibili di maggior valore economico, spesso è soggetta ad adulterazione. La frazione grassa può essere mescolata o sostituita con oli vegetali o altri grassi animali di minor valore (Poonia et al., 2017).

Altre pratiche fraudolente possono riguardare l'aggiunta di zuccheri per aumentare l'apparente contenuto di lattosio (J. Liu et al., 2015), l'aggiunta di proteine vegetali o di latte di specie diverse (Fischer et al., 2011; Singh & Gandhi, 2015). Inoltre, al fine di incrementare il tenore in sostanze solide non grasse, il latte può essere addizionato in modo fraudolento da alcune sostanze quali sali solfati, amido o zuccheri (Azad & Ahmed, 2016).

1.2.3. Tecniche di rilevazione

Le questioni fondamentali per l'industria lattiero-casearia in tutto il mondo consistono nel garantire l'autenticità delle produzioni e implementare rigorosi standard di qualità e criteri di sicurezza alimentare (Poonia et al., 2017); l'adulterazione del latte è un problema serio per l'intera industria alimentare, sia da un punto di vista commerciale che sanitario (R. Yang et al., 2016), per questo motivo si richiedono adeguati metodi di controllo per valutare l'autenticità del latte e dei prodotti derivati (Santos et al., 2013), in particolare tecniche rapide e non distruttive in grado di svolgere analisi accurate (Kamboj, Kaushal, Mishra, et al., 2020).

Per lo screening di adulteranti nel latte è necessario distinguere tecniche qualitative e quantitative. Le prime consistono in reazioni chimiche colorimetriche, hanno il vantaggio di essere rapide e piuttosto semplici da svolgere ma non sono sufficientemente precise e sono valide solo per un intervallo

limitato di concentrazioni di adulteranti. Le tecniche quantitative sono complesse e diversificate e dipendono dalla natura stessa degli adulteranti che si ricercano nel latte, alcuni esempi riguardano il test ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* che rappresenta una delle tecniche più utilizzate per rilevare le proteine non native del latte oppure la PCR (*Polymerase Chain Reaction)* e l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (*PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis)* che generalmente vengono impiegate per ricercare latte di specie diverse da quello dichiarato (Azad & Ahmed, 2016). Per rilevare l'adulterazione nel latte si possono utilizzare inoltre avanzate tecniche analitiche come la cromatografia che può essere liquida (*HPLC: high pressure liquid chromatography*) o gassosa (*GC: gas chromatography*) ma viene utilizzata per determinazioni altamente selettive soprattutto se accoppiate con la spettrometria di massa (Abernethy & Higgs, 2013). Spesso tali metodologie presentano uno serie di svantaggi: sono distruttive, le strumentazioni sono molto costose, sono dispendiose in termini di tempo e manodopera e richiedono spesso sostanze chimiche pericolose (Kamboj, Kaushal, Mishra, et al., 2020); per questo motivo generalmente non sono pratiche da utilizzare per analizzare un elevato numero di campioni. Di conseguenza hanno guadagnato grande attenzione metodi di screening rapidi e ad alta produttività che consentono anche un intervento precoce in caso di eventuali anomalie (Y. Yang et al., 2020), si tratta infatti delle tecniche spettroscopiche che vengono utilizzate per rilevare l'adulterazione nel latte, per valutarne quindi l'autenticità e stabilirne i parametri qualitativi intrinseci (Macedo dos Santos & Pereira-Filho, 2013; B. Wu et al., 2012).

1.3. LA SPETTROSCOPIA INFRAROSSO

1.3.1. Aspetti generali e applicazioni

La spettroscopia infrarosso è la tecnica sempre più utilizzata per determinare l'autenticità e l'adulterazione degli alimenti (Kamal & Karoui, 2015) e una delle tecnologie più importanti per l'analisi delle materie prime, per i controlli di processo e dei prodotti finiti nell'industria lattiero-casearia (De Marchi et al., 2018).

Tecniche quali la spettroscopia nel vicino infrarosso (*NIRS; Near-Infrared Spectroscopy*) e nel medio infrarosso (*MIRS; Mid-Infrared Spectroscopy*) vengono ampiamente utilizzate per determinare diverse proprietà del latte (Etzion et al., 2004; Kawasaki et al., 2008) e vengono applicate con successo nella valutazione della qualità del latte e dei prodotti lattiero-caseari (Andrade et al., 2018, 2019; Brandão et al., 2010; Mishra et al., 2016; Pereira et al., 2018). In particolare, diversi strumenti

basati sulla spettroscopia infrarosso a trasformata di Fourier (*FTIR; Fourier Transform Infrared spectroscopy*) sono stati sviluppati per determinare diverse proprietà del latte come la composizione chimica (ad esempio il contenuto di proteina, grasso, lattosio, solidi totali, solidi non grassi) ma anche densità e punto crioscopico; tali risultati permettono di determinare il valore economico del latte e di stabilire quindi i guadagni nei confronti dei conferenti (Y. Yang et al., 2020).

La spettroscopia infrarosso è una piattaforma strumentale che viene impiegata nei laboratori di controllo qualità e fornisce supporto per prevenire le frodi alimentari (Santos et al., 2013), infatti, progressi nelle strumentazioni che si basano su tale tecnica, in combinazione con metodi chemiometrici, hanno reso la spettroscopia infrarosso un potente strumento per determinare la qualità e l'autenticità degli alimenti (Rodriguez-Saona & Allendorf, 2011).

I principali vantaggi consistono nella capacità di analizzare i campioni con poca o nessuna preparazione degli stessi, la facilità d'uso, la rapida raccolta dei dati e l'elevata sensibilità e specificità (Santos et al., 2013). Tale tecnica presenta inoltre il vantaggio di essere non-distruttiva (Federal University of Juiz De Fora & Anjos, 2020) e rappresenta un'alternativa rispetto ad altre strategie analitiche (Karoui & Debaerdemaeker, 2007), la maggior parte delle quali fa uso di sostanze chimiche pericolose e che richiedono molta manodopera da parte di personale esperto e qualificato oltre ad una lunga preparazione dei campioni (Danezis et al., 2016).

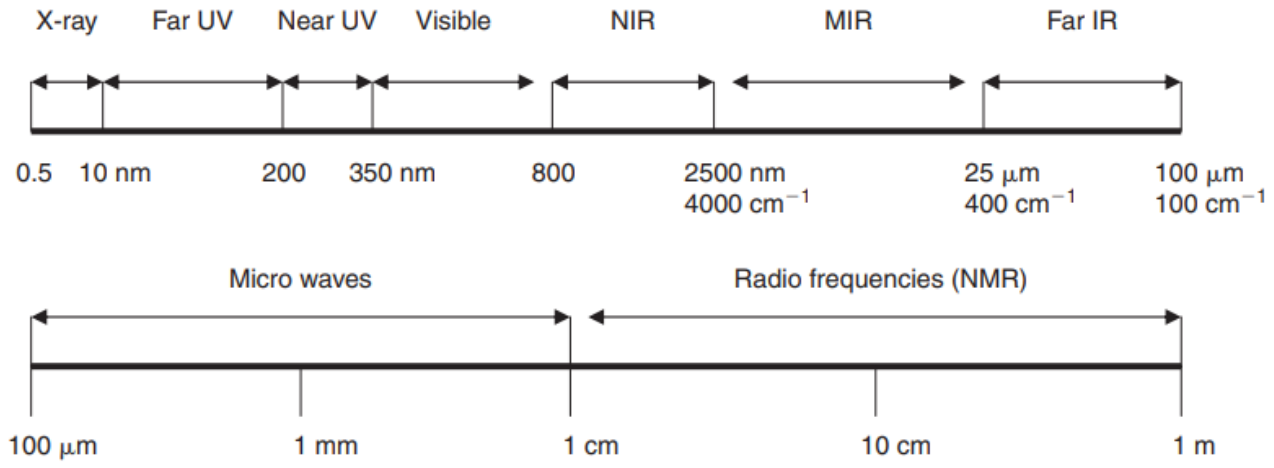
1.3.2. Principi chimico-fisici

La spettroscopia infrarosso si basa sull'analisi dell'interazione tra onde elettromagnetiche e la materia (O'Donnell et al., 2014), più nello specifico sulla vibrazione degli atomi che compongono le molecole (Stuart, 2004).

Innanzi tutto, è necessario indicare la luce come energia elettromagnetica che può essere definita da diverse proprietà come la lunghezza d'onda, la frequenza e l'energia. Il contenuto energetico è indirettamente proporzionale alla lunghezza d'onda della luce mentre risulta direttamente proporzionale alla frequenza (Agelet & Hurburgh, 2010).

La radiazione elettromagnetica comprende diverse regioni, ciascuna con delle precise lunghezze d'onda: raggi X (0.5-10 nm), UV (10-350 nm), visibile (350-800 nm), vicino infrarosso (800-2500 nm), medio infrarosso (2500-25000 nm), microonde (100 µm-1 cm), onde radio (1 cm-1 m) (De Marchi et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Spettro elettromagnetico (Sun, 2009)



Quando un campione viene attraversato dalla radiazione infrarossa è possibile determinare quale frazione della radiazione incidente viene assorbita ad una particolare energia ed ottenere così uno spettro infrarosso nel quale si osservano picchi di assorbimento con energia che corrisponde alla frequenza di vibrazione delle molecole presenti nel campione analizzato (Stuart, 2004). Un prodotto lattiero-caseario con una certa composizione chimica esposto ad una sorgente luminosa produce quindi uno spettro caratteristico che è il risultato dell'assorbimento di energia elettromagnetica da parte dei diversi componenti dell'alimento (Karoui & Debaerdemaeker, 2007).

La regione dell'infrarosso si colloca al centro dello spettro elettromagnetico e si compone di tre zone principali ovvero il lontano infrarosso (*far-infrared*), il medio infrarosso (MIR; *mid-infrared*) e il vicino infrarosso (NIR; *near-infrared*). I cambiamenti nell'energia luminosa tra le tre regioni portano a diversi assorbimenti da parte di diverse molecole e legami determinando differenti tipologie di vibrazioni, ad esempio la luce del lontano infrarosso viene assorbita da atomi pesanti mentre la regione del medio infrarosso viene spesso impiegata per analisi di sostanze organiche (Agelet & Hurburgh, 2010).

In particolare, nella regione del medio infrarosso, quando la materia è attraversata dalla radiazione elettromagnetica, i legami delle molecole eseguono movimenti e vibrazioni che comportano un assorbimento più o meno marcato dell'energia fornita (De Marchi et al., 2014); nello specifico, le interazioni della radiazione infrarossa con la materia possono essere comprese in termini di cambiamenti nei dipoli molecolari associati a tali vibrazioni. Il principio di base della spettroscopia infrarosso consiste nel fatto che affinché una molecola dimostri un assorbimento nell'infrarosso, il

momento di dipolo elettrico della molecola deve cambiare durante la vibrazione e maggiore sarà tale variazione, maggiore sarà l'intensità della banda di assorbimento (Stuart, 2004).

Si può affermare pertanto che i movimenti vibrazionali delle molecole inducono assorbimenti nella regione dell'infrarosso (Sun, 2009) e si possono descrivere diverse tipologie di vibrazioni molecolari: può avvenire un cambiamento nella lunghezza del legame (*stretching*) che può allungarsi in fase (*stretching simmetrico*) o fuori fase (*stretching asimmetrico*) oppure cambiamenti nell'angolo di legame (*bending*) che comprendono diverse tipologie di vibrazioni molecolari come *deformation*, *rocking*, *wagging* e *twisting* (Stuart, 2004) (Figure 2 e 3).

Figura 2 – Vibrazioni di stretching e bending (Stuart, 2004)

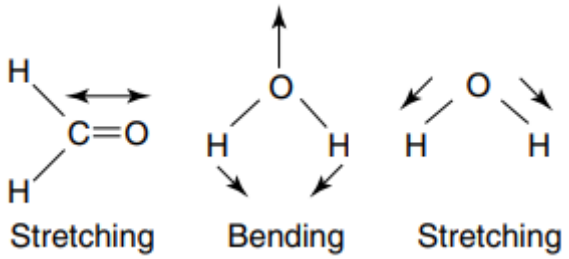
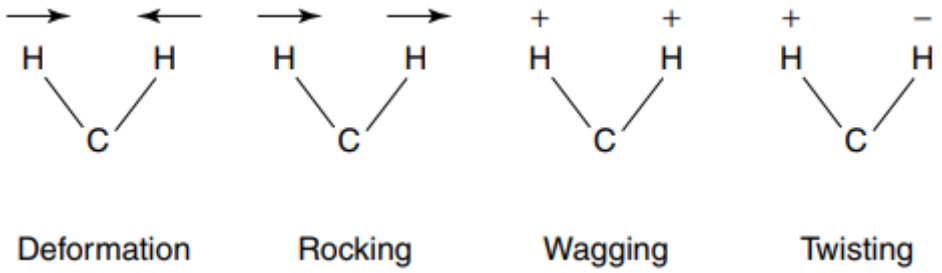


Figura 3 – Diverse tipologie di vibrazioni di bending (Stuart, 2004)



Le bande di assorbimento che si osservano nello spettro infrarosso vengono utilizzate per analisi qualitative e quantitative di numerose molecole, inoltre l'identificazione e l'attribuzione dei picchi a specifici gruppi chimici fornisce informazioni specifiche di un campione esaminato; infatti, i diversi componenti delle matrici alimentari spesso sono molecole complesse con specifici gruppi chimici e ciascuno di questi assorbe nell'infrarosso quindi risulta utile identificare e caratterizzare le bande di assorbimento di tali gruppi nelle regioni NIR e MIR.

Ad esempio, il legame C-H, che si trova in grande quantità nelle molecole organiche, mostra vibrazioni di stretching tra 2750 e 3320 cm^{-1} nella regione MIR mentre nella regione NIR si osservano bande combinate che coinvolgono stretching e bending di tale legame tra 2000 e 2500 cm^{-1}.

Altri esempi possono riguardare il gruppo ossidrile O-H (si trova in molecole come alcoli, acidi organici e nella molecola d'acqua) che mostra una forte banda di assorbimento nella regione MIR tra 3200 e 3600 cm^{-1} o il gruppo carbonilico C=O (si trova in aldeidi, chetoni, acidi, esteri) mostra un forte assorbimento nel medio infrarosso tra 1650 e 1850 cm^{-1} (Sun, 2009).

1.3.3. NIRS e MIRS

La spettroscopia nel vicino-infrarosso (NIRS) utilizza la regione dello spettro elettromagnetico 750-2500 nm (espresso in lunghezza d'onda) o 14290-4000 cm^{-1} (espresso in numero d'onda) (L. Luiz et al., 2014; Nunes, 2014) nella quale si osservano bande di assorbimento associate a vibrazioni molecolari, in particolare la regione NIR si caratterizza da bande di overtone (bande armoniche) e bande combinate (Sun, 2009). Tali bande che si osservano negli spettri NIR si riferiscono principalmente alle vibrazioni di legami quali C-H, O-H, N-H delle molecole, i quali originano da bande fondamentali nella regione MIR (Reid et al., 2005). Questi legami chimici tra atomi leggeri hanno generalmente una frequenza vibrazionale piuttosto elevata risultando in bande armoniche e combinate che si rintracciano nella regione NIR (Osborne et al., 1993).

La spettroscopia nel medio-infrarosso (MIRS) sfrutta la regione dello spettro elettromagnetico 2500-25000 nm (espresso in lunghezza d'onda) o 4000-400 cm^{-1} (espresso in numero d'onda), permette di misurare le vibrazioni fondamentali delle molecole e tale aspetto consente, rispetto alle bande misurate nella regione NIR, di ottenere molte più informazioni circa la composizione chimica del campione analizzato (Lohumi et al., 2015; L. Luiz et al., 2014; Nunes, 2014; D. Wu et al., 2012). Si applica per rilevare differenze compositive tra campioni sulla base delle vibrazioni dei diversi gruppi chimici a specifiche lunghezze d'onda nella regione MIR dello spettro elettromagnetico (Reid et al., 2005). La frequenza e l'intensità delle bande di assorbimento specifiche e fondamentali possono fornire informazioni relative a diversi gruppi funzionali delle molecole (D. Wu et al., 2007). La regione del medio infrarosso consente di identificare composti organici e di caratterizzare molecole come proteine, lipidi e polisaccaridi (Sun, 2009); inoltre MIRS rappresenta, ad oggi, la tecnica più utilizzata per l'analisi del latte e dei prodotti lattiero-caseari (Karoui & Debaerdemaeker, 2007).

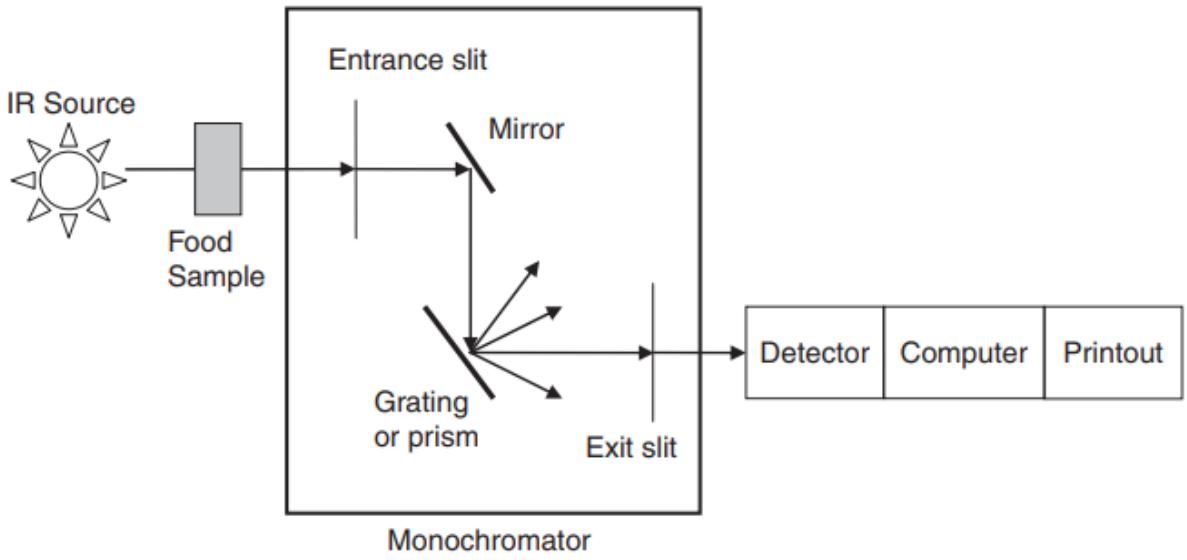
La differenza sostanziale tra le due tecniche spettroscopiche riguarda il fatto che mentre gli spettri MIR contengono informazioni derivanti da frequenze vibrazionali fondamentali delle molecole, nella

regione NIR le informazioni provengono da combinazioni di tali vibrazioni rendendole talvolta più difficili da interpretare (Reid et al., 2005).

Gli spettri NIR, come detto, sono costituiti da bande di overtone e bande combinate. Le prime consistono in multipli di una frequenza di assorbimento fondamentale; l'energia richiesta per la prima banda sarà dunque pari al doppio di quella fondamentale, quindi, dal momento che l'energia è proporzionale alla frequenza assorbita che a sua volta è proporzionale al numero d'onda, la prima banda di overtone apparirà nello spettro NIR ad un numero d'onda pari al doppio di quello fondamentale. Per quanto riguarda le bande combinate, queste si verificano quando due bande fondamentali assorbono energia contemporaneamente, pertanto, se si hanno assorbimenti a frequenze pari a v_1 e v_2 la banda che ne risulta apparirà nello spettro ad una frequenza pari a (v_1+v_2) (Stuart, 2004). Si può affermare quindi che le informazioni chimiche negli spettri NIR sono ripetute e altamente sovrapposte lungo l'intera gamma di lunghezze d'onda (Agelet & Hurburgh, 2010); infatti, le bande armoniche e combinate relative a diversi legami molecolari che si possono rintracciare nella regione NIR, sono tipicamente molto ampie e risulta di conseguenza difficile assegnare determinate caratteristiche a specifici componenti chimici dal momento che le strutture chimiche sono composte da numerosi e complessi legami chimici. Le tecniche chemiometriche risultano pertanto necessarie al fine di facilitare l'estrazione di informazioni dagli spettri (Qu et al., 2015).

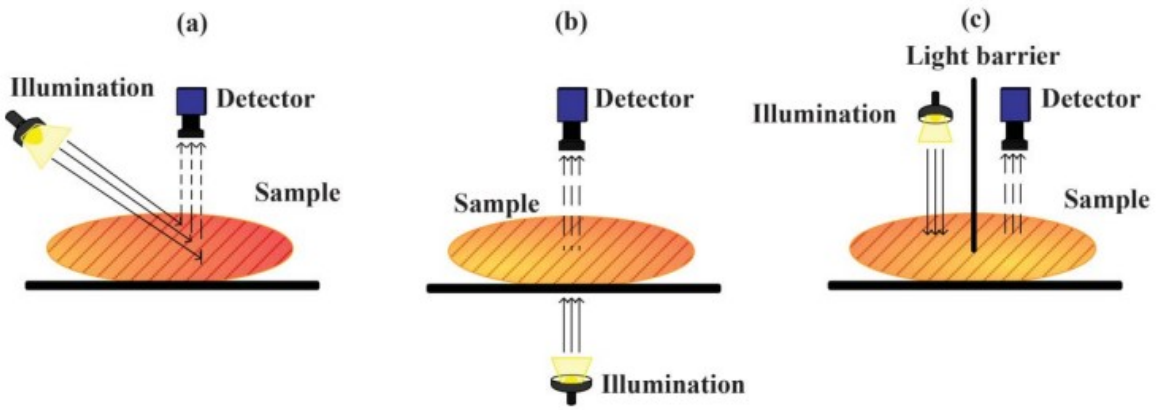
Una tipica strumentazione NIR comprende una serie di sistemi ottici quali una sorgente di radiazione, un dispositivo di selezione della lunghezza d'onda come un monocromatore, un porta-campioni, un rilevatore fotoelettrico (detector) che misura l'intensità della luce rilevata convertendola in un segnale elettrico ed un sistema informatico che acquisisce ed elabora i dati spettrali. La luce emessa da una sorgente infrarosso passa attraverso il campione e successivamente raggiunge il monocromatore che presenta dispositivi ottici come un prisma o un reticolo, grazie a tali sistemi la luce viene guidata e separata in uno spettro di diverse lunghezze d'onda ed infine, grazie ad un foro d'uscita del monocromatore, la luce a specifiche lunghezze d'onda viene segmentata in componenti facilmente misurabili per raggiungere poi il detector (Sun, 2009) (Figura 4). La maggior parte delle moderne strumentazioni MIR sono invece spettrometri infrarossi a trasformata di Fourier (FTIR) che utilizzano un interferometro al posto del monocromatore (Coates, 1998), è possibile pertanto utilizzare i termini MIRS e FTIR in modo intercambiabile considerando che strumentazioni FTIR utilizzano la regione dello spettro elettromagnetico del medio infrarosso (Sun, 2009).

Figura 4 – Diagramma ottico di una tradizionale strumentazione NIR, dispersione di un singolo raggio IR mediante reticolo dispersivo (Sun, 2009) (Adapted from White 1990)



Le analisi NIR si possono eseguire attraverso due modalità: trasmissione o riflessione diffusa (Agelet & Hurburgh, 2010). Infatti, la luce incidente su un campione può essere riflessa, assorbita o trasmessa; pertanto, la radiazione assorbita da un campione può essere misurata rilevando quanta energia viene trasmessa attraverso il campione o quanta ne viene riflessa dal campione (Sun, 2009) dal momento che la luce assorbita non può essere misurata direttamente mentre proprietà quali la trasmittanza e la riflettanza diffusa possono essere correlate all'assorbimento di luce (Agelet & Hurburgh, 2010). È possibile, inoltre, definire una terza modalità di raccolta dati definita interazione che consiste nella combinazione tra trasmittanza e riflettanza (Nicolaï et al., 2007) e la scelta della corretta modalità dipende dalla tipologia dei campioni da analizzare (Schaare & Fraser, 2000) (Figura 5).

Figura 5 – Modalità di acquisizione dati in un sistema NIRS: (a) riflettanza, (b) trasmittanza, (c) interazione (Qu et al., 2015). (a) radiazione riflessa dalla superficie del campione e detector sono situati sullo stesso lato della sorgente luminosa per catturare luce riflessa dal campione, modalità generalmente utilizzata per campioni solidi o granulari (Schaare & Fraser, 2000), (b) detector sul lato opposto rispetto sorgente luminosa, modalità utilizzata per campioni liquidi e alcuni campioni solidi, (c) sorgente luminosa e detector sono posizionati paralleli tra loro sullo stesso lato del prodotto analizzato (Nicolaï et al., 2007)



Si può affermare, quindi, che quando un campione alimentare viene investito da luce NIR assorbirà luce con frequenze corrispondenti a vibrazioni caratteristiche di determinati gruppi funzionali mentre luce con altre frequenze verrà trasmessa o riflessa (Foley et al., 1998); i componenti biochimici di un alimento determinano pertanto la quantità e la frequenza della luce assorbita mentre la luce riflessa o trasmessa può essere usata per stimare la composizione chimica di quel campione alimentare (André & Lawler, 2003).

Generalmente, la regione MIR può essere divisa in due regioni distinte: la zona dei gruppi funzionali che va da 4000 a 1500 cm^{-1} e la regione fingerprint che va da 1500 a 500 cm^{-1}. La regione dei gruppi funzionali può essere ulteriormente suddivisa in zone specifiche rappresentative proprio dei gruppi funzionali che si possono osservare nei materiali biologici: la zona 4000-2500 cm^{-1} corrisponde ai movimenti di stretching dei legami C-H, N-H, O-H, S-H; la regione 2700-1850 cm^{-1} corrisponde ai legami tripli (C≡C, C≡N o C=C=C); la regione 1950-1450 cm^{-1} viene attribuita a diversi gruppi funzionali con doppio legame (C=C, C=N, C=O ecc…) (Hsu, 1997). Le informazioni più rilevanti per interpretare gli spettri MIR derivano proprio dalla regione dei gruppi funzionali poiché la regione fingerprint è generalmente complessa e con diverse bande sovrapposte perché ogni composto produce un modello di assorbimento particolare in questa regione (Jawaid et al., 2013; Polshin et al., 2011).

La spettroscopia a trasformata di Fourier nel vicino e medio infrarosso (FT-NIR e FT-MIR) rappresentano tecniche spettrali complementari con una serie di vantaggi e svantaggi (Federal University of Juiz De Fora & Anjos, 2020). MIRS consente accurate analisi qualitative e quantitative e presenta bande ben definite per diversi gruppi funzionali organici e per grasso, proteina e lattosio che si rintracciano nella composizione del latte; tuttavia, le strumentazioni sono piuttosto costose rispetto a NIRS. Quest'ultima tecnologia si caratterizza per strumenti di trasmissione più semplici ed economici e una sorgente di luce meno costosa rispetto a MIRS, in questi termini NIRS si distingue (Brown, 2013) ma presenta alcuni svantaggi. Infatti, le informazioni degli spettri si riferiscono, come detto, a combinazioni di vibrazioni di alcuni legami caratteristici come C-H, N-H, O-H, S-H che tipicamente sono presenti in tutte le molecole organiche (N. Liu et al., 2018), si considera inoltre anche la scarsa capacità di valutare campioni eterogenei (Qu et al., 2015) ed infine la non possibilità di svolgere misure accurate per componenti con un contenuto inferiore all' 1% (Sun, 2009).

Gli spettri NIR e MIR contengono una grande quantità di dati che richiedono elaborazione, generalmente infatti le tecniche infrarosso sono supportate da chemiometria che viene definita come un campo interdisciplinare che utilizza metodi come statistica multivariata, matematica e informatica per estrarre informazioni dai sistemi chimici (Brereton, 2007; Gómez-Caravaca et al., 2016); gli approcci chemiometrici possono quindi migliorare notevolmente le potenziali applicazioni della spettroscopia infrarossa (Qu et al., 2015).

1.3.4. Screening di adulteranti

Lo screening di adulteranti nel latte, utilizzando tecniche spettroscopiche, può essere eseguito attraverso due metodi concettualmente diversi, si parla infatti di modelli specifici o mirati (*targeted*) e modelli non-specifici o non-mirati (*untargeted*).

Modelli di screening mirati comprendono metodi per rilevare e quantificare specifici adulteranti, modelli non-mirati non permettono di rilevare uno specifico adulterante ma rilevano deviazioni non-specifiche negli spettri FT-IR e si possono basare su modelli di analisi delle componenti principali (*PCA; Principal Component Analysis*).

Il principale vantaggio dei modelli mirati consiste nell'indicare la presenza di specifici adulteranti nel campione e ciò permette di condurre direttamente alla fonte di adulterazione e adottare misure appropriate, lo svantaggio è che tali modelli possono essere impiegati solamente per lo screening di adulterazioni già note e di conseguenza non permette di proteggersi da pratiche fraudolente impreviste. I modelli non-specifici permettono invece di eseguire uno screening generale dei

campioni e ciò consente di rilevare una pratica fraudolente non ancora scoperta laddove la natura dell'adulterante risulta sconosciuta. Ciò rappresenta chiaramente un vantaggio di tali modelli ma si devono considerare una serie di svantaggi: in primo luogo avranno dei limiti di rilevabilità (*LOD: Limit of Detection*) molto più elevati rispetto ai modelli mirati (fino a due o tre volte maggiori) e, in secondo luogo, indicano solamente delle deviazioni spettrali senza dare nessun tipo di informazione circa la natura dell'adulterante. Per tali motivi è consigliato adottare un approccio combinato in cui i modelli mirati vengono utilizzati per il rilevamento di adulteranti noti e modelli non-mirati per rilevare simultaneamente l'adulterazione sconosciuta.

I modelli non-specifici, inoltre, presentano un ulteriore vantaggio per quanto riguarda l'adulterazione economica che consiste nell'aggiunta di una miscela di composti: più sostanze estranee verranno aggiunte, maggiore sarà l'effetto sullo spettro FT-IR e quindi la deviazione spettrale. L'approccio combinato rappresenta di fatto la soluzione più efficiente, i modelli non-mirati possono quindi essere implementati con modelli mirati che offrono la possibilità di stimare concentrazioni più specifiche di adulteranti poiché si caratterizzano da LOD inferiori.

È inoltre necessario specificare che non è possibile definire un LOD generale per diversi componenti chimici nello screening di adulteranti utilizzando FT-IR. Ciò è dovuto al fatto che i composti chimici interagiscono in modi diversi con lo spettro FT-IR, tuttavia è importante considerare una serie di aspetti: (1) risulta più difficile rilevare composti simili ai componenti del latte a causa della sovrapposizione dei picchi; questo aspetto riguarda per esempio sostanze quali acqua, grasso, proteina e carboidrati, specialmente se di origine lattiero-casearia come il siero, tali sostanze quindi avranno dei LOD piuttosto elevati, (2) i modelli mirati possono essere creati solamente per composti chimici ben definiti e non per gruppi di composti come, ad esempio, amidi o disinfettanti, (3) alcuni sali, come il cloruro di sodio NaCl (comune sale da cucina), contengono solo legami ionici e non hanno spettri FT-IR quindi possono essere rilevati solamente attraverso l'effetto indiretto su altri componenti del latte, ad esempio l'acqua, comportando LOD più elevati per questi composti (Hansen & Holroyd, 2019).

2. OBIETTIVO DELL'ELABORATO

Gli obiettivi dell'elaborato sono:

- studiare l'effetto dell'aggiunta di diversi adulteranti sulla predizione FT-MIR dei parametri di latte qualità;
- valutare la capacità della spettroscopia FT-MIR di rilevare la presenza di adulteranti nel latte di massa, a diversi livelli di contaminazione.

In particolare, sono stati considerati sette adulteranti che maggiormente vengono utilizzati nelle pratiche fraudolente di adulterazione del latte (acqua, urea, sodio citrato, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio, idrossiprolina e glucosio) a diverse concentrazioni.

3. MATERIALI E METODI

3.1. RACCOLTA E PREPARAZIONE CAMPIONI

La raccolta dei campioni è avvenuta nel 2022. Per ogni giornata di campionamento sono stati raccolti, presso l'azienda, dai 5 ai 7 campioni di latte bovino crudo di massa (da 1L ciascuno). Tali campioni sono stati prelevati direttamente da cisterne refrigerate dei camion di ciascun conferente e conservate a +4°C fino al momento dell'analisi.

In totale sono stati raccolti 100 campioni di latte crudo di massa provenienti da conferenti italiani ed esteri, ciascun campione è stato identificato con il nominativo del conferente accompagnato da un codice ID utile per la tracciabilità interna aziendale e dalla data di campionamento.

La preparazione dei campioni è stata eseguita presso il Laboratorio Chimico del Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE) dell'Università degli Studi di Padova (Legnaro, Padova, Italia).

La preparativa si compone di due fasi: dapprima è necessario preparare le provette con gli adulteranti e, pertanto, facendo riferimento alle tavole dei modelli specifici per lo screening di adulterazione nel latte fornite dalla casa madre dello strumento utilizzato per le analisi, sono stati individuati tre livelli di concentrazione per ciascun adulterante (Tabella 1). Gli adulteranti considerati in questo studio sono 7: acqua, urea, sodio citrato, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio, idrossiprolina e glucosio. Ciascuna provetta è stata preparata con il dosaggio preciso corrispondente ai tre livelli di concentrazione individuata per ciascun adulterante. Per ogni campione di latte crudo di massa prelevato si ricavano dunque 21 provette alle quali se ne aggiunge una di controllo senza l'aggiunta di nessun adulterante, per un totale di 22 provette.

Tra gli adulteranti utilizzati si sottolinea il caso particolare dell'idrossiprolina in quanto non è possibile reperirla in commercio in forma pura. Poiché si tratta di un amminoacido che compone il collagene, è stato utilizzato pertanto, come da indicazioni della casa madre danese Foss, un integratore alimentare a base di collagene idrolizzato contenente anche acido ialuronico e diverse vitamine non di interesse ai fini delle analisi.

La preparazione degli adulteranti rappresenta una fase preliminare fondamentale poiché maggiore sarà la precisione che si riesce ad ottenere in questa fase, più attendibile sarà il riscontro dei dati raccolti in fase di analisi. Pertanto, è stata eseguita la pesatura degli adulteranti utilizzando una bilancia analitica con una sensibilità al decimo di milligrammo (0.1 mg).

Una volta che le provette sono state preparate con gli adulteranti, all'interno di ciascuna provetta sono stati aliquotati 40 mL di latte; un caso particolare riguarda l'acqua dal momento che per questo adulterante è stato aggiunto un volume in provetta pari a 0.64 mL (L1), 1.28 mL (L2), 2.56 mL (L3), quindi è stato necessario portare a volume fino ad ottenere 40 mL complessivi.

Tabella 1 – Livelli di concentrazione per ciascun adulterante

Adulterante	Livello 1 (%)	Livello 2 (%)	Livello 3 (%)
Acqua	1.6	3.2	6.4
Urea	0.0125	0.025	0.05
Sodio citrato	0.019	0.038	0.076
Cloruro di sodio	0.075	0.15	0.3
Bicarbonato di sodio	0.005	0.01	0.02
Idrossiprolina	0.007	0.014	0.028
Glucosio	0.031	0.062	0.124

3.2. ANALISI CAMPIONI

Le analisi dei campioni sono state eseguite utilizzando il MilkoScan FT3 (FOSS Analytical A/S, Hillerød, Denmark) che sfrutta la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR).

Per un corretto svolgimento delle analisi è necessario eseguire alcuni step preliminari: lo strumento di misurazione innanzitutto deve essere in funzione da almeno 8-12 ore, è richiesto monitorare i livelli di "clean solution" e "zero solution" dello strumento per evitare che si riscontrino problemi o interruzioni durante le analisi, inoltre, prima di effettuare le misurazioni si richiedono tre letture di un campione di latte UHT definito "pilota" per verificare la ripetibilità dello strumento.

Una volta constatata la piena operatività dello strumento si possono eseguire le analisi dei campioni. Questi devono essere riscaldati fino a raggiungere una temperatura compresa tra i 38 e i 40°C utilizzando un bagno termostatato.

La prima analisi è stata eseguita presso il Laboratorio Chimico del DAFNAE dell'Università degli Studi di Padova (Legnaro, Padova, Italia) dove è stata anche compiuta la preparazione dei campioni i quali, una volta concluse le misurazioni per ogni giornata di campionamento, sono stati nuovamente refrigerati e trasferiti presso un secondo laboratorio. Le analisi sono state eseguite presso il laboratorio interno aziendale utilizzando lo stesso strumento MilkoScan FT3 (FOSS Analytical A/S, Hillerød, Denmark) al fine di ottenere un duplice riscontro.

3.3. ANALISI STATISTICA

L'effetto di ciascun adulterante sulla predizione FT-MIR delle diverse componenti del latte è stato valutato attraverso l'applicazione della procedura GLM (*generalized linear model*) del software SAS (v. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Il modello statistico viene così descritto:

$$y_{ijmn} = \bar{x} + L_i + C_j + S(H_n)_m + e_{ijmn}$$

dove y_{ijmn} rappresenta la variabile d'interesse, $\bar{x}$ è l'intercetta complessiva del modello, L_i rappresenta l'effetto fisso dell'*i*-esimo laboratorio in cui viene eseguita l'analisi (2 livelli), C_j è l'effetto della *j*-esima concentrazione di ciascun adulterante considerato (dove *j* può assumere valori da 0 a 3), $S(H_n)_m$ indica l'effetto ripetuto del campione analizzato annidato all'effetto dell'*n*-esimo allevamento di provenienza del campione stesso (con *m* che può assumere valori da 0 a 100), e_{ijmn} rappresenta, infine, l'errore residuo.

I modelli di predizione per la presenza di adulteranti sono stati sviluppati utilizzando la procedura PLS (*Partial Least Squares*) Regression module della libreria scikit-learn del software Python (Pedregosa et al., 2011). Dapprima, gli spettri sono stati accoppiati con l'adulterante utilizzato e il corrispettivo livello di concentrazione. Successivamente, le regioni spettrali associate alle lunghezze d'onda di assorbimento dell'acqua sono state escluse e gli spettri sono stati standardizzati utilizzando il metodo *standard normal variate*. Ciascun modello di discriminazione è stato sviluppato utilizzando spettri ottenuti da latte non adulterato e spettri di un livello specifico di ciascun adulterante. Di conseguenza, il set di dati per ciascun modello comprendeva 400 spettri: 200 da campioni di latte non adulterato (100 campioni di latte crudo per ciascuno dei due strumenti impiegati per le analisi) e 200 da campioni di latte adulterato (100 campioni di latte adulterato per ciascuno strumento). Prima di svolgere ulteriori analisi, 4 gruppi di campioni scelti casualmente sono stati assegnati al set indipendente, ciascun gruppo proveniva da un unico fornitore e complessivamente i gruppi di

campioni rappresentavano circa un quinto del numero di campioni totale; i restanti sono stati utilizzati come set di calibrazione. Per ogni modello, la capacità discriminante complessiva è stata valutata sul set di test indipendenti utilizzando indicatori di performance convenzionali ovvero true positives (TP), true negatives (TN), false positives (FP) e false negatives (FN). Sono stati considerati altri indicatori quali precision, recall, accuracy e F1 score (SAS GUIDE) definiti nei seguenti modi:

$$Precision = \frac{TP}{TP+FP}$$

$$Recall = \frac{TP}{TP+FN}$$

$$Accuracy = \frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$$

$$F1\ score = 2 \cdot \frac{precision \cdot recall}{precision + recall}$$

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. STATISTICHE DESCRITTIVE

Tabella 2 – Statistiche descrittive relative al latte di partenza non adulterato

Variabile	N	Media	DS	CV	Min	Max
Grasso (%)	197	3,87	0,31	8,01	2,96	5,47
Proteina (%)	197	3,33	0,07	2,10	3,21	3,51
Lattosio (%)	197	4,71	0,10	2,12	4,26	4,89
Solidi totali (%)	197	12,48	0,33	2,64	11,64	14,12
Solidi non grassi (%)	197	8,71	0,14	1,60	8,40	9,04
Caseina (%)	197	2,59	0,07	2,70	2,46	2,77
Urea (g/dL)	197	26,50	4,90	18,50	17,00	35,00
Punto di congelamento (°mC)	190	-520,77	5,96	1,14	-544,00	-505,20

In Tabella 2 sono riportate le statistiche descrittive relative ai parametri qualitativi dei campioni di latte raccolti. Si può osservare una bassa variabilità per il contenuto di proteina e lattosio che riportano coefficienti di variazione (CV) pari a 2,10 e 2,12%, rispettivamente, mentre il contenuto di grasso riporta una variabilità maggiore con un CV pari a 8,01%. La più alta variabilità del contenuto di grasso è spiegata dal fatto che nell'attività di ricerca sono stati analizzati alcuni campioni di latte scremato. Nello specifico, i valori medi di proteina e grasso sono, rispettivamente, 3,33% e 3,87 %. Tali percentuali sono perfettamente allineate con quelle relative alla media di produzione di latte vaccino della razza Frisona Italiana in Italia per l'anno 2022: 3,35% e 3,85%, rispettivamente (ANAFIJ 2022). Da un riscontro in letteratura in relazione a studi eseguiti su latte bovino di massa, è possibile svolgere un confronto con i valori ottenuti nel presente elaborato: Benedet et al., (2018) riporta un contenuto di grasso pari a 3,86%, un valore di proteina di 3,34% e 2,58% di caseina, del tutto in linea con i dati ottenuti nel presente elaborato. Stürmer et al., (2018) riporta valori di solidi totali e solidi non grassi pari, rispettivamente, a 12,64% e 8,70%, molto simili a quelli ottenuti in questo studio ovvero 12,48% e 8,71%. Anche il valore di lattosio ottenuto nel presente studio, è in

linea con quanto riportato in letteratura da Yang et al., (2020). Si osserva, inoltre, un punto di congelamento pari a -520,77 °mC, dato in accordo con quanto stabilito dai limiti di legge. Infine, il valore medio di urea ottenuto nel presente elaborato è di 26,50 g/dL, in linea con quanto osservato da Benedet et al. (2018).

4.2. EFFETTO DEI DIVERSI ADULTERANTI SULLA COMPOSIZIONE DEL LATTE

Tabella 3 – Medie dei minimi quadrati delle componenti del latte, valutate attraverso FT-MIR, di campioni con diversi adulteranti a differenti concentrazioni

Adulteranti	Concentrazione (%)	Grasso (%)	Proteina (%)	Lattosio (%)	Solidi totali (%)	Solidi non grassi (%)	Caseina (%)	Urea (g/dL)	Punto crioscopico (°mC)
Urea	0	3.90^{a}	3.35^{d}	4.73^{d}	12.54^{c}	8.75^{d}	2.60^{d}	26.35^{d}	-521.66^{d}
	0.0125	3.87^{b}	3.36^{c}	4.75^{c}	12.55^{c}	8.78^{c}	2.62^{c}	34.13^{c}	-525.32^{b}
	0.025	3.88^{b}	3.37^{b}	4.76^{b}	12.57^{b}	8.81^{b}	2.63^{b}	41.79^{b}	-528.81^{c}
	0.050	3.87^{b}	3.38^{a}	4.78^{a}	12.61^{a}	8.86^{a}	2.65^{a}	55.97^{a}	-535.42^{a}
Acqua	0	3.89^{a}	3.35^{a}	4.73^{a}	12.54^{a}	8.74^{a}	2.60^{a}	26.25^{a}	-521.49^{a}
	1.600	3.84^{b}	3.29^{b}	4.66^{b}	12.34^{b}	8.6^{b}	2.56^{b}	25.73^{b}	-512.31^{c}
	3.200	3.77^{c}	3.24^{c}	4.58^{c}	12.13^{c}	8.45^{c}	2.51^{c}	25.24^{b}	-502.65^{b}
	6.400	3.64^{d}	3.13^{d}	4.45^{d}	11.73^{c}	8.18^{d}	2.43^{d}	24.6^{c}	-485.02^{a}
Sodio citrato	0	3.90^{c}	3.35^{d}	4.73^{a}	12.54^{d}	8.75^{d}	2.60^{d}	26.36^{d}	-521.63^{d}
	0.019	3.91^{c}	3.36^{c}	4.69^{b}	12.6^{c}	8.83^{c}	2.63^{c}	27.50^{c}	-518.52^{b}
	0.038	3.94^{b}	3.37^{b}	4.65^{c}	12.66^{b}	8.9^{b}	2.65^{b}	28.61^{b}	-514.89^{c}
	0.076	3.99^{a}	3.38^{a}	4.59^{d}	12.75^{a}	8.99^{a}	2.67^{a}	30.34^{a}	-507.79^{a}
Cloruro di sodio	0	3.89^{a}	3.35^{d}	4.73^{b}	12.54^{a}	8.75^{d}	2.60^{d}	26.25^{d}	-521.94^{d}
	0.075	3.86^{b}	3.35^{c}	4.73^{ab}	12.52^{b}	8.76^{c}	2.61^{c}	27.66^{c}	-564.97^{c}
	0.150	3.86^{bc}	3.36^{b}	4.74^{ab}	12.52^{b}	8.77^{b}	2.61^{b}	28.85^{b}	-607.29^{b}
	0.300	3.84^{c}	3.36^{a}	4.74^{a}	12.51^{b}	8.79^{a}	2.62^{a}	31.65^{a}	-691.86^{a}
Bicarbonato di sodio	0	3.90^{a}	3.35^{a}	4.73^{c}	12.54^{a}	8.74^{a}	2.60^{a}	26.25^{a}	-521.79^{d}
	0.005	3.87^{b}	3.35^{a}	4.74^{ac}	12.53^{b}	8.74^{b}	2.60^{b}	25.78^{ab}	-544.18^{c}
	0.010	3.86^{b}	3.34^{b}	4.75^{b}	12.53^{b}	8.73^{c}	2.59^{c}	25.33^{ab}	-565.76^{b}
	0.020	3.85^{b}	3.33^{c}	4.76^{a}	12.53^{b}	8.7^{d}	2.57^{d}	24.59^{c}	-609.15^{a}
Idrossiprolina	0	3.90^{a}	3.35^{d}	4.73	12.54^{b}	8.74^{d}	2.60^{d}	26.22^{b}	-521.74^{c}
	0.007	3.87^{b}	3.36^{c}	4.73	12.53^{b}	8.76^{c}	2.61^{c}	26.44^{b}	-543.44^{bc}
	0.014	3.87^{b}	3.36^{b}	4.73	12.54^{ab}	8.76^{b}	2.62^{b}	26.66^{b}	-564.73^{b}
	0.028	3.87^{b}	3.37^{a}	4.73	12.55^{a}	8.78^{a}	2.63^{a}	27.25^{a}	-607.23^{a}
Glucosio	0	3.90^{a}	3.35	4.73^{d}	12.54^{c}	8.74^{d}	2.60	26.22^{a}	-521.76^{d}
	0.031	3.87^{b}	3.35	4.76^{c}	12.55^{c}	8.77^{c}	2.60	25.65^{b}	-544.14^{b}
	0.062	3.87^{b}	3.35	4.79^{b}	12.59^{b}	8.78^{b}	2.60	25.05^{c}	-566.10^{c}
	0.124	3.88^{b}	3.35	4.85^{a}	12.66^{a}	8.81^{a}	2.60	23.83^{d}	-610.05^{a}

^{a,b,c,d} diverse lettere ad apice indicano differenze significative ls-means ($P < 0.05$)

In Tabella 3 vengono presentate le medie dei minimi quadrati relative all'effetto che ciascuna sostanza adulterante, a differenti concentrazioni, determina sulla composizione dei campioni di latte determinata attraverso FT-MIR.

Per stabilire l'effetto dell'adulterazione a vari livelli sulla composizione del latte, si sono considerati i campioni di controllo non adulterati (rappresentati in Tabella 3 dal livello di concentrazione pari a 0%). I parametri compositivi del latte indagati sono: grasso, proteina, lattosio, solidi totali, solidi non grassi, caseina, urea e punto crioscopico.

L'urea nel latte viene generalmente aggiunta al fine di incrementarne l'apparente contenuto proteico e per aumentare o standardizzare i livelli di solidi non grassi. Dai dati ottenuti si può confermare questa tendenza poiché all'aumentare della concentrazione di urea si osserva un aumento lineare di proteina e solidi non grassi. In particolare, si riscontra un aumento significativo di questi due parametri già alla minima concentrazione di urea aggiunta (0.0125%). Tali risultati sono in linea con lo studio condotto da Renny et al., (2005) in cui emerge che un aumento nella concentrazione di urea aggiunta risulta in un corrispondente aumento nella predizione FT-MIR dei solidi non grassi. Una diminuzione significativa si osserva per il tenore di grasso al minimo livello di adulterazione con urea ma tale riduzione non è lineare all'aumento di urea aggiunta; infatti, ad una concentrazione di urea pari a 0.0125% si è osservato un valore di grasso del tutto identico a quello ottenuto per una concentrazione di urea pari a 0.050% (quattro volte superiore al primo livello di adulterazione). In accordo con il presente elaborato, Yang et al., (2020) sottolinea una relazione negativa tra l'adulterazione con urea e il contenuto di grasso. Dallo stesso studio, tuttavia, emerge un dato discordante rispetto a quanto discusso precedentemente: gli autori riscontrano che il contenuto proteico predetto su campioni addizionati con urea è correlato in modo negativo con il livello di adulterazione, pertanto, all'aumento della concentrazione di adulterante corrisponde una diminuzione del valore predetto di proteina mentre, nel presente elaborato, a tale aumento segue un incremento significativo e lineare di proteina.

Per quanto concerne l'adulterazione con urea si osserva un aumento significativo e lineare del contenuto di lattosio e di caseina all'aumentare della concentrazione di urea. Si riscontra, inoltre, un incremento significativo dei solidi totali e una riduzione del punto di congelamento a partire da un livello di adulterazione pari a 0.025% mentre al livello inferiore (0.0125%) non si osservano cambiamenti significativi di questi due parametri. L'adulterazione con urea determina, pertanto, un impatto significativo su tutte le componenti del latte prese in esame già al livello più basso di concentrazione con la sola eccezione dei solidi totali e del punto crioscopico, parametri per i quali è necessaria una concentrazione più elevata affinché si possano osservare cambiamenti significativi.

L'aggiunta di acqua nel latte, conosciuta come pratica fraudolenta dell'annacquamento, viene utilizzata per aumentare il volume del prodotto finale ma ciò comporta inevitabilmente una diluizione delle componenti del latte.

Questo aspetto lo si può osservare nei risultati ottenuti per tutti i parametri compositivi considerati nel presente elaborato a partire dalla minima concentrazione di acqua aggiunta (1.6%). L'effetto di diluizione determina cali significativi per le diverse componenti del latte e tali riduzioni risultano significative e lineari all'aumento della concentrazione di acqua aggiunta, si osserva solamente che il contenuto di urea non cala in modo significativo passando da un livello di adulterazione pari a 1.6% a 3.2% di acqua. I dati di maggior interesse nell'adulterazione del latte con acqua riguardano il punto di congelamento che aumenta in modo significativo all'aumentare dell'acqua aggiunta. Uno studio condotto da Nascimento et al., 2013) dimostra che l'annacquamento del latte determina un punto di congelamento che tende ad avvicinarsi a quello dell'acqua pura (0°C), questa considerazione è del tutto coerente con i dati riportati in questo elaborato. Dallo stesso studio emerge che il punto crioscopico diminuisce invece quando sali come il cloruro di sodio vengono addizionati al latte, lo stesso effetto si può ottenere dall'aggiunta di altre sostanze quali glucosio e bicarbonato di sodio.

Esaminando l'effetto che i diversi adulteranti determinano sul punto crioscopico emerge che la quasi totalità degli adulteranti testati hanno determinato un cambiamento significativo del punto di congelamento alla minima concentrazione. L'unica eccezione si è osservata per l'idrossiprolina la quale non influenza significativamente il punto crioscopico al livello minimo di adulterazione (0.007%) ma solamente ad una concentrazione maggiore (0.014%). In particolare, si osserva una riduzione piuttosto significativa del punto crioscopico per effetto dell'adulterazione con cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e glucosio; il punto di congelamento, pertanto, diminuisce linearmente all'aumento della concentrazione dei tre adulteranti considerati. Tali osservazioni sono in linea con gli studi di Nascimento et al., (2013). Inoltre, da un lavoro condotto da Yang et al., (2020) emerge, coerentemente con quanto riportato nel presente elaborato, una correlazione tra l'aumento di concentrazione di glucosio e una riduzione del punto di congelamento. Gli stessi autori sottolineano che generalmente l'aggiunta di conservanti nel latte (come bicarbonato di sodio o sodio citrato) determina una riduzione del punto crioscopico. Osservando i risultati ottenuti nel presente studio si può confermare tale aspetto per quanto riguarda il bicarbonato di sodio ma si osserva un trend del tutto opposto per il sodio citrato. Nello specifico, i risultati presentati nel presente studio per l'adulterazione con sodio citrato, evidenziano un incremento significativo e lineare del punto crioscopico del latte già ad un livello minimo di contaminazione (0.019%), effetto molto simile a quanto si è osservato nel caso dell'annacquamento. Per quanto riguarda l'aggiunta di cloruro di sodio, al livello minimo di adulterazione (0.075%) si evidenzia un aumento significativo nella predizione del contenuto di proteina, solidi non grassi, caseina e urea e una riduzione significativa del contenuto predetto di grasso e solidi totali mentre è richiesta una concentrazione maggiore (0.300%) per osservare un aumento significativo di lattosio. Le osservazioni di maggior interesse per

l'adulterazione con cloruro di sodio riguardano sicuramente l'effetto sul punto crioscopico. Come precedentemente accennato, per livelli di adulterazione crescenti di cloruro di sodio si evidenzia una riduzione significativa e lineare del punto di congelamento per il quale si osserva un notevole calo già alla minima concentrazione di adulterante aggiunto. È possibile riscontrare un effetto del tutto simile sul punto di congelamento per altri adulteranti considerati quali bicarbonato di sodio e glucosio.

Come per il cloruro di sodio, l'adulterazione con idrossiprolina e bicarbonato di sodio determina un effetto minimo sulla predizione della composizione del latte. Per quanto riguarda l'idrossiprolina, gli effetti maggiori si possono osservare sul punto crioscopico: nonostante alla minima concentrazione (0.007%) non si osservino effetti del tutto significativi, per livelli di adulterazione superiori (0.014% e 0.028%) è possibile apprezzare un calo significativo del punto di congelamento paragonabile a quanto osservato per altri adulteranti già citati come cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e glucosio. Si riscontra una riduzione significativa del contenuto di grasso predetto per il livello minimo di adulterazione di idrossipriolina ma tale diminuzione non è lineare all'aumento della concentrazione dell'adulterante, tendenza del tutto simile con quanto osservato per l'adulterazione con urea. Si sottolinea, in particolare, che per generare un effetto significativo sui solidi totali e sull'urea è richiesto il livello massimo di adulterazione pari a 0.028%. È possibile osservare, inoltre, un lineare e significativo, seppure piuttosto contenuto, incremento dei parametri di proteina, solidi non grassi e caseina all'aumentare della concentrazione di idrossiprolina. Un effetto piuttosto simile si è riscontrato nel caso dell'adulterazione con cloruro di sodio.

Il sodio citrato influenza in modo piuttosto notevole e positivo tutti i parametri di composizione del latte presi in esame già a partire dalla concentrazione minima (0.019%). Le uniche eccezioni riguardano il tenore di grasso predetto per il quale è richiesto un livello di adulterazione superiore (0.038%) per apprezzarne un effetto significativo e il lattosio predetto per il quale invece si osserva un trend decrescente all'aumentare della concentrazione di adulterante.

In uno studio condotto da Cassoli et al., (2011) viene valutato l'effetto che l'adulterazione con sodio citrato determina su diverse componenti del latte a concentrazioni molto simili a quelle considerate nel presente elaborato (0.025%, 0.050%, 0.075%). Gli autori non riscontrano cambiamenti significativi nei parametri di grasso, proteina, solidi totali, caseina e urea fino al livello massimo di adulterazione di sodio citrato (0.075%) ma solamente una riduzione significativa del FP a partire da una concentrazione di 0.050%. Questi risultati non sono coerenti con quelli ottenuti nel presente studio: come già accennato, infatti, il sodio citrato ha determinato un significativo aumento del punto

crioscopico già ad una concentrazione piuttosto ridotta (0.019%) e ha influenzato notevolmente la composizione del latte.

Nello studio di Cassoli et al., (2011) è stato valutato anche l'effetto dell'aggiunta di bicarbonato di sodio nel latte per concentrazioni pari a 0.05%, 0.10% e 0.15%. Tali livelli, tuttavia, si discostano notevolmente da quelli presi in esame nel presente elaborato. Gli autori non osservano variazioni significative per i parametri di grasso, proteina, solidi totali e caseina fino al livello massimo di adulterazione di bicarbonato di sodio, viene riscontrata una riduzione dell'urea e del punto di congelamento a partire dalla minima concentrazione di adulterante. Dai risultati ottenuti in questo elaborato si può confermare il trend decrescente del punto crioscopico e parzialmente la riduzione di urea dal momento che è possibile osservarne un calo significativo solamente al livello massimo di adulterazione pari a 0.020% (concentrazione che però risulta essere inferiore rispetto al livello minimo di bicarbonato di sodio presentato dagli autori ovvero 0.050%). Dal presente studio emerge che l'adulterazione con bicarbonato di sodio ha determinato un discreto effetto sulla predizione della composizione del latte. Alla minima concentrazione di adulterante pari a 0.005% si apprezza un calo significativo nella predizione del contenuto di grasso, solidi totali, solidi non grassi e caseina. Si riscontrano, in particolare, delle diminuzioni significative e lineari per i solidi non grassi e caseina all'aumentare della concentrazione di bicarbonato di sodio mentre riduzioni significative di grasso predetto e solidi totali si osservano solamente al livello minimo di adulterante, concentrazioni maggiori non comportano ulteriori cali significativi per questi due parametri. Si evidenzia, inoltre, un incremento del valore di lattosio a partire da una concentrazione di 0.010% di bicarbonato di sodio, alla stessa concentrazione si registra un calo significativo del contenuto proteico predetto.

La discrepanza di risultati tra il presente elaborato e lo studio di Cassoli et al., (2011) può essere dovuta all'utilizzo di un diverso approccio statistico per esaminare le differenze delle diverse componenti del latte, valutate attraverso FT-MIR, tra campioni di latte crudo adulterato e non adulterato.

Infine, si può affermare che l'adulterazione con glucosio influenza in modo piuttosto significativo il contenuto di lattosio. Si apprezza, infatti, un aumento significativo di lattosio già al minimo livello di adulterazione (0.031%); inoltre, per concentrazioni crescenti di glucosio è possibile riscontrare un aumento significativo e lineare del tenore di lattosio predetto. In accordo con il presente elaborato, Yang et al., (2020) evidenzia una correlazione positiva tra l'adulterazione del latte con glucosio e l'incremento di valore del lattosio. Si sottolinea, inoltre, che alla minima concentrazione di adulterante aggiunto si verifica un calo notevole del tenore di grasso e urea mentre si registra un aumento significativo dei solidi non grassi. I solidi totali vengono influenzati dall'aggiunta di

glucosio ma non dal livello di adulterazione più basso, si osserva infatti un incremento significativo a partire da una concentrazione di 0.062% di glucosio. Il tenore di grasso non diminuisce in modo lineare all'aumento di glucosio aggiunto, questo effetto si è già osservato per altri adulteranti quali idrossiprolina, bicarbonato di sodio e urea.

4.3. MODELLI DI PREDIZIONE

Tabella 4 – Performance dell'analisi discriminante effettuata su latte bovino di massa per la rilevazione di sette adulteranti

Adulteranti	Concentrazione (%)	True positives	True negatives	False positives	False negatives	Precision	Recall	Accuracy	F1-score
Urea	0.0125	37	34	4	1	0.90	0.97	0.93	0.93
	0.0250	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.0500	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
Acqua	1.600	23	28	10	14	0.70	0.62	0.68	0.66
	3.200	30	33	5	8	0.86	0.79	0.83	0.82
	6.400	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
Sodio citrato	0.019	37	38	0	1	1.00	0.97	0.99	0.99
	0.038	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.076	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
Cloruro di sodio	0.075	37	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.150	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
	0.300	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
Bicarbonato di sodio	0.005	30	24	14	8	0.68	0.79	0.71	0.73
	0.010	34	34	4	4	0.89	0.89	0.89	0.89
	0.020	38	38	0	0	1.00	1.00	1.00	1.00
Idrossiprolina	0.007	26	11	27	12	0.49	0.68	0.49	0.57
	0.014	26	11	27	12	0.49	0.68	0.49	0.57
	0.028	30	21	17	8	0.64	0.79	0.67	0.71
Glucosio	0.031	35	30	8	3	0.81	0.92	0.86	0.86
	0.062	36	31	7	0	0.84	1.00	0.91	0.91
	0.124	38	37	1	0	0.97	1.00	0.99	0.99

In Tabella 4 si riportano i risultati relativi a differenti indicatori di performance dell'analisi discriminante al fine di valutare la capacità del modello di rilevare la presenza di adulteranti a diversi livelli di concentrazione.

Sono stati considerati alcuni indicatori quali true positives (TP), true negatives (TN), false positives (FP) e false negatives (FN); sulla base di questi sono stati calcolati altri parametri come precision, recall, accuracy e F1 score.

TP e TN vengono definiti come i risultati per cui il modello considerato prevede correttamente la classe positiva e la classe negativa, rispettivamente; al contrario, FP e FN indicano i risultati in cui il modello prevede erroneamente la classe positiva e quella negativa, rispettivamente.

La precisione indica quale proporzione di identificatori positivi è effettivamente corretta, misura quindi la probabilità che l'osservazione sia effettivamente positiva quando un classificatore ne prevede la positività. Il richiamo (recall) indica invece quale proporzione di identificatori effettivamente positivi è stata identificata correttamente, misura quindi la probabilità che un'osservazione positiva venga riconosciuta. L'accuratezza rappresenta un parametro di notevole interesse per l'analisi discriminante poiché indica quale porzione della previsione è corretta mentre F1 score viene definito come la media armonica tra precisione e richiamo, tale valore sarà tanto maggiore quanto più precision e recall sono simili tra loro.

Dai risultati ottenuti, ponendo particolare attenzione all'accuratezza, si può affermare che il modello statistico sviluppato ha permesso di rilevare e identificare correttamente campioni adulterati con urea, sodio citrato e cloruro di sodio per concentrazioni pari, rispettivamente, a 0.025%, 0.038% e 0.075%. In particolare, per sodio citrato e cloruro di sodio si sono ottenuti valori di accuratezza ottimali per livelli minimi di contaminazione: ad una concentrazione di 0.019% di sodio citrato il modello ha mostrato un valore di accuracy del tutto soddisfacente (0.99) mentre valori ottimali (1.00) si sono ottenuti a concentrazioni superiori; per campioni adulterati con cloruro di sodio i risultati ottenuti sono ancora più soddisfacenti in quanto si è ottenuta un'accuratezza ottimale fin dal livello di contaminazione più basso (0.075%).

I risultati migliori si sono ottenuti per i campioni adulterati con cloruro di sodio, il modello sviluppato ha infatti mostrato un'ottima capacità di identificare questo tipo di adulterazione a partire da una concentrazione pari a 0.075%. Il modello è stato completamente in grado di discriminare tra campioni adulterati e non adulterati, si può osservare che dal livello di contaminazione più basso non sono stati registrati né falsi positivi né falsi negativi determinando valori ottimali di precision, recall, accuracy e F1 score.

Al contrario, i risultati peggiori sono stati registrati per l'idrossiprolina. Il modello presentato non è stato in grado di identificare completamente questo tipo di adulterazione per i livelli di concentrazione considerati. Ad una concentrazione di 0.007% il tasso di falsi positivi e falsi negativi è piuttosto alto (FP:27; FN:12) determinando scarsi risultati per precisione, richiamo e accuratezza; valori del tutto identici si sono ottenuti per il livello di concentrazione successivo (0.014%). Hansen & Holroyd, (2019) hanno studiato l'adulterazione nel latte con idrossiprolina a differenti concentrazioni ottenendo un valore ottimale di accuratezza ad una concentrazione di 0.1425% di idrossiprolina, percentuale di molto superiore rispetto a quelle considerate in questo elaborato e quasi cinque volte superiore al livello massimo di adulterazione di questo studio, ovvero 0.028%, livello per il quale si è riusciti ad ottenere un valore di accuratezza complessivo pari a 0.67.

Il modello statistico mostra un'ottima capacità discriminante per campioni adulterati con urea, infatti, al livello minimo di concentrazione pari a 0.0125% il valore di accuratezza è molto elevato (0.93). Hansen & Holroyd, (2019) hanno esaminato anche l'adulterazione del latte con urea a diverse concentrazioni. Dal loro studio emerge un'accuratezza ottimale ad una concentrazione di urea di 0.055% molto simile al livello massimo del presente elaborato (0.050%); tuttavia, il presente elaborato dimostra come il modello sviluppato ha permesso una completa identificazione dei campioni adulterati con urea ad una concentrazione di 0.025% (valore di accuracy massimo pari a 1.00). Altri riscontri in letteratura confermano la validità dei risultati ottenuti per l'adulterazione con urea: Santos et al., (2013) ha sviluppato un modello in grado di discriminare campioni di latte non adulterato da latte adulterato consentendo di identificare la sofisticazione del latte con urea a concentrazioni superiori a 0.78 g/L (0.078%). Dallo stesso studio emerge che una concentrazione di urea pari a 1.25% può essere predetta utilizzando la spettroscopia nel medio-infrarosso con un coefficiente di determinazione (R^2) pari a 0.98.

Discreti risultati si sono ottenuti per quanto riguarda l'annacquamento. A basse concentrazioni di acqua aggiunta (1.6% e 3.2%) si registrano buoni valori di accuracy pari, rispettivamente, a 0.68 e 0.83. I risultati indicano che è possibile ottenere una discriminazione completa dei campioni addizionati con acqua ad una concentrazione pari a 6.4%, per tale livello infatti il modello non registra falsi positivi o falsi negativi e si osserva un valore ottimale di accuratezza. Si può affermare che per generare un cambiamento nello spettro sufficiente ad ottenere valori accettabili di accuratezza è necessaria una concentrazione piuttosto elevata di acqua (6.4%); questo aspetto era prevedibile e si spiega dal fatto che quei composti simili ai componenti del latte (è il caso dell'acqua appunto o del siero) risultano più difficili da rilevare. Si può osservare che, nel caso dell'acqua, i tre livelli di concentrazione sono piuttosto elevati se confrontati con quelli degli altri adulteranti e che solamente a concentrazioni maggiori si riescono ad ottenere risultati soddisfacenti in termini di accuratezza.

Una tendenza piuttosto simile a quella dell'acqua la si può osservare per il bicarbonato di sodio. Tale adulterazione viene correttamente rilevata ad una concentrazione pari a 0.020%, il modello sviluppato infatti mostra un'accuratezza ottimale mentre valori inferiori si sono ottenuti per concentrazioni minori: accuracy pari a 0.89 per 0.010% di bicarbonato di sodio, ad una concentrazione di 0.005% l'accuratezza si attesta a 0.71. Gondim et al., (2017) riporta un valore di recall pari a 0.69 per una concentrazione di 0.004% di bicarbonato di sodio, in questo elaborato ad una concentrazione molto simile (0.005%) si è ottenuto un valore più elevato di recall pari a 0.79.

Il modello proposto non è stato in grado di identificare completamente campioni adulterati con glucosio, si sottolineano comunque valori del tutto soddisfacenti di accuracy per i diversi livelli di

contaminazione. Ad una concentrazione di 0.124% di glucosio il modello registra un solo FP e nessun FN determinando un valore piuttosto soddisfacente di accuratezza che si attesta a 0.99, valori leggermente inferiori si osservano a concentrazioni pari a 0.062% (0.91) e 0.031% (0.86). In uno studio condotto da Kamboj, Kaushal, & Jabeen, (2020), utilizzando la procedura PLS Regression modle sfruttando la spettroscopia NIR, è stato sviluppato un modello che ha mostrato un buon valore di accuratezza per la predizione dell'adulterazione del latte con zucchero. Nello specifico, si è osservato che per diversi livelli di adulterazione di glucosio il coefficiente di correlazione era superiore al 90% (0.90); questo valore risulta essere coerente con quelli presentati in questo elaborato, in particolare per i valori di accuracy pari a 0.91 e 0.99 ottenuti per concentrazioni di glucosio di 0.062% e 0.124%, rispettivamente.

5. CONCLUSIONI

Nel presente elaborato si è studiato l'effetto di diversi adulteranti sulla predizione FT-MIR dei parametri compositivi del latte ed è stata valutata la capacità della spettroscopia FT-MIR di rilevare la presenza di sostanze adulteranti nel latte di massa a differenti livelli di contaminazione.

I risultati ottenuti indicano che fin dai livelli minimi di concentrazione di diversi adulteranti si è osservato un impatto significativo sulla composizione del latte. Si registrano, nello specifico, cambiamenti significativi nella predizione del tenore di grasso, proteina, caseina e dei solidi non grassi. Si è riscontrato, in modo particolare, un impatto notevole sul punto crioscopico per effetto dell'aggiunta degli adulteranti considerati, specialmente nel caso dell'acqua, sodio citrato, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e glucosio. Infine, si può affermare che urea, acqua, sodio citrato e cloruro di sodio sono gli adulteranti che hanno determinato effetti maggiormente significativi sulla composizione del latte.

Il modello sviluppato per l'identificazione dell'aggiunta di adulteranti nel latte ha mostrato una capacità discriminante ottimale per latte adulterato con cloruro di sodio e sodio citrato. Dall'analisi discriminante emerge che il modello proposto è stato in grado di identificare correttamente l'adulterazione con urea, acqua e bicarbonato di sodio a concentrazioni pari a 0.025%, 6.4% e 0.020%, rispettivamente. L'adulterazione con glucosio non è stata pienamente identificata dal modello a basse concentrazioni ma si sottolineano comunque dei risultati del tutto soddisfacenti per il livello massimo di adulterazione (0.124%) per cui il valore di accuratezza è ottimale (0.99). Al contrario, i risultati peggiori si evidenziano per l'idrossiprolina con valore massimo di accuratezza di 0.67.

Tale studio ha proposto, pertanto, un modello in grado di rilevare l'adulterazione nel latte con risultati più che soddisfacenti, mediante spettroscopia FT-MIR. Si è dimostrato che l'aggiunta di adulteranti determina cambiamenti significativi nella predizione della composizione del latte causando problematiche relative alla qualità delle produzioni all'interno del settore lattiero-caseario. Il modello sviluppato può offrire un approccio veloce e innovativo per identificare l'adulterazione fornendo un supporto per l'intera industria alimentare al fine di contrastare le pratiche fraudolente che non solo possono condurre a problematiche in termini economici e di qualità ma possono rappresentare concretamente un pericolo per la salute dei consumatori.

6. BIBLIOGRAFIA

Abd El-Gawad M.A.M., Ahmed N.S., 2011. Cheese yield as affected by some parameters. Review. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 10(2), 131-153

Abernethy, G., & Higgs, K. (2013). Rapid detection of economic adulterants in fresh milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1288*, 10–20. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.022

Abin, S., Visser, C., & Banga, C. B. (2018). Comparative performance of dairy cows in low-input smallholder and high-input production systems in South Africa. *Tropical Animal Health and Production*, *50*(7), 1479–1484. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1584-9

Afzal, A., Mahmood, M. S., Hussain, I., & Akhtar, M. (2011). Adulteration and Microbiological Quality of Milk (A Review). *Pakistan Journal of Nutrition*, *10*(12), 1195–1202. https://doi.org/10.3923/pjn.2011.1195.1202

Agelet, L. E., & Hurburgh, C. R. (2010). A Tutorial on Near Infrared Spectroscopy and Its Calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *40*(4), 246–260. https://doi.org/10.1080/10408347.2010.515468

Ahmed, A. S., Rahmatalla, S., Bortfeldt, R., Arends, D., Reissmann, M., & Brockmann, G. A. (2017). Milk protein polymorphisms and casein haplotypes in Butana cattle. *Journal of Applied Genetics*, *58*(2), 261–271. https://doi.org/10.1007/s13353-016-0381-2

ANAFIBJ - Associazione Nazionale Allevatori della Razza Frisona, Bruna e Jersey Italiana. Medie produzioni latte/grasso/proteine. Vacche controllate razza frisona 2022

Andrade, J., Pereira, C. G., Almeida Junior, J. C. de, Viana, C. C. R., Neves, L. N. de O., Silva, P. H. F. da, Bell, M. J. V., & Anjos, V. de C. dos. (2019). FTIR-ATR determination of protein content to evaluate whey protein concentrate adulteration. *LWT*, *99*, 166–172. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.079

Andrade, J., Pereira, C. G., Ranquine, T., Azarias, C. A., Bell, M. J. V., & de Carvalho dos Anjos, V. (2018). Long-Term Ripening Evaluation of Ewes' Cheeses by Fourier-Transformed Infrared Spectroscopy under Real Industrial Conditions. *Journal of Spectroscopy*, *2018*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2018/1381864

André, J., & Lawler, I. (2003). Near infrared spectroscopy as a rapid and inexpensive means of dietary analysis for the marine herbivore, dugong Dugong dugon. *Marine Ecology Progress Series*, *257*, 259–266. https://doi.org/10.3354/meps257259

Azad, T., & Ahmed, S. (2016). Common milk adulteration and their detection techniques. *International Journal of Food Contamination*, *3*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s40550-016-0045-3

Banks, J. M., Muir, D. D., Banks, W., & Wilson, A. G. (1981). Cheese yield: Composition does matter. *Dairy Industries International*, *46*, 15.

Barbano, D. M., Ma, Y., & Santos, M. V. (2006). Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, *89*, E15–E19. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72360-8

Benedet, A., Manuelian, C. L., Penasa, M., Cassandro, M., Righi, F., Sternieri, M., Galimberti, P., Zambrini, A. V., & De Marchi, M. (2018). Factors associated with herd bulk milk composition and technological traits in the Italian dairy industry. *Journal of Dairy Science*, *101*(2), 934–943. https://doi.org/10.3168/jds.2017-12717

Bittante, G., Ramanzin, M., & Andrighetto, I. (2005). *Tecniche di produzione animale* (Nuova ed). Liviana.

Bobbo, T., Ruegg, P. L., Fiore, E., Gianesella, M., Morgante, M., Pasotto, D., Gallo, L., Bittante, G., & Cecchinato, A. (2017). Short communication: Association between udder health status and blood serum proteins in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 9775–9780. https://doi.org/10.3168/jds.2017-13111

Botaro, B. G., Gameiro, A. H., & Santos, M. V. dos. (2013). Quality based payment program and milk quality in dairy cooperatives of Southern Brazil: An econometric analysis. *Scientia Agricola*, *70*, 21–26.

Brandão, M., Carmo, A. P., Bell, M. J. V., & Anjos, V. C. (2010). Characterization of milk by infrared spectroscopy. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, *65*(373), 30–33.

Brereton, R. G. (2007). *Applied Chemometrics for Scientists* (1ª ed.). Wiley. https://doi.org/10.1002/9780470057780

Brown, G. (2013). Quality Control using NIR/MIR Spectroscopy: A Rotten Apple Could Turn Your Product into a Lemon. *IICA Tech Night Presentation*, *9*.

Cabras, P., & Martelli, A. (2004). *Chimica degli alimenti: Nutrienti, alimenti di origine vegetale. alimenti di origine animale, integratori alimentari, bevande, sostanze indesiderabili*. Piccin.

Cassoli, L. D., Sartori, B., & Machado, P. F. (2011). The use of the Fourier Transform Infrared spectroscopy to determine adulterants in raw milk. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *40*, 2591–2596.

Cassoli, L. D., Sartori, B., Zampar, A., & Machado, P. F. (2011). An assessment of Fourier Transform Infrared spectroscopy to identify adulterated raw milk in Brazil. *International Journal of Dairy Technology*, *64*(4), 480–485. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00711.x

Cavin, C., Cottenet, G., Blancpain, C., Bessaire, T., Frank, N., & Zbinden, P. (2016). Food Adulteration: From Vulnerability Assessment to New Analytical Solutions. *CHIMIA*, *70*(5), 329. https://doi.org/10.2533/chimia.2016.329

Cipolat-Gotet, C., Cecchinato, A., De Marchi, M., & Bittante, G. (2013). Factors affecting variation of different measures of cheese yield and milk nutrient recovery from an individual model cheese-manufacturing process. *Journal of Dairy Science*, *96*(12), 7952–7965. https://doi.org/10.3168/jds.2012-6516

Coates, J. (1998). Vibrational Spectroscopy: Instrumentation for Infrared and Raman Spectroscopy∗. *Applied Spectroscopy Reviews*, *33*(4), 267–425. https://doi.org/10.1080/05704929808002060

Cortez, M. A. S., Duarte, M. C. K. H., & de Melo, L. R. B. (2022). Relevant factors for raw milk quality for dairy foods manufacture. In *Dairy Foods* (pp. 1–17). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820478-8.00007-9

Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusic, V., & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *85*, 123–132. https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.026

Dankowska, A., Małecka, M., & Kowalewski, W. (2015). Detection of plant oil addition to cheese by synchronous fluorescence spectroscopy. *Dairy Science & Technology*, *95*(4), 413–424. https://doi.org/10.1007/s13594-015-0218-5

De La Fuente, M. A., & Juárez, M. (2005). Authenticity Assessment of Dairy Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(7–8), 563–585. https://doi.org/10.1080/10408690490478127

De Marchi, M., Penasa, M., Zidi, A., & Manuelian, C. L. (2018). Invited review: Use of infrared technologies for the assessment of dairy products—Applications and perspectives. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 10589–10604. https://doi.org/10.3168/jds.2018-15202

De Marchi, M., Toffanin, V., Cassandro, M., & Penasa, M. (2014). Invited review: Mid-infrared spectroscopy as phenotyping tool for milk traits. *Journal of Dairy Science*, *97*(3), 1171–1186. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6799

Dekkers, J. C. M., Van Erp, T., & Schukken, Y. H. (1996). Economic Benefits of Reducing Somatic Cell Count Under the Milk Quality Program of Ontario. *Journal of Dairy Science*, *79*(3), 396–401. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76378-6

Draaiyer, J., Dugdill, B., Bennett, A., & Mounsey, J. (2009). Milk testing and payment systems. Resource book: A practical guide to assist milk producer groups. *Milk testing and payment systems. Resource book: a practical guide to assist milk producer groups.*

EFSA 2008 Statement of EFSA on risks for public health due to the presence of melamine in infant milk and other milk products in China. European Food Safety Authority, 24 September 2008. *The* EFSA *Journal* **807** 1-10.

Ellis, D. I., Brewster, V. L., Dunn, W. B., Allwood, J. W., Golovanov, A. P., & Goodacre, R. (2012). Fingerprinting food: Current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews*, *41*(17), 5706. https://doi.org/10.1039/c2cs35138b

Etzion, Y., Linker, R., Cogan, U., & Shmulevich, I. (2004). Determination of Protein Concentration in Raw Milk by Mid-Infrared Fourier Transform Infrared/Attenuated Total Reflectance Spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, *87*(9), 2779–2788. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73405-0

Federal University of Juiz De Fora, & Anjos, V. (2020). Near And Mid Infrared Spectroscopy To Assess Milk Products Quality: A Review Of Recent Applications. *Journal of Dairy Research & Technology*, *3*(1), 1–10. https://doi.org/10.24966/DRT-9315/100014

Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org. Accessed 10.01.16

Fischer, W. J., Schilter, B., Tritscher, A. M., & Stadler, R. H. (2011). CONTAMINANTS OF MILK AND DAIRY PRODUCTS | Contamination Resulting from Farm and Dairy Practices. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 887–897). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00104-7

Foley, W. J., McIlwee, A., Lawler, I., Aragones, L., Woolnough, A. P., & Berding, N. (1998). Ecological applications of near infrared reflectance spectroscopy—A tool for rapid, cost-effective prediction of the composition of plant and animal tissues and aspects of animal performance. *Oecologia*, *116*(3), 293–305. https://doi.org/10.1007/s004420050591

Geary, U., Lopez-Villalobos, N., Begley, N., McCoy, F., O'Brien, B., O'Grady, L., & Shalloo, L. (2012). Estimating the effect of mastitis on the profitability of Irish dairy farms. *Journal of Dairy Science*, *95*(7), 3662–3673. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4863

Geary, U., Lopez-Villalobos, N., O'Brien, B., Garrick, D. J., & Shalloo, L. (2014). Estimating the impact of somatic cell count on the value of milk utilising parameters obtained from the published literature. *Journal of Dairy Research*, *81*(2), 223–232. https://doi.org/10.1017/S0022029914000053

Gómez-Caravaca, A. M., Maggio, R. M., & Cerretani, L. (2016). Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Analytica Chimica Acta*, *913*, 1–21. https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.01.025

Gondim, C. de S., Junqueira, R. G., Souza, S. V. C. de, Ruisánchez, I., & Callao, M. P. (2017). Detection of several common adulterants in raw milk by MID-infrared spectroscopy and one-class and multi-class multivariate strategies. *Food Chemistry*, *230*, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.022

Gran, H. M., Mutukumira, A. N., Wetlesen, A., & Narvhus, J. A. (2002). Smallholder dairy processing in Zimbabwe: Hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. *Food Control*, *13*(1), 41–47. https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00082-2

Hansen, P. W., & Holroyd, S. E. (2019). Development and application of Fourier transform infrared spectroscopy for detection of milk adulteration in practice. *International Journal of Dairy Technology*, 1471-0307.12592. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12592

Hruzikova, J., Milde, D., Krajancova, P., & Ranc, V. (2012). Discrimination of Cheese Products for Authenticity Control by Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(7), 1845–1849. https://doi.org/10.1021/jf204267d

Hsu, C. P. S. (1997). *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry (pp. 247-282). Separation Sciences Research and Product Development Mallinckrodt*. Inc.

International Organization for Standardization [ISO]. (2014). Milk and milk products - Determination of nitrogen content. In Part 1: Kjeldahl principle and crude protein calculation (ISO standard No. 8968). Retrived from https://www.iso.org/obp/ui#i-so:std:iso:8968:-1:ed-2:v1:en

Jawaid, S., Talpur, F. N., Sherazi, S. T. H., Nizamani, S. M., & Khaskheli, A. A. (2013). Rapid detection of melamine adulteration in dairy milk by SB-ATR–Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, *141*(3), 3066–3071. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.106

Kamal, M., & Karoui, R. (2015). Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 27–48. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.007

Kamboj, U., Kaushal, N., & Jabeen, S. (2020). Near Infrared Spectroscopy as an efficient tool for the Qualitative and Quantitative Determination of Sugar Adulteration in Milk. *Journal of Physics: Conference Series*, *1531*(1), 012024. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1531/1/012024

Kamboj, U., Kaushal, N., Mishra, S., & Munjal, N. (2020). Application of Selective Near Infrared Spectroscopy for Qualitative and Quantitative Prediction of Water Adulteration in Milk. *Materials Today: Proceedings*, *24*, 2449–2456. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.03.775

Kamthania, M., Saxena, J., Saxena, K., & Sharma, D. K. (2014). Milk Adultration: Methods of Detection &Remedial Measures. *International Journal of Engineering and Technical Research*, *1*, 15–20.

Karoui, R., & Debaerdemaeker, J. (2007). A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products. *Food Chemistry*, *102*(3), 621–640. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.042

Kawasaki, M., Kawamura, S., Tsukahara, M., Morita, S., Komiya, M., & Natsuga, M. (2008). Near-infrared spectroscopic sensing system for on-line milk quality assessment in a milking robot. *Computers and Electronics in Agriculture*, *63*(1), 22–27. https://doi.org/10.1016/j.compag.2008.01.006

Kendall, H., Kuznesof, S., Dean, M., Chan, M.-Y., Clark, B., Home, R., Stolz, H., Zhong, Q., Liu, C., Brereton, P., & Frewer, L. (2019). Chinese consumer's attitudes, perceptions and behavioural responses towards food fraud. *Food Control*, *95*, 339–351. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.006

Le Maréchal, C., Thiéry, R., Vautor, E., & Le Loir, Y. (2011). Mastitis impact on technological properties of milk and quality of milk products—A review. *Dairy Science & Technology*, *91*(3), 247–282. https://doi.org/10.1007/s13594-011-0009-6

Li, S., Sijtsema, S. J., Kornelis, M., Liu, Y., & Li, S. (2019). Consumer confidence in the safety of milk and infant milk formula in China. *Journal of Dairy Science*, *102*(10), 8807–8818. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16638

Liu, J., Ren, J., Liu, Z.-M., & Guo, B.-H. (2015). A new comprehensive index for discriminating adulteration in bovine raw milk. *Food Chemistry*, *172*, 251–256. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.063

Liu, N., Parra, H. A., Pustjens, A., Hettinga, K., Mongondry, P., & van Ruth, S. M. (2018). Evaluation of portable near-infrared spectroscopy for organic milk authentication. *Talanta*, *184*, 128–135. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.097

Lohumi, S., Lee, S., Lee, H., & Cho, B.-K. (2015). A review of vibrational spectroscopic techniques for the detection of food authenticity and adulteration. *Trends in Food Science & Technology*, *46*(1), 85–98. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.003

Luiz, L., Bell, M., Rocha, R., Mendes, T., & Anjos, V. (2014). Análise de Resíduos de Diclofenaco Sódico Veterinário em Leite por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. *Revista*

Brasileira de Ciências da Saúde, *18*(3), 219–224. https://doi.org/10.4034/RBCS.2014.18.03.05

Luiz, L. da C., Bell, M. J. V., Rocha, R. A. da, Leal, N. L., & Anjos, V. de C. dos. (2018). Detection of Veterinary Antimicrobial Residues in Milk through Near-Infrared Absorption Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy*, *2018*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2018/5152832

Macedo dos Santos, P., & Pereira-Filho, E. R. (2013). Digital image analysis – an alternative tool for monitoring milk authenticity. *Analytical Methods*, *5*(15), 3669. https://doi.org/10.1039/c3ay40561c

McSweeney, P. L. (2007). *Cheese problems solved*. Elsevier.

Meneghini, R. C. M., Cassoli, L. D., Martines Filho, J. G., Xavier, C. E. O., Santos, M. V. dos, Caixeta Filho, J. V., Natel, A. S., & Machado, P. F. (2016). How can dairies maximize their profits and properly remunerate their dairy farmers? *Scientia Agricola*, *73*(1), 51–61. https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0261

Mishra, P., Cordella, C. B. Y., Rutledge, D. N., Barreiro, P., Roger, J. M., & Diezma, B. (2016). Application of independent components analysis with the JADE algorithm and NIR hyperspectral imaging for revealing food adulteration. *Journal of Food Engineering*, *168*, 7–15. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.07.008

Moore, J. C., Spink, J., & Lipp, M. (2012). Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science*, *77*(4), R118–R126. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02657.x

More, S. (2009). Global trends in milk quality: Implications for the Irish dairy industry. *Irish Veterinary Journal*, *62*(S4), S5. https://doi.org/10.1186/2046-0481-62-S4-S5

Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, *99*(12), 10128–10149. https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172

Mwendia, S. W., Mwungu, C. M., Ng'ang'a, S. K., Njenga, D., & Notenbaert, A. (2018). Effect of feeding oat and vetch forages on milk production and quality in smallholder dairy farms in Central Kenya. *Tropical Animal Health and Production*, *50*(5), 1051–1057. https://doi.org/10.1007/s11250-018-1529-3

Nascimento, C. F., Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rocha, F. R. P. (2017). Recent advances on determination of milk adulterants. *Food Chemistry*, *221*, 1232–1244. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.034

Nascimento, W. W. G., da Oliveira, M. A. L., Furtado, M. A. M., dos Anjos, V. da C., & Bell, M. J. V. (2013). Development and optimization of an alternative methodology for detection of milk adulteration by water. *Journal of Food Science and Engineering*, *3*(7), 363.

Ngasala, J. uma B., Nonga, H. E., & Mtambo, M. M. A. (2015). Assessment of raw milk quality and stakeholders' awareness on milk-borne health risks in Arusha City and Meru District, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, *47*(5), 927–932. https://doi.org/10.1007/s11250-015-0810-y

Nicolaï, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I., & Lammertyn, J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology*, *46*(2), 99–118. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.024

Nightingale, C., Dhuyvetter, K., Mitchell, R., & Schukken, Y. (2008). Influence of Variable Milk Quality Premiums on Observed Milk Quality. *Journal of Dairy Science*, *91*(3), 1236–1244. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0609

Nunes, C. A. (2014). Vibrational spectroscopy and chemometrics to assess authenticity, adulteration and intrinsic quality parameters of edible oils and fats. *Food Research International*, *60*, 255–261. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.041

O'Donnell, C. P., Fagan, C., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2014). *Process Analytical Technology for the Food Industry* (Online-Ausg). Springer New York.

Opiyo, B. A., Wangoh, J., & Kamau Njage, P. M. (2013). Microbiological Performance of Dairy Processing Plants Is Influenced by Scale of Production and the Implemented Food Safety Management System: A Case Study. *Journal of Food Protection*, *76*(6), 975–983. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-450

Osborne, B. G., Fearn, T., Hindle, P. T., & Osborne, B. G. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis* (2nd ed). Longman Scientific & Technical ; Wiley.

Özkan Gülzari, Ş., Owade, J. O., & Ndambi, O. A. (2020). A review of interventions and parameters used to address milk quality in eastern and southern Africa. *Food Control*, *116*, 107300. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107300

Pedregosa F. et al., "Scikit-learn: Machine learning in Python", J. Mach. Learn. Res, 12, 2011, 2825 -2830.

Pereira, C. G., Andrade, J., Ranquine, T., de Moura, I. N., da Rocha, R. A., Furtado, M. A. M., Bell, M. J. V., & Anjos, V. (2018). Characterization and detection of adulterated whey protein supplements using stationary and time-resolved fluorescence spectroscopy. *LWT*, *97*, 180–186. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.050

Polshin, E., Aernouts, B., Saeys, W., Delvaux, F., Delvaux, F. R., Saison, D., Hertog, M., Nicolaï, B. M., & Lammertyn, J. (2011). Beer quality screening by FT-IR spectrometry: Impact of measurement strategies, data pre-processings and variable selection algorithms. *Journal of Food Engineering*, *106*(3), 188–198. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.003

Poonia, A., Jha, A., Sharma, R., Singh, H. B., Rai, A. K., & Sharma, N. (2017). Detection of adulteration in milk: A review. *International Journal of Dairy Technology*, *70*(1), 23–42. https://doi.org/10.1111/1471-0307.12274

Qu, J.-H., Liu, D., Cheng, J.-H., Sun, D.-W., Ma, J., Pu, H., & Zeng, X.-A. (2015). Applications of Near-infrared Spectroscopy in Food Safety Evaluation and Control: A Review of Recent Research Advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *55*(13), 1939–1954. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.871693

Reid, L. M., Woodcock, T., O'Donnell, C. P., Kelly, J. D., & Downey, G. (2005). Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data. *Food Research International*, *38*(10), 1109–1115. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.03.005

Renny, E. F., Daniel, D. K., Krastanov, A. I., Zachariah, C. A., & Elizabeth, R. (2005). Enzyme Based Sensor for Detection of Urea in Milk. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, *19*(2), 198–201. https://doi.org/10.1080/13102818.2005.10817216

Rodriguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for Rapid Authentication and Detection of Adulteration of Food. *Annual Review of Food Science and Technology*, *2*(1), 467–483. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133750

Rodriguez-Saona, L. E., Giusti, M. M., & Shotts, M. (2016). Advances in Infrared Spectroscopy for Food Authenticity Testing. In *Advances in Food Authenticity Testing* (pp. 71–116). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100220-9.00004-7

Santos, P. M., Pereira-Filho, E. R., & Rodriguez-Saona, L. E. (2013). Rapid detection and quantification of milk adulteration using infrared microspectroscopy and chemometrics analysis. *Food Chemistry*, *138*(1), 19–24. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.024

SAS GUIDE, "The BOOLRULE procedure", https://documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4_3.5/casml/casml_boolrule_details05.htm, Accessed on: 09/01/2022.

Schaare, P. N., & Fraser, D. G. (2000). Comparison of reflectance, interactance and transmission modes of visible-near infrared spectroscopy for measuring internal properties of kiwifruit (Actinidia chinensis). *Postharvest Biology and Technology*, *20*(2), 175–184. https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00130-7

Schukken, Y. H. (2007). Using SCC data to your best advantage. *NMC Regional Meeting Proceedings*, 29–35.

Schukken, Y. H., Leslie, K. E., Weersink, A. J., & Martin, S. W. (1992a). Ontario Bulk Milk Somatic Cell Count Reduction Program. 1. Impact on Somatic Cell Counts and Milk Quality. *Journal of Dairy Science*, *75*(12), 3352–3358. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78111-9

Schukken, Y. H., Leslie, K. E., Weersink, A. J., & Martin, S. W. (1992b). Ontario Bulk Milk Somatic Cell Count Reduction Program. 2. Dynamics of Bulk Milk Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, *75*(12), 3359–3366. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)78112-0

Sharma, K., & Paradakar, M. (2010). The melamine adulteration scandal. *Food Security*, *2*(1), 97–107. https://doi.org/10.1007/s12571-009-0048-5

Singh, P., & Gandhi, N. (2015). Milk Preservatives and Adulterants: Processing, Regulatory and Safety Issues. *Food Reviews International*, *31*(3), 236–261. https://doi.org/10.1080/87559129.2014.994818

Skeie, S. (2007). Characteristics in milk influencing the cheese yieldand cheese quality. *Journal of Animal and Feed Sciences*, *16*(Suppl. 1), 130–142. https://doi.org/10.22358/jafs/74164/2007

Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, *76*(9), R157–R163. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x

Spink, J., Moyer, D. C., & Speier-Pero, C. (2016). Introducing the Food Fraud Initial Screening model (FFIS). *Food Control*, *69*, 306–314. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.016

Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. J. Wiley.

Stürmer, M., Busanello, M., Velho, J. P., Heck, V. I., & Haygert-Velho, I. M. P. (2018). Relationship between climatic variables and the variation in bulk tank milk composition using canonical correlation analysis. *International Journal of Biometeorology*, *62*(9), 1663–1674. https://doi.org/10.1007/s00484-018-1566-7

Summer, A., Franceschi, P., Formaggioni, P., & Malacarne, M. (2015). Influence of milk somatic cell content on Parmigiano-Reggiano cheese yield. *Journal of Dairy Research*, *82*(2), 222–227. https://doi.org/10.1017/S0022029915000102

Sun, D.-W. (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control* (1st ed). Academic Press.

Tripathy, S., Ghole, A. R., Deep, K., Vanjari, S. R. K., & Singh, S. G. (2017). A comprehensive approach for milk adulteration detection using inherent bio-physical properties as 'Universal Markers': Towards a miniaturized adulteration detection platform. *Food Chemistry*, *217*, 756–765. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.037

van Schaik, G., Lotem, M., & Schukken, Y. H. (2002). Trends in Somatic Cell Counts, Bacterial Counts, and Antibiotic Residue Violations in New York State During 1999–2000. *Journal of Dairy Science*, *85*(4), 782–789. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74136-2

van Soest, F. J. S., Santman-Berends, I. M. G. A., Lam, T. J. G. M., & Hogeveen, H. (2016). Failure and preventive costs of mastitis on Dutch dairy farms. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 8365–8374. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10561

Wu, B., Wang, Z., Zhao, D., & Lu, X. (2012). A novel molecularly imprinted impedimetric sensor for melamine determination. *Talanta*, *101*, 374–381. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.044

Wu, D., Feng, S., & He, Y. (2007). Infrared Spectroscopy Technique for the Nondestructive Measurement of Fat Content in Milk Powder. *Journal of Dairy Science*, *90*(8), 3613–3619. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0164

Wu, D., Nie, P., He, Y., & Bao, Y. (2012). Determination of Calcium Content in Powdered Milk Using Near and Mid-Infrared Spectroscopy with Variable Selection and Chemometrics. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(4), 1402–1410. https://doi.org/10.1007/s11947-010-0492-4

Xin, H., & Stone, R. (2008). Chinese Probe Unmasks High-Tech Adulteration With Melamine. *Science*, *322*(5906), 1310–1311. https://doi.org/10.1126/science.322.5906.1310

Yang, R., Liu, R., Dong, G., Xu, K., Yang, Y., & Zhang, W. (2016). Two-dimensional hetero-spectral mid-infrared and near-infrared correlation spectroscopy for discrimination adulterated milk. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *157*, 50–54. https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.12.017

Yang, Y., Hettinga, K. A., Erasmus, S. W., Pustjens, A. M., & van Ruth, S. M. (2020). Opportunities for fraudsters: When would profitable milk adulterations go unnoticed by common, standardized FTIR measurements? *Food Research International*, *136*, 109543. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109543

7. RINGRAZIAMENTI

Ci tengo a ringraziare il Prof. De Marchi per avermi coinvolto in questo progetto che ha suscitato in me un notevole interesse e per avermi dato la possibilità di svilupparne la tesi. Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Vania Vigolo che mi ha seguito, con pazienza e disponibilità, in tutte le fasi di stesura dell'elaborato.

Rivolgo un sentito ringraziamento alla mia famiglia per il loro continuo sostegno e per avermi permesso di portare avanti gli studi. Ringrazio, infine, la mia ragazza, tutti i miei amici e parenti per avermi spronato a fare del mio meglio e a non mollare mai anche nei momenti più complicati.