



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Metodi analitici per contrastare le frodi nella filiera del pistacchio e della nocciola

Relatore Prof. Paolo Carletti

Correlatrice Dott.ssa Cristina Uliana

Laureando Diego Tombolato

Matricola n.2072342

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUZIONE GENERALE	6
1.1 CENNI STORICI	6
1.2 DEFINIZIONI	7
1.3 FRODI COMUNI NEL MERCATO DELLA FRUTTA A GUSCIO	10
1.4 LEGISLAZIONE	12
2. IL PISTACCHIO	14
2.1 GENERALITA' SUL PISTACCHIO	14
2.2 PROCESSO PRODUTTIVO: DAL CAMPO ALL'AZIENDA	17
2.3 IL MERCATO DELLA FRUTTA A GUSCIO E DEL PISTACCHIO	24
2.3.1 A livello globale	24
2.3.2 In Italia	26
3. FOCUS SULL'ADULTERANTE PIU' COMUNE: IL PISELLO VERDE (PISUM SATIVUM L.)	27
3.1 CARATTERISTICHE	27
3.2 PERCHE' È UTILIZZATO CON FREQUENZA COME ADULTERANTE NEL PISTACCHIO	28
3.3 PERICOLI ASSOCIATI ALL'USO DI <i>Pisum sativum L.</i> COME ADULTERANTE	29
4. METODI ANALITICI PER DETERMINARE LE PRINCIPALI FRODI NEL MERCATO DEL PISTACCHIO:	31
4.1 UTILIZZO DI METODI SPETTROMETRICI PER DETERMINARE LE ADULTERAZIONI DEL PISTACCHIO	31
4.2 DETERMINAZIONE DELL'ORIGINE DEL PRODOTTO TRAMITE SPETTROMETRIA UV-VIS	35
4.3 UTILIZZO DI SPETTROMETRI PORTATILI FT-MIR e FT-NIR	36
4.4 UTILIZZO DELLA TECNICA PCR PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DEL PISTACCHIO CON PISELLO VERDE	40
4.5 UTILIZZO DELLA LIBS (LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY) PER IDENTIFICARE L'ADULTERAZIONE DEL PISTACCHIO	45
4.6 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE LE FRODI SULLA PROVENIENZA DEL PISTACCHIO	50
4.7 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DELLA PASTA DI PISTACCHIO CON OLIO DI GIRASOLE	53
4.8 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA RAMAN PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DI PISTACCHIO MACINATO	56
5. LA NOCCIOLA	63
5.1 GENERALITA' SULLA NOCCIOLA	63
5.2 PROCESSO PRODUTTIVO: RACCOLTA E LAVORAZIONE	65
5.3 IL MERCATO DELLA NOCCIOLA	67
6. METODI ANALITICI PER DETERMINARE LE PRINCIPALI FRODI NEL MERCATO DELLA NOCCIOLA:	69
6.1 UTILIZZO DELLA GAS CROMATOGRAFIA PER L'IDENTIFICAZIONE DI UN MARKER SPECIFICO NELLE CREME A BASE DI NOCCIOLA	69

<i>6.2 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE L'ORIGINE GEOGRAFICA DELLE NOCCIOLE</i>	74
<i>6.3 USO DELLA CROMATOGRAFIA PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DELLA PASTA DI NOCCIOLA CON OLI A MINOR COSTO</i>	78
6.3.1 Profilo degli acidi grassi:	79
6.3.2 Composizione dei trigliceridi (TAG):	80
6.3.3 Profilo dei tocoferoli:	82
<i>6.4 UTILIZZO DELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR) PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DI CREME SPALMABILI ALLA NOCCIOLA</i>	85
7. CONCLUSIONI	89
BIBLIOGRAFIA	90
SITOGRAFIA	99

RIASSUNTO

I prodotti trasformati a base di pistacchio e nocciola sono di grande valore, apprezzati per il loro sapore unico, il profilo nutrizionale e la versatilità nella filiera agro-alimentare; tuttavia, la complessità delle catene di approvvigionamento del mercato globale alimentare favoriscono pratiche di adulterazione, contraffazione e manomissione che non solo ingannano i consumatori, ma pongono anche potenziali rischi per la loro salute a causa dell'introduzione di allergeni o contaminanti.

Questa tesi si pone l'obiettivo di affrontare la questione critica dell'adulterazione del pistacchio, della nocciola e di alcuni prodotti trasformati, fornendo una panoramica dello stato attuale delle pratiche di adulterazione, con particolare attenzione ai metodi analitici usati per determinarle.

È stata condotta una revisione bibliografica approfondita per raccogliere informazioni sui metodi e sulle conseguenze dell'adulterazione del pistacchio e della nocciola; particolare attenzione è stata prestata anche alle caratteristiche del pisello verde, ai motivi che spingono al suo utilizzo come adulterante nei prodotti a base di pistacchio e ai potenziali rischi per la salute associati al suo consumo.

I metodi esaminati per il pistacchio riguardano: la spettrometria UV-VIS, FT-MIR e FT-NIR, nonché la tecnica della PCR usata con successo per determinare l'adulterazione da pisello verde, la Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), la spettroscopia NIR per determinare sia l'origine del prodotto che l'adulterazione della pasta di pistacchio e la spettroscopia Raman; invece, la sezione dedicata alla nocciola include tecniche differenti tra cui la gas cromatografia usata per identificare dei marker specifici nelle creme a base di nocciola, la spettroscopia NIR per determinare l'origine geografica delle nocciole e la cromatografia per rilevare l'adulterazione della pasta di nocciola con oli a minor costo; inoltre, sono stati descritti sia i metodi utilizzati per analizzare il profilo degli acidi grassi e dei tocoferoli che la tecnica NMR (risonanza magnetica nucleare) per determinare delle adulterazioni nelle creme spalmabili alla nocciola.

ABSTRACT

Raw material and processed pistachio and hazelnut are highly valued products, prized for their unique flavor, nutritional profile, and versatility in the agri-food supply chain; however, the complexity of global food market supply chains encourage adulteration, counterfeiting, and tampering practices that not only mislead consumers, but also pose potential health risks to them due to the introduction of allergens or contaminants.

This thesis aims to address the critical issue of the adulteration of pistachio, hazelnut and some processed products by providing an overview of the status of adulteration practices, with a focus on the analytical methods used to determine them.

An extensive literature review was conducted to gather information on the methods and consequences of pistachio and hazelnut adulteration; special attention was also paid to the characteristics of green pea, the reasons for its use as an adulterant in pistachio products, and the potential health risks associated with its consumption

The methods examined for pistachio include: UV-VIS, FT-MIR and FT-NIR spectrometry, as well as the PCR technique successfully used to determine adulteration by green pea, Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), NIR spectroscopy to determine both product origin and adulteration of pistachio paste, and Raman spectroscopy; on the other hand, the hazelnut section includes different techniques including gas chromatography used to identify specific markers in hazelnut creams, NIR spectroscopy to determine the geographic origin of hazelnuts, and chromatography to detect the adulteration of hazelnut paste with lower cost oils; in addition, both the methods used to analyze fatty acid and tocopherol profiles and the NMR (nuclear magnetic resonance) technique to determine adulterations in hazelnut spreads were described.

1. INTRODUZIONE GENERALE

Il presente elaborato è nato dall'esigenza di Euro Company, un'azienda situata nella provincia di Ravenna, di esaminare le frodi riguardanti le creme spalmabili a base di pistacchio. Euro Company, specializzata nella produzione, selezione e commercializzazione di frutta a guscio, frutta secca e creme spalmabili, è attiva dal 1979 e ha registrato una crescita costante; attualmente, dispongono di uno stabilimento produttivo che copre oltre 60.000 metri quadrati e conta 36 linee di confezionamento.

1.1 CENNI STORICI

Le preoccupazioni per le frodi alimentari risalgono all'antichità. Nel secondo secolo a.C. in Cina, c'erano divieti specifici al riguardo, questi divieti sono stati rafforzati negli anni successivi con gravi sanzioni se il consumo di prodotti contraffatti causava malattie, compresa l'impiccagione se la malattia provocava la morte (Hart, 1952). Leggi simili furono messe in atto nell'antico Egitto e nell'antica Roma dove Plinio il Vecchio scrisse della frode associata al vino nella sua "Naturalis Historia", una raccolta di 37 libri che "catturarono" l'estensione della conoscenza dell'epoca in tutti i domini e divennero una base per futuri lavori accademici ed enciclopedie.

Nel Medioevo, le pratiche di frode alimentare proliferavano man mano che la complessità degli alimenti e degli ingredienti che venivano acquistati (al contrario di quelli fatti in casa) si espandeva (Shaun P. Kennedy, 2021).

Nel 1820 Fredrick Accum, un chimico londinese, pubblica "a treatise on adulteration of food and culinary poisons" in cui denuncia il largo impiego delle adulterazioni e sofisticazioni degli alimenti nella Londra dei primi anni dell'800. È stata la prima indagine completa sulle frodi negli alimenti mentre la rivoluzione industriale stava prendendo piede. È stata una svolta in quanto non solo copriva i mezzi con cui gli alimenti venivano adulterati, ma forniva anche metodi per rilevare l'adulterazione e documentava coloro che erano stati ritenuti colpevoli di aver adulterato il cibo.

A causa della combinazione di uno scandalo che coinvolse la proprietà della biblioteca combinate con le minacce di coloro che ha "denunciato" come colpevoli di frode alimentare, Accum fuggì dall'Inghilterra; di conseguenza, il suo lavoro non è stato così impattante come avrebbe potuto essere (Shears, 2010).

Tornando ai giorni nostri, invece, i casi di pratiche alimentari scorrette con potenziali effetti negativi sulla salute umana sono aumentati in molti Paesi (Guan et al., 2009; Jia & Jukes, 2013; Comunità Europea, 2021). Questi casi riguardano un'ampia gamma di alimenti, tra cui la carne e i prodotti a base di carne, i grassi e gli oli commestibili, i prodotti ittici, le bevande, le erbe aromatiche e diverse tipologie di frutta a guscio evidenziando la complessità del problema.

Uno dei casi più importanti di frode alimentare risale al 2008 e riguarda l'aggiunta di melamina nel latte: è stato scoperto che dei produttori in Cina adulteravano il latte bovino con una miscela di melamina, un composto chimico di sintesi di largo utilizzo industriale. La melamina veniva aggiunta per aumentarne apparentemente il contenuto proteico. Dalle informazioni disponibili si evinse che la melamina è stata aggiunta per mascherare una frode di annacquamento del latte, che, come conseguenza, aveva una riduzione della concentrazione in proteine. Il fatto che la melamina sia costituita per il 66% da atomi di azoto, e che i metodi di analisi normalmente utilizzati per la determinazione del contenuto in proteine si riferiscono alla percentuale di azoto, ha favorito le condizioni per il suo utilizzo nella frode in questione. La melamina è una molecola ricca in azoto, che in presenza di composti analoghi, come l'acido cianurico, forma dei cristalli che possono ostruire i tubuli renali provocando un blocco renale, ed in alcuni casi, la morte. La melamina non è approvata come additivo negli alimenti dalla FAO, né dalla Commissione Europea o da altre autorità nazionali (Istituto zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia-Romagna). Le conseguenze di questa frode sono state disastrose. Il problema peggiore è derivato dal suo uso negli alimenti per lattanti: quasi 300.000 bambini hanno sviluppato problemi renali e sono stati registrati anche sei decessi (Sharma & Paradakar, 2010).

Tra i più noti casi italiani di frodi alimentari uno dei più conosciuti è "il vino al metanolo". Il metanolo è un alcol alifatico che causa irritazioni al tratto gastrointestinale, danni neurologici e cecità se ingerito accidentalmente al di sopra di certe quantità (Pressman, Clemens, Sahu e Wallace Hayes, 2020). La frode, risalente al 1986, consisteva nell'aggiunta illegale di metanolo per aumentare il grado alcolico del vino, venderlo ad un prezzo maggiorato ed avere quindi un ritorno economico. Tale frode provocò diverse intossicazioni gravi e 23 decessi (Gwenzi et. al, 2023).

1.2 DEFINIZIONI

Le frodi alimentari costituiscono un problema globale con impatti significativi sulla salute umana e sull'economia mondiale (Onyeaka et al., 2022; Tahkapaa et al., 2015). Negli ultimi anni sia le agenzie di regolamentazione che le industrie si sono impegnate a stabilire dei requisiti mirati alla prevenzione delle frodi alimentari. Ciononostante, rimangono un problema impegnativo a causa della natura complessa delle reti globali di approvvigionamento alimentare e delle difficoltà nelle strategie di verifica e rilevamento degli adulteranti, anche a causa della loro natura spesso non convenzionale (Everstine et al 2024).

Esistono diverse definizioni di frode alimentare; in generale, la frode alimentare è la travisazione intenzionale della vera identità di un prodotto alimentare a scopo di lucro. (Everstine et al., 2022).

Una definizione frequentemente citata di frode alimentare è "un termine collettivo che comprende la sostituzione, l'aggiunta, la manomissione o la falsa dichiarazione di alimenti, ingredienti alimentari o confezioni di alimenti, dichiarazioni false o fuorvianti fatte su un prodotto per un guadagno economico" (Spink & Moyer, 2011).

Più nel dettaglio possiamo dare le seguenti definizioni:

-Adulterazione: definita dalla FDA (Food and Drug Administration) come una sostituzione o un'aggiunta fraudolenta e intenzionale all'interno di un prodotto, per aumentare il suo valore apparente o ridurre il costo di produzione. Include anche la diluizione con maggiori quantità di un ingrediente già presente, nonché l'aggiunta o la sostituzione di sostanze per mascherare la diluizione. Le conseguenze che l'adulterazione alimentare può avere sulla salute pubblica dipendono da quale adulterante viene utilizzato e se rappresenta un rischio immediato, come contaminante tossico o fatale.

-Contraffazione: le contraffazioni sono riproduzioni o sostituzioni di prodotti alimentari che sono strettamente simili o identici all'originale. L'industria alimentare italiana rappresenta uno dei maggiori produttori alimentari dell'UE, con grandi quantità di esportazioni, ma è anche soggetta a molte frodi. Per quanto riguarda l'autenticità, la frode nota come "italian sounding" è l'uso di nomi geografici, immagini e/o marchi di alimenti che ricordano il "Made in Italy" anche se non sono prodotti in Italia (Fragni et al., 2018).

-Sostituzione: consiste nella sostituzione di un alimento con un altro, caratterizzato da un valore nutrizionale inferiore o da un prezzo più economico. Nel settore dei prodotti della pesca, viene spesso effettuato vendendo specie ittiche che hanno un basso valore commerciale ma sono morfologicamente molto simili ad altre, che sono più costose. Anche se negli Stati membri dell'UE (Unione Europea), il regolamento (UE) n. 1379/2013 sancisce che i prodotti ittici immessi sul mercato devono essere etichettati con la designazione commerciale della specie e il suo nome scientifico (cioè genere e specie). Oltre a una perdita economica, possono sorgere preoccupazioni per la sicurezza alimentare se le specie ittiche non tossiche vengono sostituite con altre che sono velenose. Nel 2007, due casi di intossicazione con sintomi riferiti all'avvelenamento da tetrodotossina sono stati causati dalla sostituzione del pesce scorfano con pesce palla (Cohen et al., 2009).

-Sofisticazione: modificazione intenzionale delle caratteristiche chimiche o fisiche di un prodotto naturale o artificiale (soprattutto alimenti, farmaci, generi voluttuari), realizzate mediante sottrazione, di un componente pregiato (per es., il grasso del latte), o mediante aggiunta di una sostanza poco

pregiata, sia essa un componente naturale del prodotto (per es., acqua al latte o al vino), sia un componente estraneo (per es., olio di semi all’olio di oliva, un colorante giallo sintetico al burro), operata generalmente allo scopo di ricavare un illecito profitto, o di migliorare l’aspetto del prodotto (per es., con l’aggiunta di coloranti) o la sua conservabilità. (Treccani)

Quali sono le ragioni dietro alle adulterazioni alimentari?

Le ragioni principali che spingono alla frode alimentare sono di natura economica: l’elevata domanda di prodotti, i prezzi elevati delle materie prime, la brevità della stagione di raccolta, la mancanza di disponibilità in alcune regioni e la mancanza di norme specifiche spingono alcuni produttori ad “allungare” gli alimenti con ingredienti non originari (Tastan & Baysal, 2018, pp. 91-100).

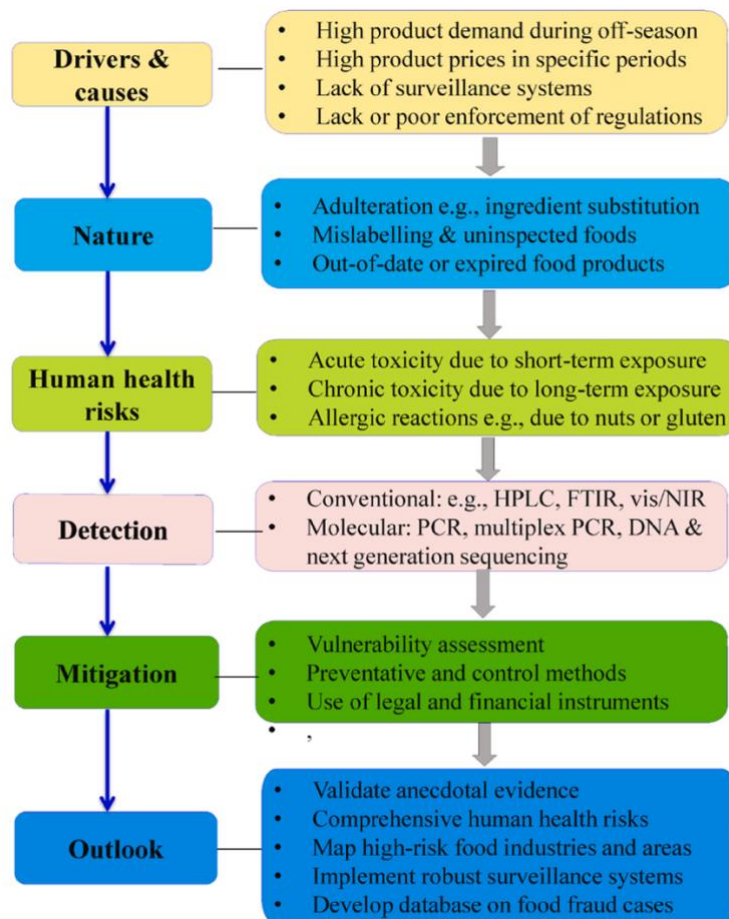


Figura 1. Diagramma di flusso che descrive le motivazioni principali delle frodi, quali sono i rischi per la salute umana e le sfide future per limitarle (Gwenzi et. al 2023)

Come descritto in figura 1, le frodi alimentari rappresentano soprattutto un rischio per la salute dei consumatori, i quali possono esporsi direttamente al rischio di tossicità acuta o letalità a causa della bassa qualità del cibo esposto a frodi commerciali, all’esposizione indiretta a lungo termine con effetti

cronici e ad informazioni tecniche fuorvianti che non rappresentano la reale composizione alimentare (Galvin-King et al., 2021). Di conseguenza, i consumatori possono manifestare reazioni allergiche ad un ingrediente sconosciuto non dichiarato in etichetta.

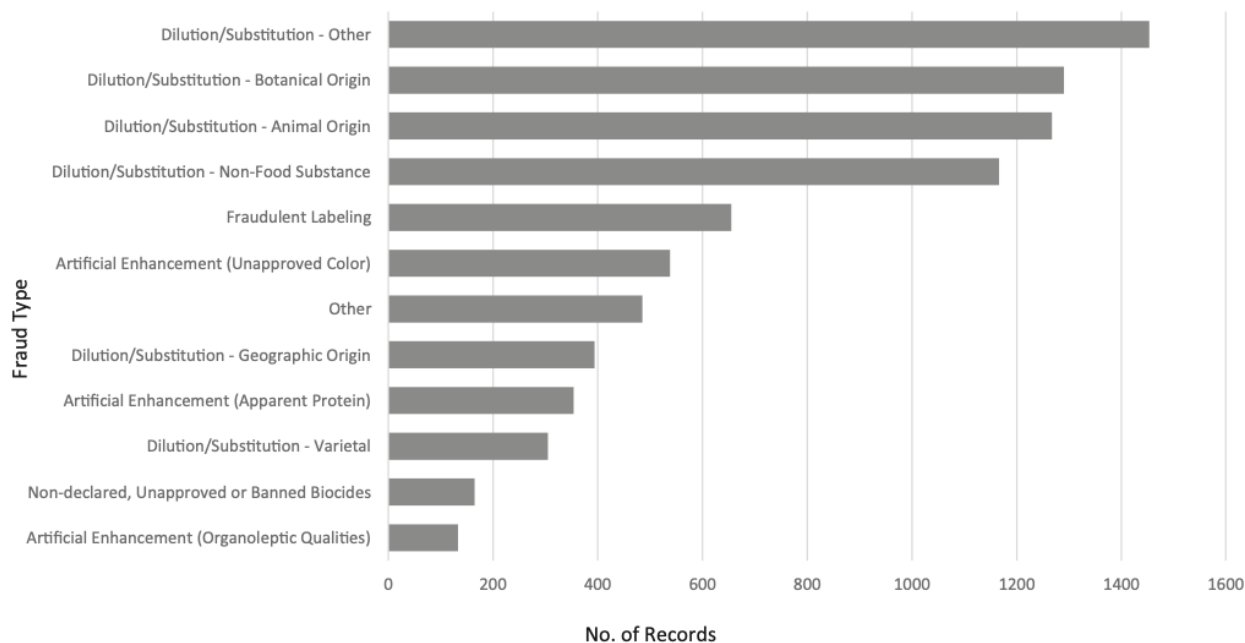


Figura 2. Numero di registrazioni per ogni tipo di frode (K.D. Everstine et. al, 2024) (N = 6717, sono state prese in considerazione solo gli “incidenti” ovvero documenti sicuri dell’avvenuta frode e le “deduzioni” ovvero documenti che attestavano con alta probabilità la presenza di una frode)

Per prevenire il verificarsi di frodi bisogna prima conoscerne la natura, la tipologia e quali sono maggiormente presenti nel mercato a livello globale. In figura 2 sono raggruppate le principali tipologie di frodi a livello mondiale per numero di segnalazioni pubblicate dal 1980 al 2023 nella letteratura scientifica, nei media, nei registri giudiziari, nei rapporti delle associazioni di categoria e da altre fonti pubbliche pertinenti.

Nel lavoro di Everstine sono stati presi in considerazione 6717 segnalazioni, suddivise in “incidenti” ovvero documenti sicuri dell’avvenuta frode e le “deduzioni”, dei documenti che attestavano con alta probabilità la presenza di una frode. La diluizione o la sostituzione sono state registrate nell’81% dei casi analizzati, questi dati evidenziano la necessità di sviluppare un sistema atto a prevenire certe pratiche illegali, grazie alla collaborazione tra imprese ed organi di controllo, che comprenda metodi analitici veloci ed efficaci per analizzare eventuali rischi per i consumatori.

1.3 FRODI COMUNI NEL MERCATO DELLA FRUTTA A GUSCIO

Tra le diverse tipologie di frutta a guscio la frode più popolare riguarda sicuramente l'origine geografica scorretta, (Figura 2) con la presenza di quasi 400 segnalazioni tra il 1980 ed il 2023. Per la frutta a guscio tale categoria di frode è la più presente perché il paese di origine è un’indicazione

obbligatoria in etichetta e rappresenta una caratteristica fondamentale nella scelta del prezzo di vendita. Le indicazioni sull'etichetta possono anche includere la varietà e l'anno del raccolto: le granelle più vecchie sono più inclini all'infestazione e allo sviluppo di muffe rispetto a delle granelle raccolte da poco tempo e dichiarare un periodo di raccolta più recente permette di vendere più prodotto ad un prezzo maggiore ottenendo così un guadagno economico.

La seconda frode più comune per la frutta a guscio è la sostituzione tra specie botaniche, (Figura 2), con più di 1200 segnalazioni. Tale sostituzione di granelle di specie è problematica in particolare i soggetti allergici che, in caso di mancanza di dichiarazione rischiano di entrare in contatto con composti allergenici. In particolare, un'adulterazione comune è l'aggiunta fraudolenta di farina di pisello verde alla polvere di pistacchio; tale pratica è largamente diffusa in quanto la farina di pisello è inodore ed insapore e rappresenta un ingrediente ottimale da aggiungere illegalmente, inoltre è un prodotto con un prezzo nettamente inferiore rispetto alla polvere di pistacchio, questo permette un ingente ritorno economico ai responsabili di queste frodi. Il principale problema è rappresentato dalla possibile allergia da parte dei consumatori: sono state trovate diverse proteine allergeniche nei piselli, come la globulina 7S Pis s 1, che è stata identificata come uno dei principali allergeni per i bambini allergici ai piselli, Pis s 2 nella componente globulinica ed PA1 e PA2 nella componente albuminica. Attualmente, gli studi sulle proprietà allergeniche dei piselli sono ancora incompleti e gli effetti della lavorazione degli alimenti sulle allergie ai piselli non sono ben compresi (Ding-Tao Wu et. al, 2023).

Anche i marchi DOP e IGP sono soggetti a frodi, sia dichiarando una nocciola coltivata in Medio Oriente come italiana DOP, sia come ingredienti di altri prodotti. Infatti, un ingrediente popolare nella pasticceria è la pasta di nocciole, un semilavorato dove la percentuale di nocciole rappresenta una caratteristica qualitativa importante e la diluizione o la sostituzione con composti artificiali sono pratiche fraudolente abbastanza comuni. (Suman et.al 2021).

In ambito alimentare una vasta gamma di materie prime, lavorazioni, prodotti derivati e sottoprodotti è soggetta a frodi, compresa la frutta a guscio. Nel mercato europeo si è voluta porre particolare attenzione allo sviluppo di diverse soluzioni per monitorare le frodi, esistono infatti diversi mezzi messi a disposizione di aziende private ed enti pubblici per essere costantemente aggiornati. Tra cui il RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) che permette una veloce comunicazione tra gli Stati membri riguardo ai pericoli di qualsiasi natura, associati a cibo e mangimi sul territorio comunitario, tra i pericoli sono comprese anche le frodi.

La seguente tabella comprende, appunto, le notifiche del RASFF per la categoria di prodotti “nuts, nut products and seeds” per la categoria di rischio “frodi / adulterazioni”. Nessuna notifica è accompagnata da documenti ufficiali dalle autorità competenti che dichiarano l'effettiva frode o adulterazione ma è ragionevole pensare che ci siano state delle pratiche fraudolente.

Motivo della notifica	Notifica
Mandorle non dichiarate in crema spalmabile - 2023	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/567232
Arachidi e anacardi in crema alle mandorle - 2022	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/611181
Proteine del latte non dichiarate in burro d'arachidi - 2022	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/609892
Mandorle non dichiarate in purea di anacardi - 2021	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/522678
Arachidi non dichiarati in pasta di anacardi - 2021	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/518189
Arachidi non dichiarati in pasta di nocciole - 2020	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/418203
Proteine della Soia non dichiarate in burro d'arachidi - 2020	https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/notification/449289

Tabella 1 Notifiche del RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) dal 2020 al 2023 riguardo a possibili frodi di prodotti a base di frutta secca

Tale tabella conferma i dati estratti dalla Figura 2, ovvero che nel mercato globale la tipologia di frode più comune è rappresentata dalla diluizione/sostituzione.

1.4 LEGISLAZIONE

In ambito alimentare uno dei Regolamenti comunitari più importanti è il n.178 del 2002. Un regolamento che sancisce i principi generali e i punti cardine della sicurezza alimentare nell'Unione Europea. Ci sono molti concetti nuovi come la necessità di avere un sistema di rintracciabilità, definisce “ritiro” e “richiamo”, stabilisce dei requisiti per la sicurezza alimentare ed istituisce l'EFSA (European Food Safety Authority). L'articolo 8 del Regolamento 178/2002 stabilisce che la legislazione alimentare mira a prevenire le pratiche fraudolente o ingannevoli, l'adulterazione degli alimenti ed ogni altra pratica messa in atto per ingannare i consumatori. Questo articolo, ed in particolare questo Regolamento, esprimono concetti generici che negli anni sono stati implementati.

Con il passare degli anni le pratiche illegali lungo tutta la filiera alimentare aumentavano sia sul territorio nazionale che Comunitario ed è quindi cresciuta la necessità di avere un quadro normativo più definito.

Nel 2011 viene pubblicato il Regolamento 1169 che stabilisce i criteri di messa a disposizione e posizionamento delle informazioni ai consumatori, stabilendo che per tutti gli alimenti siano rese disponibili e facilmente accessibili le informazioni. All'articolo 7 viene normato l'obbligo di fornire delle informazioni veritiere e non ingannevoli, tale violazione comporta sanzioni fino a 18.000 €. Le violazioni gravi del Reg. UE n. 1169/2011 possono lambire la sfera penale, in particolare l'articolo 515 del Codice penale relativo alla "frode in commercio".

Nel 2019 viene pubblicato l'articolo 1715 che funge da punto di riferimento per il monitoraggio e la prevenzione di pratiche fraudolente, mira a garantire la sicurezza alimentare e la protezione dei consumatori attraverso un rigoroso controllo grazie alla creazione di una rete sulle frodi alimentari e alla collaborazione tra organi di controllo. All'articolo 21 vengono istituite le "notifiche di frodi alimentari" da comunicare attraverso il sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) descrivendo la presunta pratica fraudolente rilevata, identificando gli operatori coinvolti e citando eventuali indagini di polizia sulla presunta pratica fraudolenta.

I regolamenti sopra citati fanno riferimento in generale alla filiera alimentare, comprendendovi anche la frutta secca ed i prodotti da essa derivati. Nello specifico ci sono dei regolamenti che normano alcuni aspetti qualitativi della frutta secca:

Il Regolamento 915 del 2023 relativo ai tenori massimi di alcuni contaminanti negli alimenti. In particolare, relativo ai limiti massimi di micotossine, metalli, diossine e contaminanti di processo. Le materie prime che presentano livelli di contaminanti oltre i limiti non possono essere utilizzate né per la vendita né per la trasformazione in paste o creme spalmabili ed il regolamento 2429 del 2023 introduce l'obbligo di indicare in etichetta l'origine della frutta secca a guscio.

A livello comunitario, oltre a prevenire le pratiche fraudolente grazie alla pubblicazione di regolamenti sempre più dettagliati, è stata istituita la rete europea sulle frodi alimentari: la Food Fraud Network (FFN) che ha permesso la nascita del Knowledge Centre for Food Fraud and Quality (KC-FFQ) gestito collettivamente dal servizio scientifico e di conoscenza della Commissione, dal centro comune di ricerca e dai dipartimenti che regolano la filiera produttiva degli alimenti e dei mangimi a livello europeo. Attraverso le loro pubblicazioni mensili sulle frodi mondiali, sui nuovi metodi analitici per determinarle ed al loro database costantemente aggiornato, negli ultimi anni le frodi alimentari sul territorio comunitario sono monitorate in maniera efficace.

2. IL PISTACCHIO

2.1 GENERALITA' SUL PISTACCHIO

C'è tutt'ora un acceso dibattito sull'etimologia della parola "pistacchio", probabilmente deriva dalla parola "*pistak*" nell'antica lingua persiana, impero nel quale la coltivazione del pistacchio era ampiamente utilizzata. (Mandalari et. al, 2022).

Le prove del consumo di pistacchi risalgono a 300.000 anni fa ai tempi degli uomini di Neanderthal grazie al ritrovamento di resti di pistacchio carbonizzato nella grotta di Kebara, in Israele. Nella storia moderna, resti di pistacchi risalenti al VI millennio a.C. sono stati trovati sia in Afghanistan che nel sud-est dell'Iran, dove è stato probabilmente coltivato per la prima volta in regioni vicine a dove è cresciuto in modo selvatico. I pistacchi nell'impero persiano erano ampiamente coltivati, da qui la sua coltivazione si espanse gradualmente in Occidente.

I pistacchi arrivarono tardi in Italia dalla Siria ed arrivarono intorno al I secolo d.C, inizialmente fu indicato come "noce siriana" e il suo prezzo era molto alto. Poi dall'Italia, i pistacchi si sono diffusi nelle regioni mediterranee dell'Europa meridionale e del Nord Africa. Negli anni '80 del 1880 furono importati dai commercianti americani principalmente per i cittadini degli Stati Uniti di origine mediorientale. Oggi, gli Stati Uniti sono il principale produttore mondiale di pistacchi, rappresentando nel 2020 circa il 47% della produzione mondiale, seguito dalla Turchia (30%) e dall'Iran (19%). La produzione commerciale di pistacchi statunitensi avviene quasi esclusivamente (99%) in California (Mandalari et. al, 2022), tant'è che gli standard commerciali pubblicati dalla USDA (United States Department of Agriculture) sono di riferimento per molte aziende.

Le specie del genere *Pistacia* appartengono alla famiglia delle Anacardiaceae, che comprende piante come anacardi, mango e edera velenosa. *Pistacia vera* L. (pistacchio) è l'unica specie di questo genere che produce semi commestibili abbastanza grandi da essere commercialmente accettabili. Le altre specie sono utilizzate principalmente per l'agro-forestazione e la produzione di legname e includono *P. atlantica*, *P. cabulica*, *P. chinensis*. (Mandalari et. al., 2022)

Gli alberi di pistacchio sono detti "portanti alternativi", il che significa che un albero alterna un anno di alta produzione seguito da un anno di bassa produzione, il picco (di produzione) è raggiunto intorno ai 15 anni e può, con una corretta gestione, essere mantenuta per decenni. I frutteti di pistacchi californiani durano circa da 70 a 100 anni.

Gli alberi crescono fino a 10 m di altezza ma di solito sono mantenuti a circa 7 m, sono dioici: sono necessari sia alberi di pistacchio maschi che femmine per la produzione di pistacchi, e di solito 1 albero maschio viene piantato ogni 8-24 alberi femminili, i fiori non hanno petali e sono unisessuali, nati in grappoli simili all'uva.

I frutti del pistacchio sono drupe, contenenti semi singoli, ovali e commestibili, ricoperti da un sottile e morbido mantello di semi (testa). I semi sono coperti da un guscio immangiabile, duro, liscio, color crema (endocarpo) che a sua volta è coperto da un mallo carnoso e sottile, di colore verde pallido, con un rossore di colore rosso durante la maturità (Figura 3). Il colore dei semi varia notevolmente dal verde chiaro al verde scuro o anche al giallo verdastro, ed è composto da due cotiledoni. Il colore unico dei pistacchi è dovuto alla combinazione di questi composti: il colore giallo delle catechine, della luteina e della zeaxantina; il verde della clorofilla; e il rivestimento esterno viola delle antocianine. Quando i gusci raggiungono l'intera dimensione, iniziano a indurirsi, si riempiono completamente man mano che si ingrandisce rompe il guscio. La divisione del guscio è un tratto che è stato selezionato dai coltivatori e consente di commercializzare i pistacchi in gran parte “in-shell” per il consumo fresco. Le cultivar commerciali variano nel modo in cui si aprono.



Figura 3. Semi di pistacchio chiusi e aperti (Mandalari et. al, 2022)



Figura 4. Rappresentazione delle sezioni più importanti del seme di pistacchio, dal centro verso l'esterno: seme, buccia, guscio e mallo (Kashaninejad et al., 2011).

L'albero del pistacchio prospera in climi secchi e in condizioni del suolo avverse per molte tipologie di piante, sono molto ben adattate alle aree desertiche e semi-desertiche delle regioni temperate e subtropicali. Una recente review dimostra che gli alberi di pistacchio sopravvivono in condizioni di siccità e che la resa non è significativamente influenzata da restrizioni moderate di irrigazione, questo è degno di nota, poiché un aspetto della sostenibilità che sorge spesso in relazione all'agricoltura è l'eccessivo uso di acqua (Mandalari et. al, 2022).

L'Italia è al settimo posto mondiale e la pianta di pistacchio è coltivata quasi esclusivamente in Sicilia proprio perché è adattata ad aree desertiche e semi-desertiche, le varietà coltivate nei territori nazionali sono poche e caratterizzate da una spiccata localizzazione, i semi vengono raccolti nel mese di settembre ed ogni due anni perché alternano un anno di alta produzione ad uno di bassa produzione (NutsBook, 2019).

2.2 PROCESSO PRODUTTIVO: DAL CAMPO ALL'AZIENDA

La raccolta avviene in due modi: manualmente o in maniera automatica. Negli Stati Uniti, nei giovani alberi con meno di sei anni, i pistacchi vengono raccolti “manualmente” battendo sul tronco o colpendo i rami, posizionando alla base dei teloni adibiti alla raccolta; per i pistacchi maturi è prevista una raccolta meccanica grazie a degli scuotitori che presentano un telaio di cattura. La presenza di teli è molto importante poiché i terreni del frutteto potenzialmente possono contaminare i pistacchi con *Aspergillus flavus*, è fondamentale quindi evitare di far cadere i semi per terra durante la raccolta. Inoltre, qualsiasi danno meccanico durante la raccolta dovrebbe essere evitato perché gli scafi dei pistacchi sono fragili e suscettibili alle lesioni, le quali aumenteranno la colorazione del guscio determinando una perdita economica (Kashaninejad et al., 2011).

Dopo la raccolta, può essere previsto un periodo di stoccaggio dove i pistacchi freschi non sbucciati possono essere conservati fino a sei settimane a 0 °C e 70-75% di umidità relativa senza alcun effetto significativo sull'aspetto, sulla qualità del sapore, sulla composizione e sulla rimozione del mallo. Lo stoccaggio a temperature più elevate si traduce in più di incidenza di muffe superficiali e colorazione del guscio. Un'adeguata portata d'aria durante lo stoccaggio è essenziale per ridurre al minimo le perdite. (Kader et al., 1978; 1979).

Smallatura

Successivamente alla raccolta avviene la smallatura che consiste nella rimozione del mallo. Al giorno d'oggi la smallatura è diventata un processo automatizzato ed esistono diversi tipi di macchinari efficaci, le più utilizzate sono le smallature cilindriche perché più economiche e dotate di diverse dimensioni e capacità. Sono costituite da due cilindri metallici concentrici dove un cilindro interno ruota all'interno del cilindro esterno stazionario. La superficie esterna del cilindro interno e la superficie interna del cilindro esterno sono coperte da anelli, o lastre parallele, posizionate in determinati punti che permettono la rimozione del mallo (Kashaninejad et al., 2011). Dopo il processo di smallatura i materiali non desiderati come rami, foglie, gusci e chicchi rotti, scheggiati o semi troppo piccoli vengono rimossi grazie ad un flusso d'aria che solleva le particelle contro gravità. L'effetto dipende dalla velocità dell'aria, dal contenuto di umidità delle particelle, dalla forma, dalle dimensioni e dal loro peso specifico. Questa rimozione permette un aumento della qualità finale del prodotto (Kashaninejad et al., 2011).

Un altro metodo largamente utilizzato per la smallatura consiste nella rimozione tramite getti d'acqua ad alta pressione che rimuovono in maniera efficace il mallo dal guscio ed evitano un problema che col precedente metodo potrebbe verificarsi, ovvero la macchiatura del guscio. Tale macchiatura deriva

dalla presenza, all'interno del mallo, di una sostanza lattiginosa che causa difetti a livello visivo sul guscio.

Questi difetti possono essere notevolmente ridotti lavando in modo appropriato i semi o, appunto, utilizzando il metodo di rimozione del mallo con getti d'acqua ad alta pressione.

Il prodotto viene poi inviato in un separatore ad acqua, fase fondamentale in quanto il prodotto viene separato in base al galleggiamento o meno dei semi: il separatore ad acqua consta di una vasca piena d'acqua che permette di distinguere i semi maturi da quelli immaturi: i maturi vanno a fondo mentre quelli immaturi, con residui di mallo, o con il nocciolo troppo piccolo, galleggiano. L'aria intrappolata tra il guscio e il nocciolo di alcuni pistacchi completamente divisi riduce il loro peso specifico e di conseguenza galleggiano come i pistacchi vuoti, ma l'efficienza di separazione può essere migliorata installando un agitatore nel serbatoio d'acqua per rimuovere l'aria intrappolata tra il guscio e il nocciolo. In alcuni impianti di lavorazione, o regioni, in cui non è disponibile abbastanza acqua per eseguire questa separazione, questo processo viene fatto grazie all'utilizzo di un serbatoio a flusso d'aria denominato "serbatoio secco". I semi di pistacchi vuoti, immaturi, piccoli, rotti, e piccoli rifiuti vengono separati grazie all'ausilio di questo macchinario usando il flusso d'aria e le vibrazioni.

I pistacchi depositati sul fondo non vengono buttati ma vengono recuperati ed immersi per 12 ore per favorire la germogliazione, la quale permette l'apertura del guscio. Vengono successivamente asciugati con aria calda che ne favorisce ulteriormente l'apertura automatica (Kashaninejad et al., 2011).

Essiccazione

Tra i valori commerciali più importanti c'è il contenuto di umidità, il quale non deve superare il 6,5% secondo le linee guida dello standard UNECE DDP-10 (United Nations Economic Commission for Europe; Dry and Dried Produce, revisione del 2010), i semi vengono infatti trasportati in essiccatori ad aria forzata per abbassare il livello di umidità fino ad un 5%.

Il tempo di essiccazione è una funzione di molti parametri, tra cui la temperatura dell'aria, l'umidità relativa ambientale, il contenuto di umidità iniziale dei pistacchi, ed il metodo di asciugatura. La *figura 5* mostra il tempo di essiccazione e il comportamento del seme di pistacchio (varietà "Ohadi") a diverse temperature in un essiccatore a strato sottile (Kashaninejad et al., 2007). Si evince che l'aumento della temperatura dell'aria diminuisce rapidamente il tempo di essiccazione aumentando così la velocità di asciugatura.

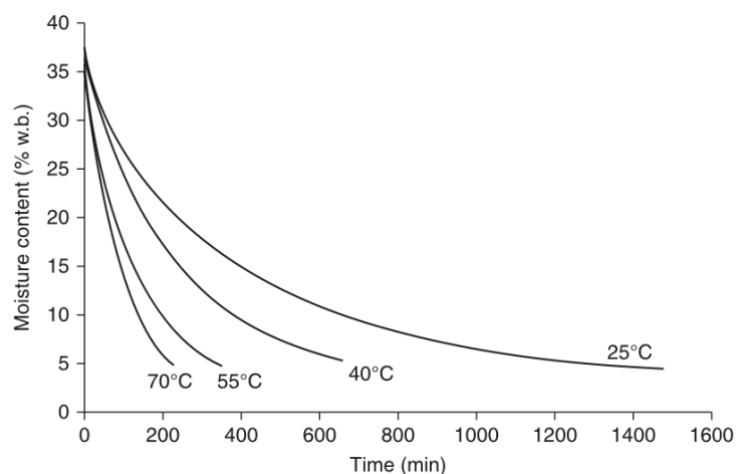


Figura 5. Modello di essiccazione di semi di pistacchio, varietà Ohadi, a diverse temperature dell'aria (velocità dell'aria= 1,5m/s, umidità relativa 20%) (Kashaninejad et al., 2011).

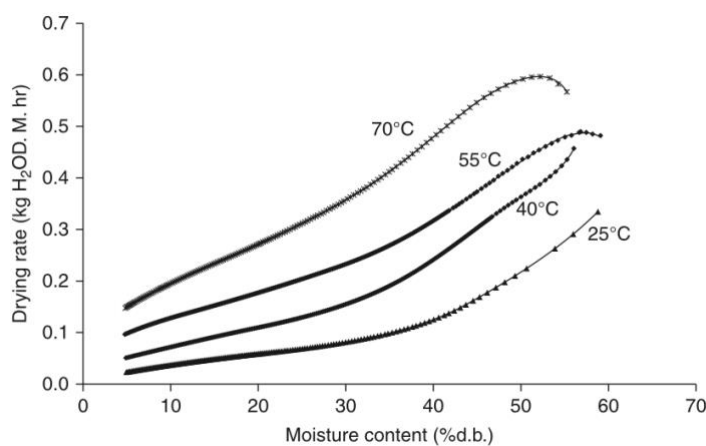


Figura 6. Tasso di asciugatura del pistacchio, varietà Ohadi, a diverse temperature (umidità relativa= 20%, velocità dell'aria= 1,5 m/s) (Kashaninejad et al., 2011).

Le curve di essiccazione mostrate in *figura 5* dimostrano che l'essiccazione dei pistacchi avviene nel momento in cui la curva cala. A temperature dell'aria più elevate possono essere rilevati due distinti periodi di essiccazione: un periodo iniziale di riscaldamento del seme in cui si svolge un leggero aumento del tasso di essiccazione e un periodo di calo caratterizzato da una rapida diminuzione del tasso di essiccazione. Inizialmente, il tasso di essiccazione è più alto perché l'acqua iniziale proviene da regioni vicino alla superficie, man mano che l'essiccazione progredisce, la sua velocità diminuisce con la diminuzione del contenuto di umidità perché l'acqua da evaporare per essere “trasportata in superficie” con la stessa velocità iniziale avrebbe bisogno di più forza cinetica (Kashaninejad et al., 2011).

In alcuni impianti di lavorazione, può essere utilizzata l'asciugatura al sole. I semi di pistacchio sono distribuiti in uno strato sottile di 2-3 cm di spessore su un pavimento di cemento sotto il sole e questo richiede circa 48 ore a temperature vicine ai 26 °C. L'asciugatura al sole viene effettuata con una

copertura protettiva per impedire l'accesso da parte di uccelli e roditori. L'energia solare è un'alternativa vantaggiosa per l'essiccazione al fine di ridurre la dipendenza del processo dai combustibili fossili (Ghazanfari et al.2003).

Un vantaggio secondario derivato dal processo di essiccazione, sia con l'utilizzo di essiccatori che all'aperto, è che molti gusci chiusi si dividono a causa della perdita di umidità.

Una lavorazione fondamentale post essiccazione è la divisione dei semi aperti da quelli chiusi. La non divisione è uno dei difetti del guscio che influisce sulla commerciabilità e sul prezzo di prodotti trasformati; pertanto, i semi non divisi devono essere separati dai semi divisi prima della vendita. Anche se alcuni dei gusci chiusi si sono divisi durante il processo di essiccazione, i “non-splitting”, possono comprendere fino al 30% a seconda della varietà e sono separati da quelli a guscio aperto da dispositivi meccanici chiamati pinpicker o tamburi per la raccolta. In questa macchina, i semi aperti vengono immessi in un tamburo rotante che è coperto da minuscoli aghi, i semi del guscio aperto vengono intercettati con la rotazione del tamburo e separati nella parte superiore da un pennello. I semi che non vengono raccolti dagli aghi passano attraverso il fondo del tamburo e vengono raccolti a parte. I pistacchi chiusi vengono venduti ad altre aziende come sottoprodotti o vengono inviati ad un impianto di lavorazione che ne permette l'apertura immergendoli in vasche d'acqua per diverse ore favorendone la germogliazione (Maskan e Karatas, 1998).

I pistacchi una volta essiccati possono essere conservati per un lungo periodo (fino a 2-5 anni) se vengono conservati in condizioni ottimali, se dovessero essere conservate in condizioni sfavorevoli diventerebbero non commestibili entro un mese a causa della crescita di muffe che causa un “sapore spento” e rancido, dell'assorbimento di sapori indesiderati e dall'infestazione di insetti. Secondo alcuni studi di Maskan et. al., i pistacchi sono più stabili alla rancidità rispetto alle mandorle, alle noci pecan e alle noci perché hanno un contenuto di grassi polinsaturi minore. Per una conservazione più lunga si raccomandano temperature basse (tra 0-10 °C), l'esclusione dell'ossigeno, il controllo degli insetti, l'imballaggio sottovuoto, l'iniezione di azoto nella confezione e l'utilizzo di atmosfere controllate come lo stoccaggio sotto alta concentrazione di CO₂ (98%) e O₂ ridotto (meno dello 0,5%) per fornire una buona stabilità in termini di perdita di acidi grassi e formazione di perossidi e acidi grassi liberi (Maskan e Karatas, 1998).

Classificazione

Dopo l'essiccazione si classificano diverse specie commerciali di pistacchio, sono presenti nel mercato: semi di pistacchio sgusciati, semi di pistacchio aperti artificialmente e semi di pistacchio chiusi. I requisiti di base della classificazione sono ad esempio assenza di materiali estranei, di pezzi

di guscio, di particelle e polvere e di dadi vuoti. I criteri di classificazione sono suddivisi in difetti di “shell” e “kernel”, ovvero di guscio e seme.

I difetti del guscio includono qualsiasi imperfezione che colpisce l'aspetto, la commestibilità e/o la commercializzazione di semi di pistacchio come il materiale dello scafo aderente, il guscio macchiato, la non spaccatura, la deformità e/o altri danni. I difetti del seme includono chicchi immaturi, rancidi, ammuffiti o prove della presenza di insetti. Anche le dimensioni e il grado di secchezza sono importanti attributi di qualità che influenzano la classificazione.

Salatura e tostatura

Le noci di pistacchio sono per lo più consumate come snack, salate e tostate. La salatura e la tostatura migliorano di molto il sapore, il colore e la consistenza dei semi di pistacchio. Il miglioramento degli attributi sensoriali dei pistacchi durante la tostatura è il risultato della reazione di Maillard che avviene tra gli zuccheri riducenti e i composti azotati.

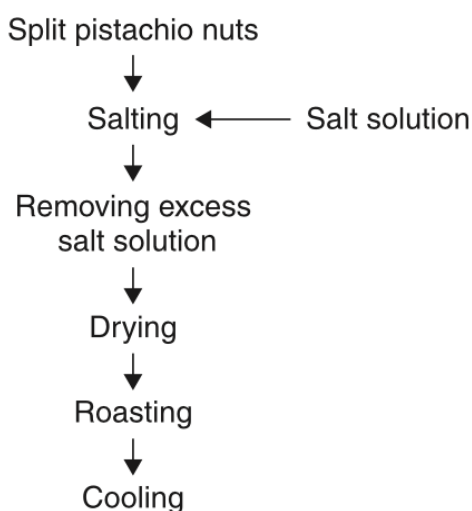


Figura 7. Processo di tostatura in una torrefazione continua (Dadgar, 1998)

La *figura 7* mostra lo schema del processo di tostatura in una torrefazione continua (Dadgar, 1998). I semi di pistacchio sono salati in ammollo in una soluzione salina al 20% (peso/volume) all'interno di una salatrice rotante, la rotazione del tamburo insieme al tempo di sosta corretto di 20 minuti forniscono una salatura uniforme.

Dopo i 20 minuti indicati per la salatura, la soluzione salina in eccesso intrappolata tra il guscio ed il seme viene rimossa per migliorare l'efficienza dell'essiccatore che ha lo scopo di ridurre ulteriormente l'umidità ed il contenuto di sale utilizzando una temperatura di 145 °C (Kashaninejad et al., 2011).

Confezionamento

Una volta salati e tostati si procede alla parte finale della lavorazione del pistacchio, ovvero il confezionamento, una fase cruciale perché la scelta dell'imballaggio primario (quello a diretto contatto con l'alimento) determinerà la protezione del prodotto finito contro l'ingresso di umidità ed ossigeno. Se l'imballaggio viene scelto con attenzione il prodotto manterrà le proprie caratteristiche organolettiche più a lungo portando benefici sia ai consumatori che ai produttori.

L'imballaggio con assorbitori di ossigeno rappresenta una scelta vincente per eliminare il contenuto di ossigeno e ritardare quindi l'ossidazione del pistacchio durante la conservazione. È infatti stato dimostrato che semi di pistacchio immagazzinati in un sistema di assorbitori di ossigeno hanno un contenuto di esanale inferiore rispetto a quelli conservati negli imballaggi atmosferici (Leufven et al., 2007). L'esanale è un indicatore del processo di ossidazione e la sua misura viene applicata in diversi prodotti per monitorare il deterioramento della qualità.

La maggior parte degli imballaggi utilizzati sono di origine sintetica e negli ultimi anni stanno emergendo sempre più soluzioni per diminuirne l'utilizzo, tra cui delle pellicole a base di amido di grano utilizzate per migliorare la qualità del prodotto ed aumentare la durata di conservazione. Ritardano inoltre la formazione di perossidi e riducono al minimo l'assorbimento di acqua durante lo stoccaggio (Kashaninejad et al., 2011).

Prodotti derivati dai semi di pistacchio

Precedentemente è stato descritto il processo produttivo dei semi di pistacchio “dal campo all'azienda” partendo dalla raccolta ed arrivando fino al confezionamento ma nel mercato della frutta a guscio, ed in particolare in quello del pistacchio, c'è una gamma molto più ampia di prodotti, come ad esempio: l'olio, le creme, o paste, spalmabili, il burro di pistacchio, semi di pistacchio macinati.

Le creme di pistacchio sono ottenute macinando i semi prima o dopo la tostatura in base alle caratteristiche finali che si vogliono ottenere, il prodotto macinato verrà poi conservato in contenitori appositi fino al confezionamento in barattoli di vetro.

C'è da porre attenzione al termine utilizzato in quanto “burro”, “crema” o “pasta” di pistacchio potrebbero trarre in inganno il consumatore al momento dell'acquisto. Il termine “crema” dà l'impressione di un prodotto pronto al consumo mentre “pasta” dà più l'idea di un prodotto che necessita di un ulteriore trattamento per poter essere consumato, anche se in realtà potrebbe trattarsi dello stesso tipo di alimento. Per quanto riguarda il termine “burro”, nel mercato si fa riferimento a prodotti che oltre ai pistacchi contengono altri ingredienti come ad esempio: zucchero, emulsionanti, oli che servono per rendere il gusto più gradevole oppure per migliorare la consistenza del prodotto rendendolo più denso e compatto. L'aggiunta di grassi vegetali (come l'olio di palma) porta a vantaggi

dal punto di vista tecnologico ma uniti allo zucchero aumentano l'apporto calorico. Il termine "burro", per la precisione, trova la sua disciplina di riferimento a livello europeo, nell'ambito del regolamento (UE) 1308/2013 recante l'organizzazione comune dei mercati dei prodotti agricoli. In particolare, l'allegato VII si stabilisce che la denominazione "burro" è riservata ai soli "prodotti lattiero-caseari".

Va chiarito che il regolamento 1308/2013 fa comunque salva la possibilità di impiegare il termine "burro" per la "designazione di prodotti la cui natura esatta è chiara per uso tradizionale e/o qualora le denominazioni siano chiaramente utilizzate per descrivere una qualità caratteristica del prodotto". Per individuare le denominazioni che beneficiano della deroga, l'articolo 91 del regolamento in esame ha incaricato la Commissione di adottare appositi atti di esecuzione. Attualmente, gli elenchi di riferimento sono contenuti nella decisione 2010/791/UE e nel regolamento (CE) 445/2007, che riportano le denominazioni nelle lingue dell'Unione in cui vengono utilizzate tradizionalmente e gli unici nomi previsti in lingua italiana sono i seguenti, stabiliti dalla decisione 2010/791/UE: latte di mandorla, burro di cacao, latte di cocco, fagiolini al burro

Le denominazioni costituite dal termine "burro" associato al nome di frutta a guscio sono contemplate, esclusivamente, in altre lingue europee, come l'inglese "peanut butter" ed il francese "beurre de cacahuète". La stessa Commissione ha manifestato il parere di non ritenere possibile la traduzione dei nomi dell'elenco. Tutto ciò induce chi scrive l'etichetta a ritenere che l'utilizzo della denominazione "burro di arachide" e delle altre, analoghe, non essendo espressamente previsto negli elenchi adottati dalla Commissione, potrebbe determinare una violazione delle disposizioni del regolamento (UE) 1308/2013.

Si precisa infine che le creme spalmabili a base di frutta a guscio non sono, di per sé, soggette a specifiche regole merceologiche riguardanti la loro composizione.

2.3 IL MERCATO DELLA FRUTTA A GUSCIO E DEL PISTACCHIO

2.3.1 A livello globale

Nel vasto panorama dell'industria alimentare, la frutta a guscio occupa un ruolo di rilievo, offrendo non solo un'opzione gustosa per gli spuntini, ma anche un'importante fonte di nutrienti essenziali. Analizzando l'evoluzione del mercato della frutta a guscio, le sue tendenze, le sfide attuali e le opportunità future dovremmo riuscire a capire perché certi prodotti vengono frodati più di altri ed avere una panoramica più chiara.

Il mercato della frutta a guscio è un settore economico dinamico e in crescita e con il crescente interesse per uno stile di vita sano e sostenibile, la domanda di frutta a guscio di alta qualità è in costante aumento, spingendo produttori e distributori a innovare e adattarsi alle esigenze del mercato. Ce lo dimostra il report annuale dell'INC (International Nut and Dried Fruit Council):

WORLD TREE NUT PRODUCTION BY GNI*(Metric Tons)
Kernel basis, except pistachios in-shell

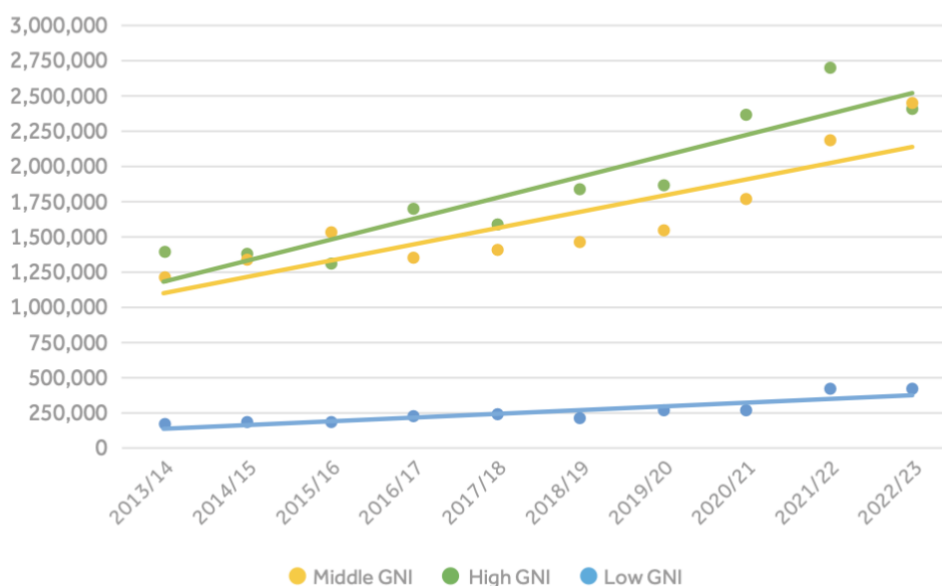


Figura 8. Produzione mondiale di frutta a guscio dal 2013 al 2023 (INC, 2022/23), *GNI= Gross National Income (Reddito Nazionale Lordo)

In questo grafico i paesi produttori sono stati classificati in base al reddito nazionale lordo (RNL) pro capite: economie ad alto reddito (RNL pro capite di 12.376 dollari o più), economie a reddito medio (da 1.026 a 12.375 dollari) ed economie a basso reddito (1.025 dollari o meno). Nell'ultimo decennio, la produzione di frutta a guscio si è concentrata principalmente nelle economie ad alto e medio reddito, che hanno mostrato un tasso di crescita medio di 148.725 e 115.362 tonnellate all'anno, rispettivamente.

Si deduce quindi che in generale il mercato della frutta a guscio è un mercato in forte crescita ed espansione e il suo valore indicato dall'INC, nel 2022/2023, si attesta sui 35,8 miliardi di dollari. Dal grafico in *figura 9* possiamo notare una leggera flessione verso il basso del valore del mercato della frutta a guscio ma con un tasso medio di crescita annuo di 0,3 miliardi di dollari rispetto al decennio precedente.

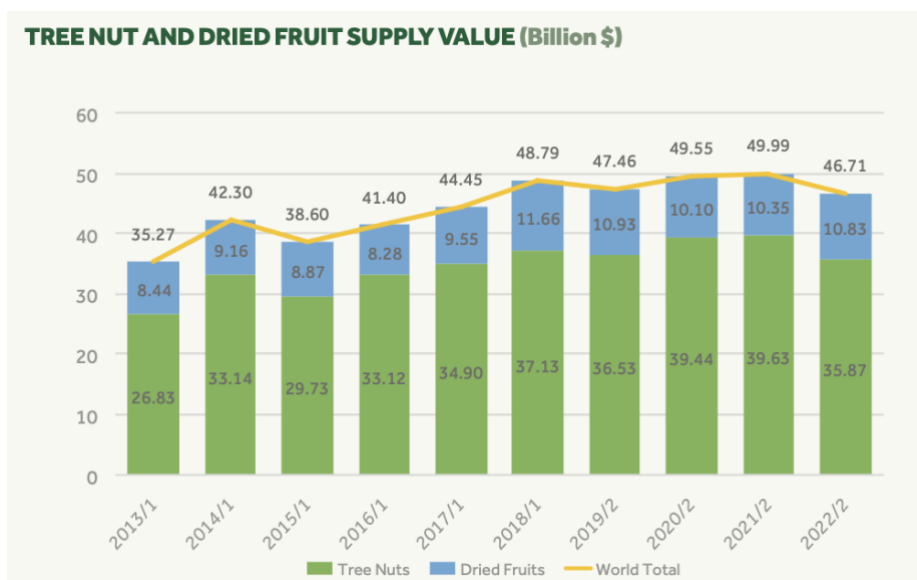


Figura 9. Valore del mercato globale della frutta a guscio (in verde) e della frutta secca (in azzurro) espressa in miliardi di dollari (INC, 2022/23)

Per quanto riguarda il pistacchio, oltre al suo valore gastronomico, riveste anche una significativa importanza economica, con un'industria globale che continua ad espandersi e a diversificarsi in risposta alle mutevoli esigenze del mercato.

Grazie all'approccio analitico del report di INC del 2022/23 possiamo affermare che il valore del mercato globale del pistacchio si attesta intorno ai 6 miliardi di dollari e che è un mercato più altalenante rispetto a quello delle nocciole, infatti dalla *figura 10* notiamo proprio che la linea rossa, la quale rappresenta l'andamento del valore del mercato del pistacchio di anno in anno espresso in miliardi di dollari, oscilla molto di più rispetto alle altre, toccando un picco massimo nel 2020/21 dove rappresentava la frutta a guscio con il valore di mercato più alto in assoluto.

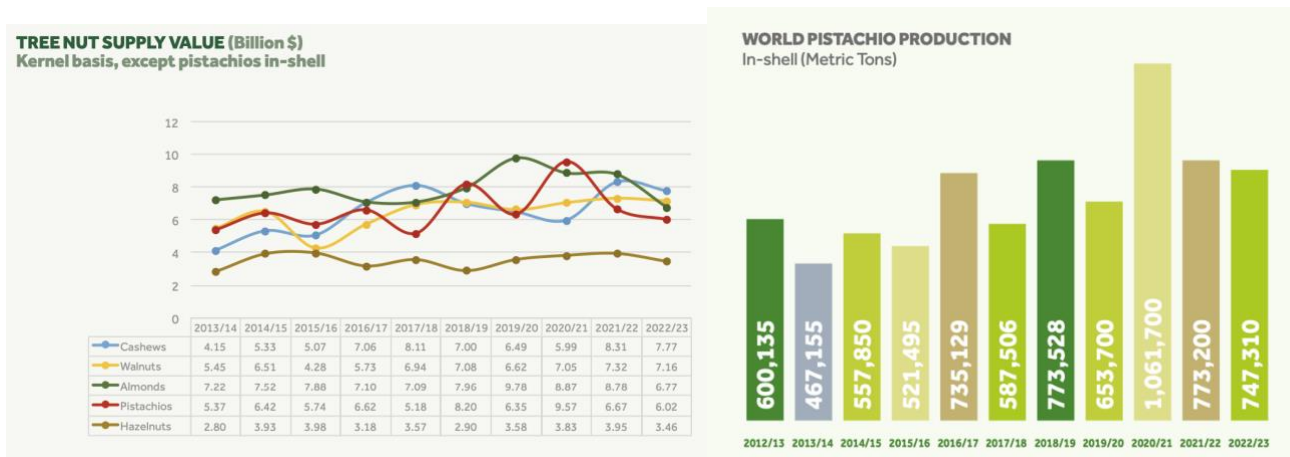


Figura 10 e 11. Andamenti di mercato della frutta a guscio espressi in miliardi di dollari, da 2013/14 al 2022/23 (a sinistra) (INC, 2022/23) e produzione mondiale di pistacchio espressa in tonnellate (a destra)

Per quanto riguarda la produzione globale di pistacchi notiamo che è leggermente diminuita nel 2022/23 a 747.310 tonnellate ed il 3% in meno rispetto alla stagione precedente, ma il quarto totale più grande dell'ultimo decennio.

2.3.2 In Italia

Nel territorio italiano il pistacchio viene coltivato principalmente in Sicilia ed in particolare quando parliamo di pistacchio italiano facciamo riferimento a quello di Bronte che ha assunto da tempo un valore sia nazionale che internazionale, spingendo la crescita economico-sociale dei territori etnei in cui viene coltivato, in particolare nei vicini comuni di Biancavilla e Adrano.

Secondo i dati Istat del 2017 la produzione del solo pistacchio di Bronte giunse a trentaquattromila quintali di pistacchio, toccando il 90% della produzione italiana e l'1% di quella mondiale. Questi numeri fanno comprendere in maniera chiara che il successo nei mercati nazionali e internazionali non dipende dalla quantità ma dalla qualità, dall'originalità e dal gusto del pistacchio coltivato sulle pendici dell'Etna dove troviamo suoli fertili per la crescita di molte piante da frutto.

Sono nate imprese che producono pesto di pistacchio, creme di pistacchio (in particolar modo per il settore dolciario) e nel 2023 il business complessivo del pistacchio di Bronte è già di 90 milioni di euro (S. Fallica, 2023).

3. FOCUS SULL'ADULTERANTE PIU' COMUNE: IL PISELLO VERDE (*Pisum sativum* L.)

In letteratura sono riportati diversi lavori che dimostrano adulterazioni di prodotti a base di pistacchio con diverse matrici alimentari e la maggior parte indica un marcato utilizzo del pisello verde (*Pisum sativum* L.) come adulterante principale: Menevesoglu et. al usano con successo la spettroscopia portatile FT-IR e UV-Vis per rilevare l'adulterazione di piselli verdi e arachidi nel pistacchio macinato, Temizkan et.al utilizzano una tecnica rapida per determinare l'adulterazione con pisello verde nei pistacchi macinati grazie all'utilizzo della spettroscopia nel vicino e medio infrarosso, Sen et. al, invece, utilizzano dei distanziatori intergenici come marcatori di adulterazione del pisello verde in semi di pistacchio portando dei risultati netti: i campioni analizzati, presi nei punti vendita accessibili ai consumatori, hanno portato all'identificazione di un contenuto di pisello verde usato come adulterante dal 5% al 30%.

In questo paragrafo cercheremo quindi di fare chiarezza sulle principali caratteristiche del pisello verde, del perché è così utilizzato come adulterante e dei possibili pericoli per i consumatori che acquistano prodotti contraffatti dalla sua aggiunta.

3.1 CARATTERISTICHE

Pisum sativum L., noto come pisello verde, è un'importante coltura di legumi che fornisce una buona fonte di proteine, vitamine, minerali e composti bioattivi benefici per la salute umana, sono coltivati in quasi tutti i paesi del mondo e considerati una parte essenziale della dieta umana, in particolare in Canada che rappresenta il più grande produttore mondiale, seguito da Cina, Russia e India.

Hanno due fenotipi, il pisello liscio e il pisello rugoso, e i loro semi vanno dal giallo crema, al verde chiaro fino al marrone-arancione, come dimostra la *figura 12*.



Figura 12. Semi di pisello di diversi colori, superfici e forme (Wu et. al, 2023)

L'attività biologica e i benefici per la salute del pisello sono solitamente associati ai suoi nutrienti e agli ingredienti bioattivi: contengono un'alta quantità di carboidrati; infatti, sono considerati uno dei principali componenti dei piselli, comprendendo circa il 60-65% del peso secco dei semi.

Il contenuto di amido varia dal 40% al 45%, sono ricchi di fibre alimentari, il loro contenuto di lipidi è relativamente basso, rendendo il pisello un alimento a basso contenuto di grassi (Wu et. al, 2023).

Per quanto riguarda la frazione proteica, è comunemente classificata in quattro categorie: globuline, albumine, prolamine e glutenine, di cui la globulina è la principale proteina di stoccaggio, rappresentando circa il 55-65% della proteina totale. La frazione proteica nei piselli è costituita principalmente da globulina 7S/11S, da albumina 2S e da un alto contenuto di lisina. (Wu et. al, 2023).

Pisum sativum L. rappresenta una potenziale fonte di vari minerali (come ad esempio azoto, potassio e fosforo). Si è notato che la composizione minerale presenta delle variazioni tra i diversi genotipi di semi di pisello; in particolare, sono emersi differenze significative nei livelli di azoto, fosforo e potassio, che sono stati identificati come i principali minerali presenti nei semi di pisello.

3.2 PERCHE' È UTILIZZATO CON FREQUENZA COME ADULTERANTE NEL PISTACCHIO

La risposta a questa domanda risiede principalmente nei diversi utilizzi e nella versatilità che il pisello verde ha nell'industria alimentare, oltre al fatto che si affaccia al mercato con un basso costo d'acquisto. La *figura 13* riassume le applicazioni più recenti dei piselli nel sistema alimentare, come le bevande e gli yogurt, i prodotti a base di piselli germinati, i prodotti incorporati nella farina di piselli, le alternative di carne e i materiali di incapsulamento e imballaggio (Wu et. al, 2023).

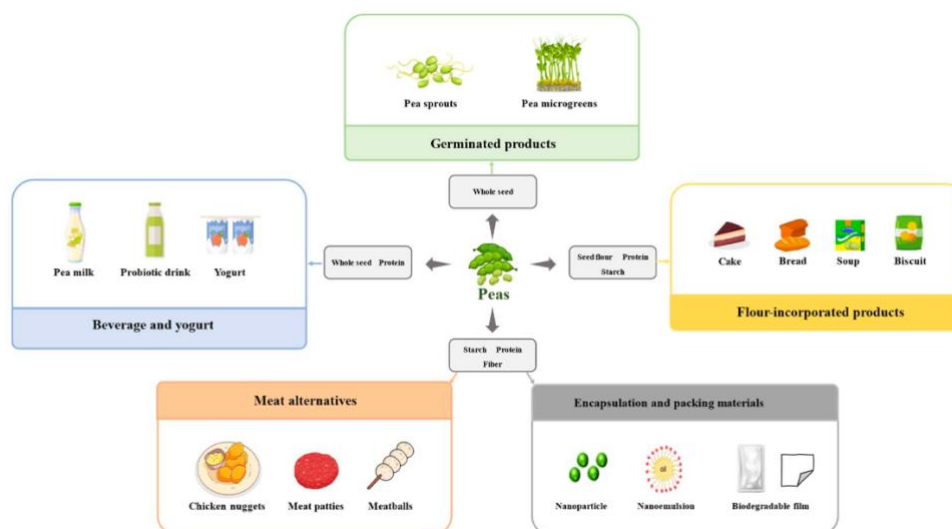


Figura 13. Applicazioni dei piselli nell'industria alimentare (Wu et. al, 2023)

Un'altra risposta alla domanda iniziale “perché è utilizzato con frequenza come adulterante?” risiede nel basso costo che il pisello verde ha al kg: grazie alla sua elevata produzione a livello mondiale, il prezzo del pisello verde si attesta tra i 320€/tonnellata e i 369€/tonnellata, ciò significa che al kg costa tra gli 0,32€ e gli 0,69€ e, rispetto al prezzo del pistacchio di circa 16€/kg, c'è una netta differenza che può portare ingenti guadagni a chi decidesse di utilizzarlo come adulterante (prezzi del pisello verde e del pistacchio presi da Ismea Mercati).

3.3 PERICOLI ASSOCIATI ALL'USO DI *Pisum sativum* L. COME ADULTERANTE

Innanzitutto, va sottolineata la notevole somiglianza visiva tra i due prodotti (se macinati) specialmente quando il pisello verde viene trattato e colorato per assomigliare al pistacchio, questa similitudine può ingannare facilmente i consumatori meno esperti e rendere più difficile l'individuazione delle frodi; in secondo luogo, il costo inferiore del pisello verde rispetto al pistacchio lo rende un'opzione economicamente “attraente” per coloro che cercano di massimizzare i profitti attraverso pratiche sleali; inoltre, l'abbondanza e la disponibilità del pisello verde sul mercato contribuiscono ulteriormente alla sua diffusione come adulterante.

Va considerata anche la complessità delle catene di approvvigionamento internazionali, che possono favorire la penetrazione di prodotti adulterati sul mercato globale che nel settore alimentare spesso sfruttano le discrepanze nei controlli di qualità e nelle normative tra paesi, consentendo agli operatori disonesti di introdurre facilmente prodotti contraffatti o adulterati.

L'utilizzo come adulterante non solo comporta guadagni economici illeciti ma presenta anche delle criticità per i consumatori; infatti, sono state trovate diverse proteine allergeniche nei piselli: la

globulina del pisello 7S Pis-S1, identificata come principale allergene per i bambini allergici ai piselli e Pis-S2, un contaminante nella componente globulinica. Inoltre, la componente albuminica contiene anche due proteine allergiche meno caratterizzate e ancora poco conosciute, vale a dire PA1 e PA2. Attualmente, gli studi sulle proprietà allergeniche dei piselli sono ancora incompleti e gli effetti della lavorazione degli alimenti sulle allergie ai piselli non sono ancora ben compresi ma abbiamo abbastanza materiale per poter ragionevolmente affermare che il loro utilizzo come adulteranti, per una percentuale di consumatori, può avere effetti negativi sulla loro salute.

A causa di un elevato contenuto di fattori anti-nutrizionali la qualità nutrizionale dei legumi e i loro effetti benefici sono costantemente messi in discussione. Di solito, tannini, acido fitico, glicosidi cianogenici, saponine, ossalati, ammine biogeniche, lectine, inibitori della proteasi e inibitori dell' α -amilasi sono considerati fattori anti-nutrizionali e per quanto riguarda i piselli, l'acido fitico, le lectine, gli ossalati e gli inibitori della tripsina sono presenti in percentuale maggiore (Wu et. al, 2023).

L'acido fitico è generalmente considerato come il principale fattore anti-nutrizionale nei piselli perché il suo contenuto è di 8,55-12,40 mg/g e causa la formazione di complessi insolubili legandosi ai minerali come rame, ferro e zinco, con conseguente riduzione del loro assorbimento nel tratto gastrointestinale umano. È stato però dimostrato che alcuni metodi di lavorazione, come l'ammollo, la tostatura, l'ebollizione o la cottura a pressione possono ridurre la quantità (Wu et. al, 2023).

In conclusione, il predominio del pisello verde come adulterante nel mercato del pistacchio è il risultato di una combinazione di fattori economici, visivi e strutturali che favoriscono la sua diffusione. Affrontare efficacemente questo problema richiede un impegno congiunto da parte delle autorità di regolamentazione, dei produttori e dei consumatori per rafforzare i controlli di qualità, promuovere la trasparenza nella filiera alimentare e scoraggiare pratiche disoneste che minano l'integrità del mercato.

4. METODI ANALITICI PER DETERMINARE LE PRINCIPALI FRODI NEL MERCATO DEL PISTACCHIO:

Le frodi nel mercato del pistacchio non solo minano la fiducia dei consumatori, ma arrecano anche danni significativi agli operatori onesti della filiera, danneggiando l'intera industria alimentare. In questo capitolo cercheremo di analizzare le molteplici modalità di frode legate al pistacchio sia inteso come materia prima che nei prodotti da esso derivati, che spaziano dalla contraffazione alla manipolazione dell'origine, all'aggiunta di ingredienti non dichiarati in etichetta; al contempo, daremo uno sguardo alle tecnologie e alle metodologie analitiche impiegate per rilevare tali frodi, offrendo una panoramica delle strategie adottate per tutelare i consumatori e salvaguardare l'integrità di questo pregiato prodotto.

4.1 UTILIZZO DI METODI SPETTROMETRICI PER DETERMINARE LE ADULTERAZIONI DEL PISTACCHIO

Le radiazioni IR (infrarosso) hanno un'energia insufficiente per promuovere delle transizioni elettroniche, l'assorbimento IR quindi è limitato ai livelli rotazionali e vibrazionali delle molecole, l'energia richiesta per causare una transizione rotazionale è bassa e cade nel lontano IR, per i gas l'assorbimento in questa regione dà origine a spettri a righe ben definiti, mentre nei liquidi e nei solidi, le collisioni intermolecolari e le interazioni ne causano l'allargamento; pertanto, nella spettroscopia IR si prendono in esame soltanto le transizioni vibrazionali. Le vibrazioni possono essere suddivise in 2 categorie fondamentali: "stretching" (stiramento) che consiste nella variazione continua della distanza interatomica lungo l'asse di legame ed il "bending" (deformazione) che consiste nella variazione dell'angolo tra 2 legami; tali deformazioni, quindi, dipendono dal numero di atomi, dalla tipologia di atomi, e dal tipo di legami tra atomi. La spettroscopia IR è quindi utilizzata prevalentemente per identificare composti organici mediante il riconoscimento di gruppi funzionali che "assorbono" a valori di lunghezze d'onda diverse. Il campione viene irraggiato con un intervallo di lunghezze d'onda e quelle assorbite corrispondono ai gruppi funzionali delle molecole. La risposta di questa analisi viene data dallo "spettro di assorbimento" che permette di identificare i gruppi funzionali, i quali permettono di identificare le molecole associate.

Nello studio di Menevesoglu del 2020 è stata usata proprio la spettroscopia vibrazionale come potenziale tecnica per rilevare le adulterazioni nel pistacchio; il loro obiettivo è stato quello di generare un metodo con spettrometri portatili FT-IR (Fourier Transform - Infrared Spectroscopy) e con UV-Vis (Ultra Violet-Visible Spectroscopy) per autenticare i semi di pistacchio e rilevare le adulterazioni con piselli verdi e arachidi, ovvero quelle più presenti in commercio.

Per questo primo studio sono stati prelevati 27 campioni di pistacchio, 9 di pisello verde essiccato e 9 di arachidi da diversi mercati turchi, tutti i campioni sono stati macinati usando un frullatore e i campioni di pistacchi sono stati adulterati con piselli verdi e arachidi dal 5% al 40% (peso/peso), separatamente. Sono state inoltre allontanate sia le sostanze non-polari che l'acqua per evitare che interferissero con l'analisi.

Nelle figure 14 A e C vengono mostrati i modelli di classificazione ottenuti dai dati degli spettri FT-IR e si può notare che il pistacchio, il pisello verde e l'arachide sono stati discriminati in modo molto distinto, ma i campioni adulterati (colorati in blu e viola) sono sovrapposti poiché è stata utilizzata solo la modellazione di classe a tre dimensioni. Le regioni di assorbimento più importanti sono state trovate tra i 1750 e i 1050 cm^{-1} associate all'allungamento dell'estere $\text{C}=\text{O}$ degli acidi grassi contenuti nel pistacchio e nelle arachidi, allo stiramento dell'ammide $\text{C}-\text{N}$ II e III (tipico delle proteine associate principalmente al pisello verde) e alle modalità di vibrazione dell'allungamento simmetrico $\text{C}-\text{H}$ (Fig. 14B).

Per permettere una maggior discriminazione tra i campioni adulterati con pisello verde e quelli adulterati con arachidi sono stati analizzati separatamente dagli altri campioni permettendo, così, di distinguere nettamente i due picchi a 951 e 893 cm^{-1} , associati ai gruppi funzionali $=\text{C}-\text{H}_2$ e $=\text{C}-\text{H}$ legati agli acidi grassi insaturi (Fig. 14D).

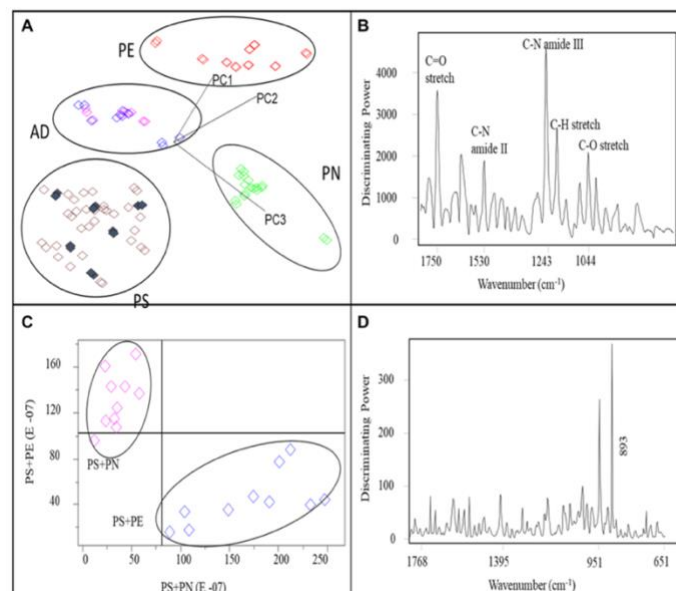


Figura 14: **A** grafici di proiezione SIMCA dei dati raccolti dallo spettrometro FT-IR per i campioni analizzati, i quadrati pieni e di colore grigio rappresentano i campioni di convalida. **B** grafico di discriminazione SIMCA che mostra le bande e le regioni responsabili della separazione di classe. **C** Plot di Cooman per la classificazione dei campioni adulterati. **D** Potere discriminante del plot di Cooman. PS = pistacchio, PE =pisello verde, PN = arachidi, AD= campioni adulterati. (Menevesoglu et. al;2020).

Un importante dato che descrive le somiglianze e/o le distinzioni tra le classi del modello SIMCA è la distanza interclasse, nota anche come ICD (Inter-Class Distance) ed è mostrata nella tabella 2. Il valore limite per l'ICD è 3, se esso è maggiore a 3 significa che c'è differenza tra le classi analizzate, se è minore invece significa che c'è somiglianza; infatti, il valore "3" nella tabella relativa al FT-IR è associato alle due classi di campioni adulterati, che, come si può vedere dalla figura 14 A, non sono ben distinti.

	FTIR					UV-VIS				
	PS	PE	PN	PS+PE	PS+PN	PS	PE	PN	PS+PE	PS+PN
PS	0	40	7	7	6	0	142	300	12	36
PE	40	0	26	76	45	142	0	347	79	66
PN	7	26	0	11	9	300	347	0	97	219
PS+PE	7	76	11	0	3	12	79	97	0	27
PS+PN	6	45	9	3	0	36	66	219	27	0

Tabella 2: Distanze di interclasse tra i campioni analizzati in base alle proiezioni SIMCA dei dati ottenuti da spettrometri portatili FT-IR e UV-VIS (Menevesoglu et.al, 2021)

L'analisi di regressione parziale dei minimi quadrati (PLSR = Partial Least Square Regression) è stata applicata ai dati ottenuti da FT-IR e le figure 15 A e 15 C mostrano la regressione del modello di calibrazione e di convalida per i pistacchi adulterati con pisello verde e arachidi in rapporti tra il 5 e il 40%. Le figure 15 B e D mostrano, invece, il vettore di regressione per i modelli di calibrazione, le regioni associate alla modellazione erano 1722, 1623, 1139 e 964 cm^{-1} per la previsione degli adulteranti del pisello verde, e tra le regioni 3010 e 2910 cm^{-1} sono associate le previsioni delle adulterazioni con le arachidi. L'unità portatile FT-IR ha mostrato grandi prestazioni nel prevedere i livelli di adulterante con rval pari a 0,99 ed errore standard di previsione 0,66% e 0,80% rispettivamente per pisello verde e arachide.

L' rval fornisce un'indicazione riguardo alla qualità del lavoro svolto, nonché all'affidabilità del metodo adottato, se assume valori pari a zero significa che non c'è relazione lineare tra le variabili, se è pari a 1 significa che è presente una totale linearità tra le variabili e nel lavoro appena analizzato era pari a 0,99, indice quindi che esiste una linearità quasi perfetta tra le variabili prese in considerazione.

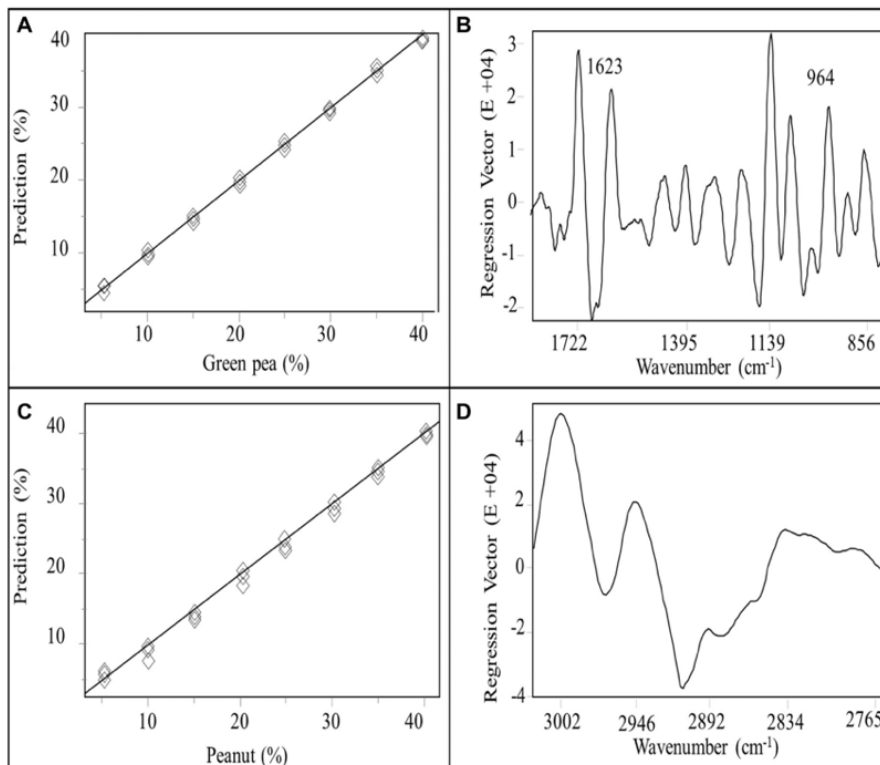


Figura 15: **A.** Grafico di calibrazione e convalida della regressione dei minimi quadrati parziali (PLSR) per i livelli di pisello verde (1870-800 cm^{-1}) *. **B.** Vettore di regressione per la calibrazione del pisello verde. **C.** Grafico di calibrazione e convalida della regressione dei minimi quadrati parziali (PLSR) per i livelli di arachidi (3030-2760 cm^{-1}) *. **D.** Vettore di regressione per la calibrazione delle arachidi ottenuto da FT-IR. (Menevesoglu et.al, 2020).

4.2 DETERMINAZIONE DELL'ORIGINE DEL PRODOTTO TRAMITE SPETTROMETRIA UV-VIS

Una classificazione simile è stata ottenuta con dati di spettrometria UV-Vis (Fig. 16A): si notano in maniera molto marcata i picchi associati alla clorofilla a 661 e 410 nm, tipici quindi del pisello verde e del pistacchio, e il picco a 452 nm associato alla vitamina A.

In contrasto con i dati FT-IR, i campioni di pistacchio adulterati (colorati in blu e viola) sono stati discriminati meglio allo spettrometro UV-Vis.

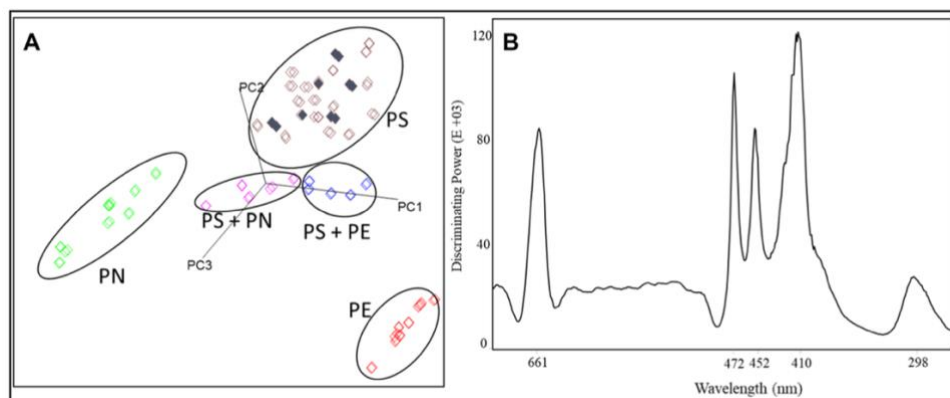


Figura 16. **A** grafici di proiezione SIMCA dei dati raccolti dallo spettrometro UV-Vis per i campioni analizzati, i quadrati pieni e di colore grigio rappresentano i campioni di convalida. **B** grafico di discriminazione SIMCA che mostra le bande e le regioni responsabili della separazione di classe. PS = pistacchio, PE = pisello verde, PN = arachidi, AD = campioni adulterati. (Menevesoglu et. al, 2020).

L'analisi PLSR è stata applicata anche ai dati ottenuti con lo spettrometro UV-Vis il quale ha mostrato un'eccellente correlazione tra i livelli di adulterante e i dati spettrali. I livelli di pisello verde sono stati previsti con rval di 0,99 ed errore standard dello 0,58% e, per quanto riguarda le arachidi, è stato trovato un rval pari a 0,99 ed un errore standard dello 0,14%, quindi sia per il pisello verde che per le arachidi gli spettrometri UV-Vis hanno dimostrato un errore standard minore rispetto ai dati ottenuti dallo spettrometro FT-IR (Menevesoglu et. al, 2020).

Per quanto riguarda l'ICD ottenuto con i dati derivanti dagli spettrometri UV-vis notiamo che, in contrasto con i dati FT-IR, i campioni di pistacchio adulterati hanno valori più alti; quindi, sono stati discriminati meglio; tale discriminazione possiamo notarla anche in figura 16 A in quanto i campioni colorati di rosa e blu sono ben distinti. Inoltre, gli altri valori di ICD sono più alti rispetto a quelli ottenuti con gli spettrometri FT-IR, per esempio: l'ICD ottenuto dai dati FT-IR tra pistacchio puro e pisello verde puro è 40, mentre per i dati ottenuti con UV-Vis è di 142 dimostrando quindi che lo spettrometro UV-Vis distingue in maniera più netta le diverse classi di campioni analizzati.

In conclusione, possiamo dire che sia le unità portatili FT-IR che le unità UV-Vis convenzionali possono fornire all'industria della frutta a guscio, in particolare agli importatori e alle agenzie di regolamentazione, uno strumento alternativo per l'autenticazione pistacchio; tali strumenti sono facili da usare, più economici dei metodi tradizionali che richiedono l'utilizzo di HPLC e Gas-Cromatografi, richiedono una formazione minima del personale, forniscono informazioni ad alto rendimento, rapide e sensibili e possono fornire valutazioni in tempo reale (Menevesoglu et.al, 2020).

4.3 UTILIZZO DI SPETTROMETRI PORTATILI FT-MIR e FT-NIR

Nel lavoro di Aykas del 2020 è stata studiata sempre la determinazione dell'adulterazione del pisello verde e dell'arachide nel pistacchio macinato, però, mediante spettroscopia portatile a medio infrarosso a trasformata di Fourier (FT-MIR) e del vicino infrarosso a trasformata di Fourier (FT-NIR), due metodi rapidi per rilevare le adulterazioni nel pistacchio e che rispondono alla necessità dell'industria alimentare di avere metodi analitici rapidi ed efficaci da implementare nel loro sistema di gestione. Gli spettrometri portatili FT-MIR e FT-NIR sono semplici, non invasivi, rapidi, facili da trasportare e alternative più economiche ai metodi tradizionali, tra cui cromatografia (GC, HPLC) e spettroscopia di massa GC-MS, LC-MS.

Sono stati presi per questo studio 40 campioni di pistacchi, 10 di pisello verde essiccato e 10 di arachidi da diversi mercati turchi. Per formare i campioni adulterati sono stati scelti casualmente dei campioni di pistacchio in polvere e mescolati con campioni di piselli e arachidi in polvere (anch'essi scelti casualmente) con concentrazioni crescenti dal 5 al 40% (peso/peso). Sono stati quindi effettuati dei calcoli per generare 100 g di miscela finale (95 g di arachidi in polvere + 5 g di piselli in polvere, 90 g di arachidi in polvere + 10 g di piselli in polvere, ...).

I dati sono stati analizzati da Soft Independent Modeling of Class Analogy (SIMCA) per generare un modello di classificazione per autenticare il pistacchio puro e Partial Least Square Regression (PLSR) per prevedere i livelli di adulteranti nel pistacchio.

Le regioni di assorbimento più importanti sono state associate alle modalità di vibrazione di stretching dell'estere C=O, all'allungamento dell'ammide C-N (II) e (III) e alle modalità di vibrazione di stretching simmetrico C-H. Il picco a 2850 cm^{-1} viene associato alle vibrazioni di allungamento asimmetriche e simmetriche degli acidi grassi a catena lunga e questa discriminazione è resa possibile grazie al fatto che il pistacchio e l'arachide hanno più lipidi del pisello verde (Millar, Gallagher, Burke, McCarthy, & Barry-Ryan, 2019); l'assorbimento intorno ai 1560 cm^{-1} è associato alle modalità di stretching C-N e alle vibrazioni di flessione N-H nelle proteine, questa discriminazione potrebbe essere correlata al fatto che il pisello verde ha un profilo amminoacidico diverso rispetto al pistacchio e all'arachide (Bailey & Stein, 2020). Tra 1300 e 1100

cm⁻¹ vi sono associate le vibrazioni molecolari dei carboidrati, presenti in elevata quantità nel pisello verde (circa il 60-65 % del loro peso secco) (Wu et. al, 2023).

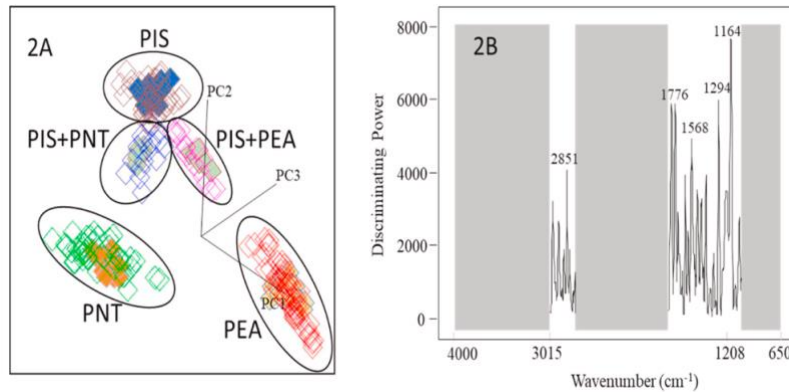


Figura 17.A. SIMCA di raccolti dallo spettrometro FT-MIR per campioni analizzati. B. Regioni responsabili della separazione di classe. PIS: pistacchio; PNT: arachidi; PEA: pisello verde. (quadri non riempiti – set di calibrazione, quadrati riempiti – set di convalida). (Aykas et.al, 2020)

Nella Tabella 3, la distanza tra classi dei campioni (nota come ICD, Inter-Class Distance) ha mostrato valori minimi di 3,5 tra i campioni di pistacchio adulterati con arachidi e il pistacchio puro. Questi due gruppi appartengono a classi distinte, come evidenziato sia dal grafico che dal fatto che l'ICD è maggiore di 3; tuttavia, è stato osservato che alcuni campioni tendono a sovrapporsi tra i due gruppi.

Dall'analisi della Figura 18 emerge chiaramente che i campioni di pistacchio puro, piselli, arachidi e pistacchio adulterato sono stati distintamente separati in gruppi. Il picco osservato a 4826 cm⁻¹ è correlato agli stretching e alle combinazioni delle proteine, come indicato da Firmani et al. (2019). Questa discrepanza potrebbe derivare dalle differenze nei contenuti proteici tra pistacchio, arachidi e piselli, con i piselli verdi che presentano il più alto tenore proteico. D'altra parte, il picco a 5760 cm⁻¹ è associato agli acidi grassi, come riportato da Anand Subramanian (2009), probabilmente a causa delle variazioni nei contenuti di acidi grassi tra pistacchio e arachidi.

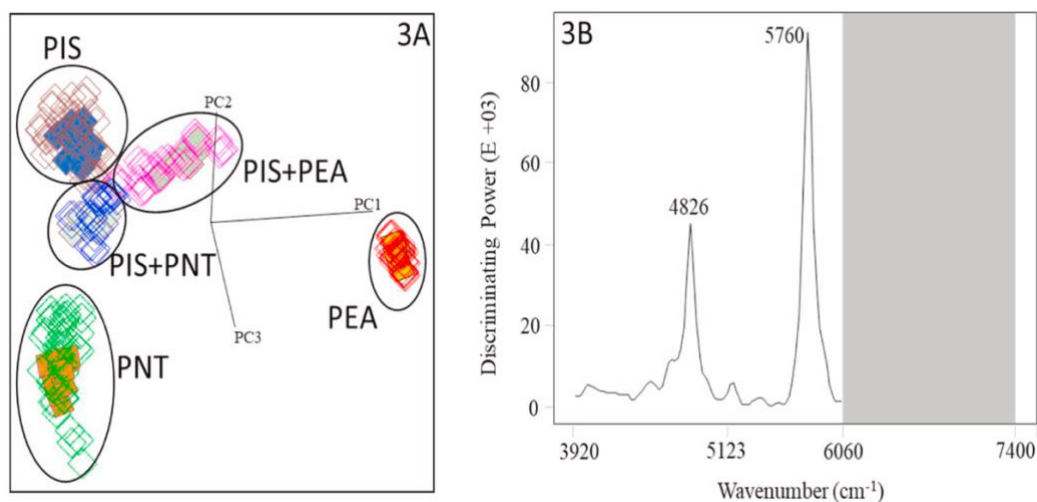


Figura 18. **A.** SIMCA di dati raccolti dallo spettrometro FT-NIR per i campioni analizzati. **B.** Regioni responsabili della separazione di classe. PIS: pistacchio; PNT: arachidi; PEA: pisello verde. (quadri non riempiti – set di calibrazione, quadrati riempiti – set di convalida). (Aykas et.al, 2020)

I dati relativi alla distanza interclasse (ICD) dei campioni analizzati mediante spettrometria FT-NIR sono riportati nella Tabella 3, con il valore minimo di 13,6 riscontrato tra i campioni di pistacchio adulterati con pisello verde. È interessante notare che, confrontando i valori di ICD ottenuti dai due spettrometri FT-MIR e FT-NIR, si è riscontrato che gli spettri ottenuti con FT-NIR presentavano valori più elevati di ICD. Questo suggerisce che la classificazione utilizzando la spettrometria FT-NIR consente una migliore separazione dei campioni rispetto alla spettrometria FT-MIR, come indicato da Aykas e Menevesoglu (2021).

	FT-MIR				
	PIS	PEA	PNT	PIS + PEA	PIS + PNT
PIS	0	46.7	6.5	4.4	3.5
PEA	45.7	0	68.4	61.9	99.8
PNT	6.5	68.4	0	12.0	5.9
PIS + PEA	4.4	61.9	12.0	0	5.4
PIS + PNT	3.5	99.8	5.9	5.4	0

	FT-NIR				
	PIS	PEA	PNT	PIS + PEA	PIS + PNT
PIS	0	228.6	10.7	13.4	13.6
PEA	228.6	0	140.7	190.3	253.4
PNT	10.7	140.7	0	12.2	8.5
PIS + PEA	13.4	190.3	12.2	0	33.8
PIS + PNT	13.6	253.4	8.5	33.8	0

Tabella 3. ICD tra i campioni analizzati sulla base delle proiezioni SIMCA dei dati ottenuti da FT-MIR e FT-NIR. (Aykas, Menevesoglu, 2021)

Pertanto, dai risultati di questo secondo studio che esamina l'applicazione di spettroscopi portatili FT-NIR e FT-MIR, emerge che lo spettrometro FT-NIR ha dimostrato una maggiore efficacia

rispetto all'unità FT-MIR. Questi dati supportano l'idea che gli spettroscopi portatili FT-MIR e FT-NIR rappresentino strumenti validi per condurre controlli regolari sull'autenticità del pistacchio. Inoltre, offrono all'industria della frutta a guscio uno strumento non invasivo e pratico per rilevare eventuali adulterazioni di piselli e arachidi nel pistacchio macinato.

4.4 UTILIZZO DELLA TECNICA PCR PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DEL PISTACCHIO CON PISELLO VERDE

I semi di pistacchio in forma tritata, o macinata, sono commercializzati nell'industria alimentare come ingrediente grezzo per la produzione di prodotti da forno e semilavorati per l'industria dolciaria come la pasta di pistacchio. Secondo Sen e colleghi, proprio nell'industria dolciaria, c'è un rapporto di adulterazione del pisello verde nei pistacchi macinati del 30% (Sen et.al 2020).

La tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) è fondamentale nel campo della genetica molecolare e ha trovato successo anche nell'ambito della ricerca alimentare, contribuendo così alla nascita della disciplina conosciuta come "genomica alimentare".

Fu inventata nel 1985, da Mullis e colleghi per la quale ricevettero il premio Nobel, è una tecnica di amplificazione degli acidi nucleici basata sulla denaturazione e ricomposizione di brevi segmenti di DNA, o di sequenze dell'acido ribonucleico (RNA), grazie all'uso dell'enzima polimerasi I isolato dal batterio *Thermus aquaticus*. Dal 1985 ad oggi ha assunto grande importanza come tecnica analitica in molti ambiti, non solo in campo alimentare, grazie alla sua capacità di esaminare e rilevare componenti del DNA (NCBI).

In generale, come dimostrato in figura 19, l'analisi inizia con la raccolta di un piccolo campione di DNA in una provetta, si susseguono poi tre fasi principali: denaturazione, ibridazione ed amplificazione. Durante la fase di denaturazione, il DNA viene riscaldato a 95 °C per dissociare i legami idrogeno tra le coppie di basi del DNA a doppio filamento, successivamente si verifica il processo di ibridazione che comporta il raffreddamento del DNA denaturato a una temperatura compresa tra 37° e 72 °C, consentendo ai primer di legarsi al singolo filamento nei rispettivi siti complementari a partire dall'estremità 3'; dopo tale legame la polimerasi inizia ad agire generando due molecole a doppio filamento in direzione 5'.

Questa procedura viene ripetuta più volte grazie all'uso di un termociclatore, un dispositivo che controlla tempo e temperatura di ciascun ciclo. Vengono fatti dai 30 ai 40 cicli (NCBI).

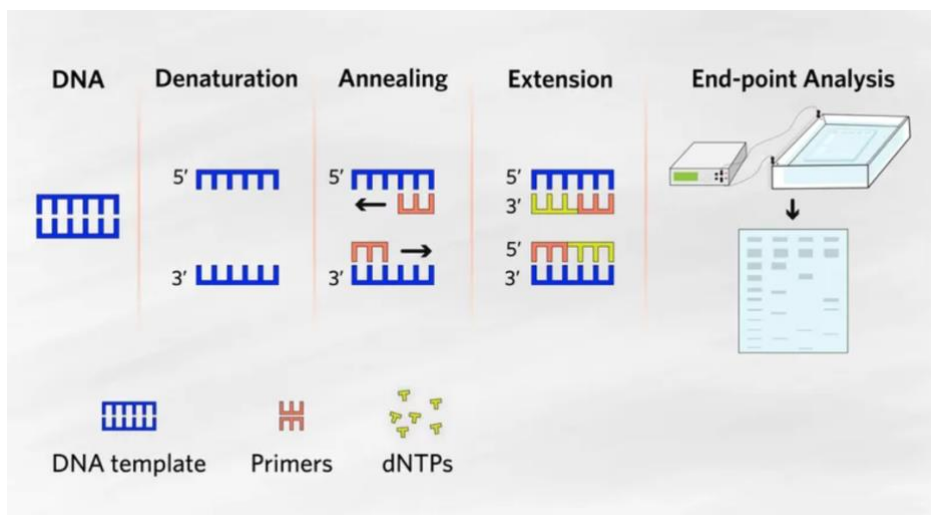


Figura 19. Funzionamento della PCR con analisi dei prodotti finali in elettroforesi con gel di agarosio (The Scientist, 2024)

La scelta di mirare al DNA come molecola analitica offre vantaggi significativi nell'analisi degli alimenti perché il DNA non è influenzato dall'ambiente, a differenza dei caratteri metabolici che possono variare notevolmente tra i campioni a causa di fattori come: regione di crescita, condizioni climatiche, pratiche agricole, trasporto, lavorazione, imballaggio e stoccaggio. Analizzando il DNA, si evita la variazione della composizione dovuta all'ambiente o alla lavorazione.

Un altro grande vantaggio è la capacità di amplificare l'analita, che aumenta di molto la sensibilità nel rilevare l'origine delle specie o identificare delle componenti minori. Le sequenze genomiche ottenute, note come “codici a barre del DNA”, sono strumenti estremamente utili nelle analisi genomiche alimentari perché, con un codice a barre, è possibile amplificare contemporaneamente tutte le componenti delle specie presenti in un campione. L'approccio del “codice a barre” è stato impiegato per risolvere le sfide legate all'autenticità in una vasta gamma di prodotti alimentari, ad esempio: il polimorfismo nel gene mitocondriale *cytB* (citocromo B) è ampiamente utilizzato per l'analisi dell'autenticità dei prodotti ittici, altri studi dimostrano che l'analisi dell'introne del gene cloroplastico *trnL* (tRNA leucina) è in grado di discriminare le specie di legumi, di autenticare l'origine botanica dei frutti usati per la produzione di succhi di frutta e di rilevare la presenza di nocciola negli alimenti trasformati. Un altro codice a barre preso in considerazione in analisi genomiche è il distanziatore intergenico *trnL* (UAA)-*trnF* (GAA) del genoma plastidiale che è stato utilizzato per autenticare l'origine botanica delle tisane tramite la genotipizzazione PCR ed elettroforesi capillare (PCR-CE) (Sen et.al 2020).

Nello studio di Sen e colleghi è stato messo a punto un test basato su PCR-CE che si concentra sul distanziatore intergenico trnL (UAA)-trnF (GAA) al fine di autenticare i prodotti derivati dal pistacchio. Una delle caratteristiche chiave di questo approccio è stata la notevole differenza di dimensioni del codice a barre del pistacchio rispetto al suo adulterante più comune, il pisello verde. Questo ha consentito una distinzione diretta tra le due specie e la capacità di individuare anche miscele contenenti piselli all'interno del pistacchio (Sen et.al 2020).

Il materiale di partenza, composto da pistacchi (*P. vera*) e piselli (*P. sativum*), è stato ottenuto presso il Dipartimento di Orticoltura dell'Università di Selcuk, in Turchia. I pistacchi (tostati e non sgusciati) e i piselli verdi (congelati) sono stati acquistati presso negozi al dettaglio. Successivamente, i campioni di pistacchio e piselli sono stati macinati e mescolati per ottenere una miscela omogenea, creando poi diversi rapporti "pistacchio-pisello" (70:30, 80:20, 90:10 e 95:5%), ciascuno preparato in duplicato. Per l'estrazione del DNA dai campioni, è stato seguito un protocollo specifico, con estrazioni eseguite in due repliche (Sen et.al 2020).

Il test PCR-CE, che comprende l'amplificazione del codice a barre seguita dall'elettroforesi capillare, è stato ripetuto tre volte per ciascun campione di DNA al fine di garantire la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati ottenuti. Gli amplificati ottenuti sono stati inseriti in un sistema di elettroforesi capillare in piastre con 96 pozzetti e i profili dei codici a barre sono stati visualizzati ed analizzati utilizzando il software QIAxcel ScreenGel (Sen et.al 2020).

Una volta identificato il codice a barre appropriato, ovvero il distanziatore intergenico trnL (UAA)-trnF (GAA) del genoma plastide, è stato possibile standardizzare un test di rilevamento dell'adulterazione sensibile ed affidabile (Sen et.al 2020).

I risultati sono stati netti: la dimensione del distanziatore intergenico trnL-trnF ottenuta dal pistacchio è stata di 449 pb (paia di basi) e quella del pisello è stata di 179 pb, questa differenza di dimensione dei codici a barre, pari a 270 pb, ha permesso una rapida discriminazione tra pistacchio e pisello verde.

trnL (UAA)-trnF (GAA) intergenic spacer PCR-CE profiles of pistachio, green pea and pistachio : green pea admixtures

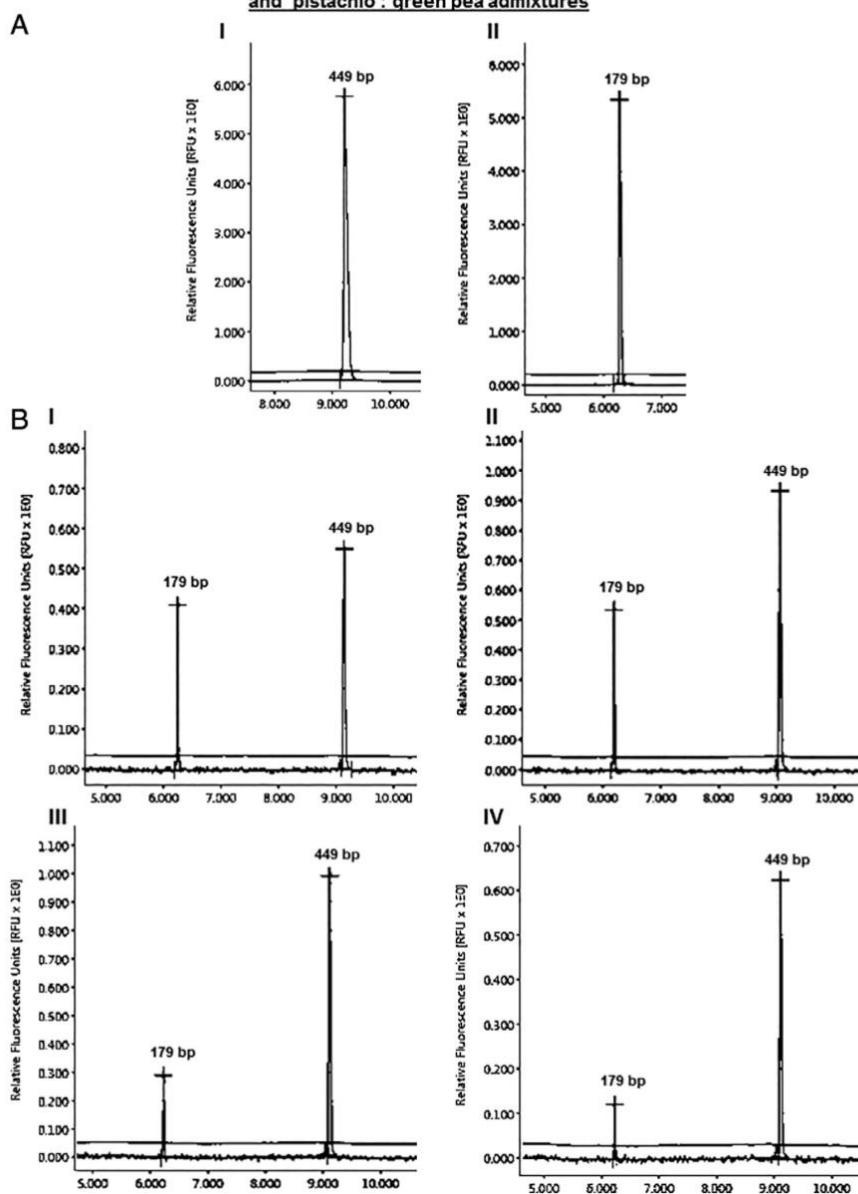


Figura 20. Elettroferogrammi capillari che mostrano i risultati del test PCR-CE del codice a barre preso in esame. **A1.** *trnL (UAA)-trnF (GAA)* del pistacchio (*Pistacia vera L.*); **A2.** *trnL (UAA)-trnF (GAA)* del pisello verde (*Pisum sativum L.*) **B.** profili di amplificazione del distanziatore intergenico *trnL (UAA)-trnF (GAA)* del pistacchio adulterato con pisello verde. L'ordine dei rapporti di miscelazione (pistacchio: pisello) è il seguente **I.** 70: 30%; **II.** 80: 20%; **III.** 90: 10%; **IV.** 95: 5%. (Sen et.al 2020).

Nel caso di tutti e quattro i rapporti di miscelazione (70:30, 80:20, 90:10 e 95:5%), gli elettroferogrammi capillari hanno mostrato in modo riproducibile i frammenti di codice a barre di entrambe le specie (Fig. 20). Il frammento di codice a barre specifico per il pisello verde di 179 pb è stato chiaramente distinto dalla banda specifica per il pistacchio di 449 pb in tutti gli esperimenti. È stato quindi possibile rilevare con successo l'adulterazione del pisello verde nei semi di pistacchio tostati e macinati fino a un limite del 5% utilizzando l'analisi dell'introne *trnL-trnF* con PCR-CE (Sen et.al 2020).

Le condizioni di trasformazione alimentare che comportano trattamenti ad alte temperature o alte pressioni non interferiscono con i risultati dell'analisi del DNA, ci sono da 10 a 100 plastidi in una cellula vegetale, ognuna delle quali contiene più copie del genoma del plastide (circa 100 copie), di conseguenza, il genoma raggiunge numeri di copie molto elevati.

Possiamo quindi concludere che il test PCR-CE proposto nel presente lavoro è un test facile da applicare, veloce e robusto che rileva la presenza di pistacchio e pisello contemporaneamente quando coesistono in una miscela. Il saggio si sviluppa in tre fasi: estrazione del DNA, amplificazione PCR e separazione elettroforetica. Non sono necessarie ulteriori analisi statistiche semplicemente se il frammento di 179 bp specifico del pisello verde, o qualsiasi altro frammento estraneo, coesiste con il frammento da 449 bp, il campione di pistacchio è identificato come "adulterato".

Il test ha quindi il potenziale per essere adottato dall'industria alimentare come test di routine per materie prime (ad esempio, pistacchio macinato e polvere di pistacchio) o prodotti trasformati (come la pasta di pistacchio) con etichette che ne affermano la purezza al 100%. La semplicità di applicazione del test PCR-CE lo rende un test candidato per essere utilizzato dai laboratori di qualità alimentare nel settore pubblico o nell'industria alimentare (Sen et.al 2020).

4.5 UTILIZZO DELLA LIBS (LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY) PER IDENTIFICARE L'ADULTERAZIONE DEL PISTACCHIO

La tecnica spettroscopica atomica LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) impiega impulsi laser intensi per vaporizzare una minima porzione di campione, tale vaporizzazione genera un plasma ad alta temperatura, compreso tra 10.000 °K e 20.000 °K, nel quale le molecole bersaglio vengono eccitate e ionizzate. Successivamente, avviene una fase di "raffreddamento" durante la quale gli atomi rilasciano energia sotto forma di fotoni, questa radiazione luminosa viene raccolta, dispersa attraverso uno spettrometro e i picchi di emissione risultanti vengono analizzati per identificare con precisione tutti gli elementi presenti nel campione. Nel caso di campioni solidi, la LIBS si manifesta attraverso una serie complessa di processi fisici che comprendono vari passaggi, approssimativamente raggruppati come: l'interazione del laser con il solido, la rimozione della massa dal campione (ablazione) e la formazione del plasma (ripartizione).

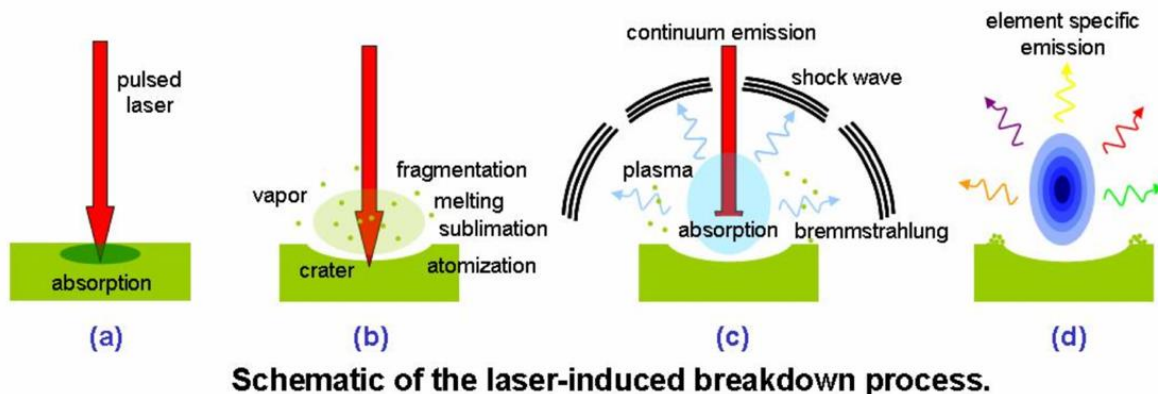


Figura 21. Funzionamento della tecnica LIBS (Windsor University)

Nella figura 21 viene spiegato il funzionamento della LIBS: In fig.21a il processo ha inizio con l'assorbimento di energia da parte del solido tramite un impulso di radiazione pulsata, con durate tipiche dell'ordine dei nano-secondi. L'energia assorbita viene quindi rapidamente trasformata in calore, causando la vaporizzazione del campione (ablazione), nel frattempo l'impulso laser continua ad interagire con la "nube" di vapore, che tende a condensarsi in piccole goccioline, questo porta all'assorbimento e alla dispersione del raggio laser che causa un notevole aumento di temperatura e la formazione di plasma. Dopo la formazione del plasma, l'elevata densità di elettroni produce uno spettro di emissione continuo e non specifico, dovuto alle interazioni ioniche; successivamente, come mostrato nella figura 21d, dopo circa 1 microsecondo dall'impulso di ablazione, è possibile identificare le emissioni. In questo modo, tutti gli elementi presenti nel campione possono essere osservati simultaneamente (Rehese, University of Windsor).

L'obiettivo dello studio di Sezer e colleghi del 2018 è stato quello di valutare il potenziale della tecnica LIBS come metodo rapido per determinare l'adulterazione del pistacchio con spinaci e piselli, combinato con l'analisi dei dati chemiometrici, come l'analisi delle componenti principali (PCA = Principal Component Analysis) e quella dei minimi quadrati parziali (PLS). Hanno scelto tale tecnica analitica perché, alla luce delle loro conoscenze, non era ancora stata utilizzata, a differenza di altre tecniche come l'ICP-OES (Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry) o l'AAS (Atomic Absorption Spectroscopy).

L'esperimento è stato condotto con l'utilizzo di 9 campioni di pistacchi, 9 di spinaci e 9 di piselli verdi provenienti dai principali produttori in diverse regioni della Turchia. Per evitare variazioni dovute alla stagionalità, i campioni sono stati acquistati da nove fornitori diversi durante un periodo di sei mesi. I campioni di piselli e spinaci sono stati lavati per eliminare eventuali impurità, quindi essiccati a 70°C per tre ore e successivamente macinati e trasformati in pellet utilizzando una pressa. Ogni campione è stato preparato e analizzato in duplicato (Sezer et. al, 2018).

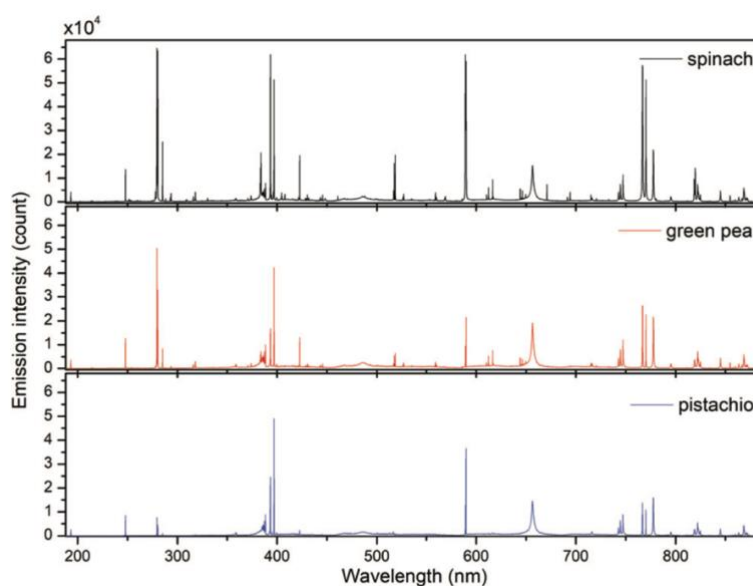


Figura 22. Spettri LIBS di: spinaci, pisello verde e pistacchio (Sezer et.al, 2018)

La figura 22 contiene le linee di emissione caratteristiche per i diversi elementi e l'altezza dei picchi rappresenta l'intensità del segnale, che è direttamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione. Emerge che il pistacchio manifesta la presenza di diversi elementi, sia di natura organica (come C, H, O) che inorganica come Fe, Ca, Mg, K, Na, P, particolarmente rilevanti sono state le variazioni osservate nei livelli di Fe (260 nm) Mg (280 e 820 nm), Ca (tra 390 e 440 nm), Na (590 nm) e K (tra 770 e 790 nm), identificate con l'ausilio della PCA (Principal Component Analysis).

È stato possibile attribuire alle lunghezze d'onda il valore degli elementi corrispondenti grazie ai campioni che Sezer e colleghi hanno analizzato con ICP-OES ed AAS, riassunti nella tabella sottostante:

Obtained emission lines (nm)	Possible elements
214.895	P I (214.910)
259.952	Fe I (259.956)
263.080	Fe I (263.087)
279.500	Mg I (279.553)
280.204	Zn I (280.200)
285.152	Fe I (285.160)
393.360	Ca II (393.366), Ca I (393.529)
396.821	Ca II (396.8469)
422.700	Ca I (422.672), Ca II (422.815)
443.548	Ca I (443.569)
445.517	Ca I (445.478)
516.929	Fe I (516.957)
517.474	Fe I (517.456)
518.426	Fe I (518.524)
589.245	Na I (588.995)
589.806	Na I (588.995)
716.065	Ca I (714.815), Fe I (714.814)
766.783	K I (766.489)
770.107	K I (769.8965)
819.221	Na I (819.482)
821.922	Mg I (821.3034)

Tabella 4. Correlazione tra lunghezza d'onda ed elementi (Sezer et, al, 2018)

Dalla figura 22 si nota chiaramente che gli spinaci rappresentano la variabile con più sostanze minerali, in quanto contengono molti più picchi rispetto agli altri due campioni e con altezze maggiori, che indicano un'alta intensità di segnale.

Per l'analisi qualitativa è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali (PCA) per discriminare i campioni e i risultati hanno dimostrato delle nette differenze: sono stati distinti tutti e 5 i gruppi presi in esame, 3 appartenenti ai campioni "puri" di pistacchio, spinaci e piselli e 2 associati ai campioni di pistacchio adulterati con miscele di spinaci e piselli essiccati. Nello specifico notiamo che in fig. 23(b) il primo componente (PC1) ha spiegato l'86,86% della varianza prendendo in considerazione Ca, Na e K poiché sono stati osservati alti valori di picchi positivi nelle gamme 390 – 400 nm, 580 – 590 nm e 760 – 770 nm dello spettro LIBS mentre PC2 ha spiegato il 12,16% della varianza prendendo in considerazione il Magnesio che ha un alto valore osservato per picchi nell'intervallo 275-280nm. Nel modello PCA, PC1 e PC2 spiegano quindi con successo il 99% della varianza (Sezer et. al, 2018).

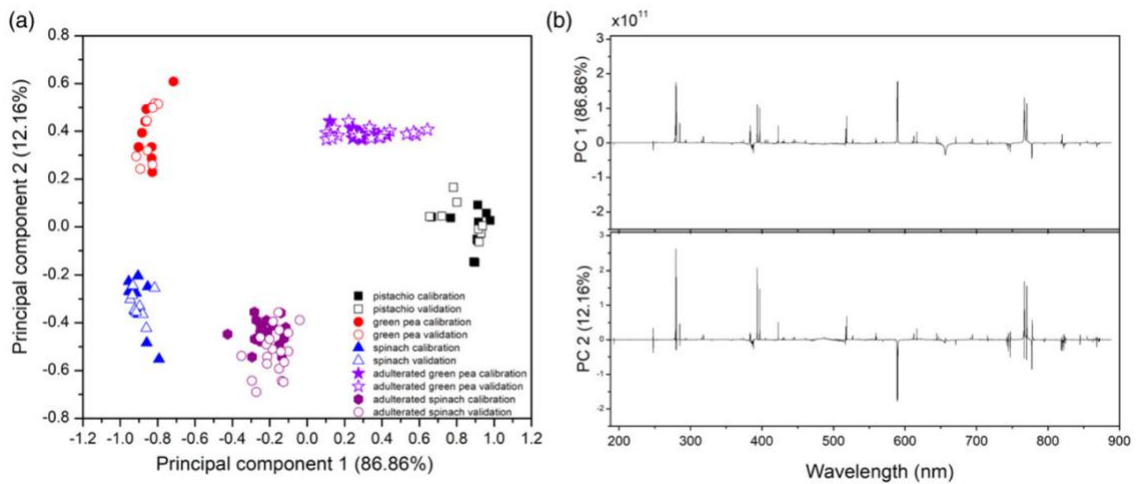


Figura 23 Analisi PCA dei campioni di pistacchio adulterato con pisello verde e spinaci (Sezer et.al, 2018)

Nell'analisi quantitativa, è stato adottato il metodo PLS per stabilire la relazione tra il grado di adulterazione e l'aumento del contenuto di elementi rilevato negli spettri LIBS. Sono stati calcolati diversi parametri per valutare l'affidabilità del metodo, tra cui: RMSEC (Root Mean Square Error of Calibration) e RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction) che presentavano valori bassi dimostrando quindi l'accuratezza dei modelli di calibrazione e di previsione, LOD (Limite di Rilevabilità) e LOQ (Limite di Quantificazione) usati per determinare i limiti di identificazione e quantificazione degli analiti, e infine la deviazione standard con un valore compreso tra il 5% e il 5,8%, e un coefficiente di determinazione (R^2) di 0,988 e 0,989 rispettivamente per i piselli e gli spinaci. Questi valori dimostrano una correlazione solida, sebbene non perfetta, tra i dati analizzati (Sezer et. al, 2018).

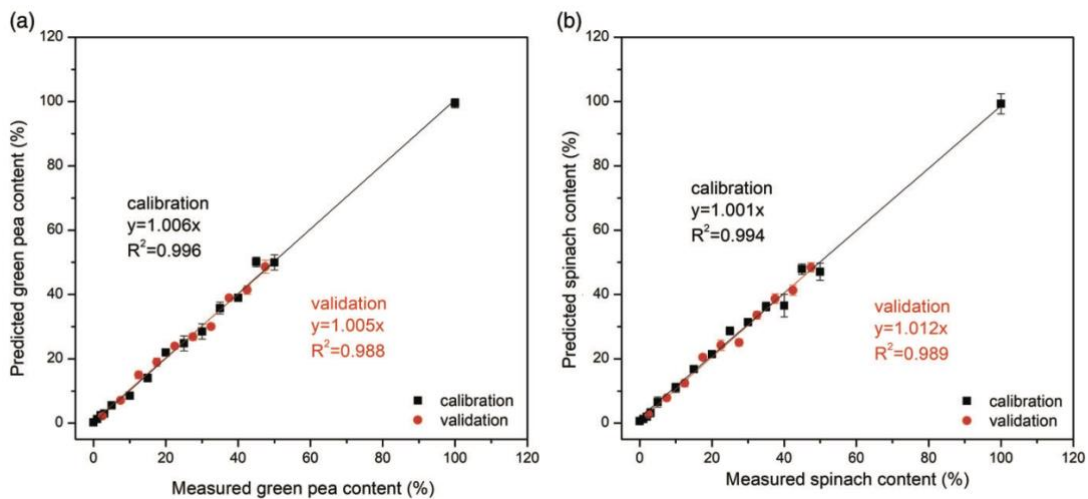


Figura 24. Analisi PLS dell'adulterazione di campioni di pistacchio con piselli (a) e spinaci (b) (Sezer et. al, 2018)

I risultati ottenuti con la tecnica LIBS hanno dimostrato che le differenze di composizione in Fe, Mg, Ca, Na, K, P e Mg tra campioni di pistacchio, pisello e spinaci possono essere utilizzate per la loro discriminazione, permettendo inoltre di riconoscere con affidabilità i campioni adulterati da quelli puri. Possiamo concludere che l'intero spettro LIBS fornisce una discriminazione qualitativa e quantitativa con risultati accurati (Sezer et. al, 2018).

4.6 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE LE FRODI SULLA PROVENIENZA DEL PISTACCHIO

Esistono numerose ricerche che affrontano il problema della determinazione dell'autenticità di vari prodotti alimentari, specialmente riguardo la loro provenienza geografica. Queste sfide vengono spesso affrontate e superate mediante l'utilizzo della spettroscopia del vicino infrarosso (NIR), combinata con l'applicazione di tecniche di classificazione chemiometriche per analizzare i dati. La capacità di questa tecnica spettroscopica di affrontare le questioni legate all'autenticazione dei prodotti alimentari ha suscitato grande interesse da parte di ricercatori e aziende del settore perché, come sappiamo, è un metodo rapido, economico ed ha un impatto ambientale ridotto, rendendola una tecnica conforme ai principi della sostenibilità e dell'attenzione verso l'ambiente. Inoltre, in molti casi, l'impiego della spettroscopia NIR consente agli operatori di analizzare i campioni senza dover effettuare alcun trattamento chimico o fisico preliminare. In ambito di autenticazione dell'origine alimentare, tali approcci sono stati già applicati con successo, ad esempio, per distinguere la provenienza geografica di oli d'oliva, carne, formaggi e miele; tuttavia, fino ad oggi, questo metodo non è stato sperimentato per tracciare l'origine dei campioni di pistacchio, ed è per questo che Vitale et. al hanno voluto testare la spettroscopia NIR per autenticare 483 campioni di pistacchio provenienti da diverse regioni del mondo, in particolare l'hanno voluta testare per il riconoscimento dei pistacchi provenienti da Bronte (Vitale et. al, 2013).

I dati spettrali sono stati elaborati mediante tecniche di classificazione SIMCA e PLS-DA. Entrambi gli approcci hanno prodotto modelli di classificazione con elevate accuratèzze, specialmente per il pistacchio di Bronte, l'unico a ottenere una classificazione corretta superiore al 95%. In particolare, il modello PLS-DA ha ottenuto un'accuratèzza del 97.48% in fase di calibrazione e del 95.14% in fase di previsione per il pistacchio di Bronte (Vitale et. al, 2013).

Nel grafico del modello PLS-DA, come notiamo in figura 25, sono state aggiunte delle linee orizzontali per facilitare la visualizzazione dei valori sopra i quali è stato assegnato un campione alla particolare categoria. Si può vedere che il modello PLS-DA ottimale è stato in grado di prevedere correttamente il paese di origine della maggior parte dei campioni di convalida, confermando così l'efficacia dell'approccio. Questi risultati indicano che la classe di appartenenza di campioni sconosciuti può essere prevista in modo molto accurato (l'errore di previsione è inferiore al 10% per tutte le categorie con l'unica eccezione dell'Iran). Inoltre, è anche possibile osservare relativamente bene il raggruppamento di campioni delle diverse categorie anche se, a causa della complessità del modello, è difficile apprezzare la separazione tra le classi su questa rappresentazione.

I due campioni di pistacchio distinti in maniera netta sono stati quelli provenienti da Bronte e dagli USA, come dimostra la figura 25 (Vitale et. al, 2013).

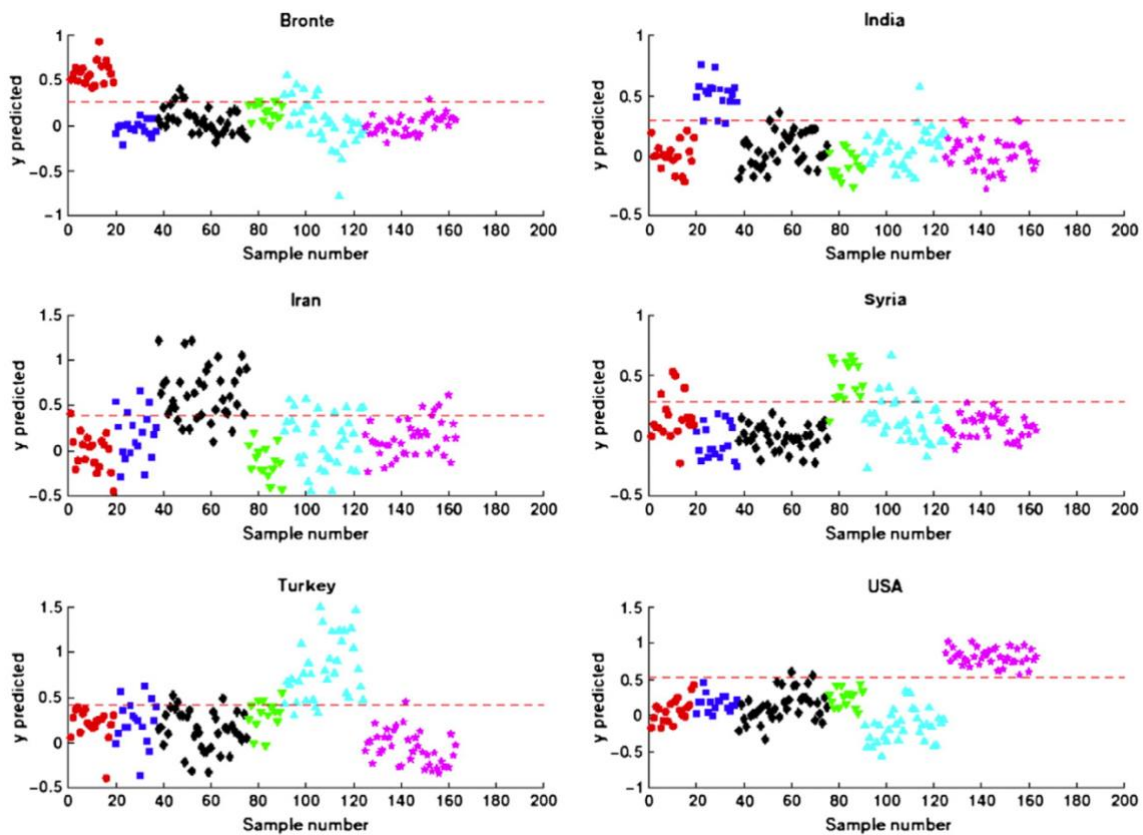


Figura 25. Analisi PLS-DA: Le linee orizzontali indicano la soglia al di sopra della quale un campione è assegnato a quella particolare classe (rosso = Bronte, blu = India, nero = Iran, verde = Siria, turchese = Turchia, viola: USA) (Vitale et. al, 2013).

Per quanto riguarda il modello SIMCA, possiamo affermare che ha mostrato un'alta sensibilità e specificità nella previsione dell'origine del pistacchio di Bronte, come raffigurato in figura 26 dove possiamo notare facilmente quali campioni sono stati accettati e quali rifiutati. Le linee tratteggiate nei grafici corrispondono ai valori di soglia al di sotto dei quali i campioni sono accettati dal modello della categoria considerata, e per quanto riguarda Bronte appartengono quasi tutti alla categoria designata.

Alcuni campioni, come quelli derivanti dall'Iran e dalla Turchia, non si sono distinti nettamente, presentando delle percentuali di sensibilità e specificità più bassi rispetto agli altri campioni che presentavano valori superiori all'80%; ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che i campioni provenienti da queste due regioni sono prodotti in varie aree sparse nel paese, lontane l'una dall'altra e caratterizzate da diversi climi, condizioni ambientali e valori di latitudine: per tenere conto di questa eterogeneità, mantenendo valori ragionevoli di sensibilità, i modelli SIMCA devono essere ampi a scapito della specificità (Vitale et. al, 2013).

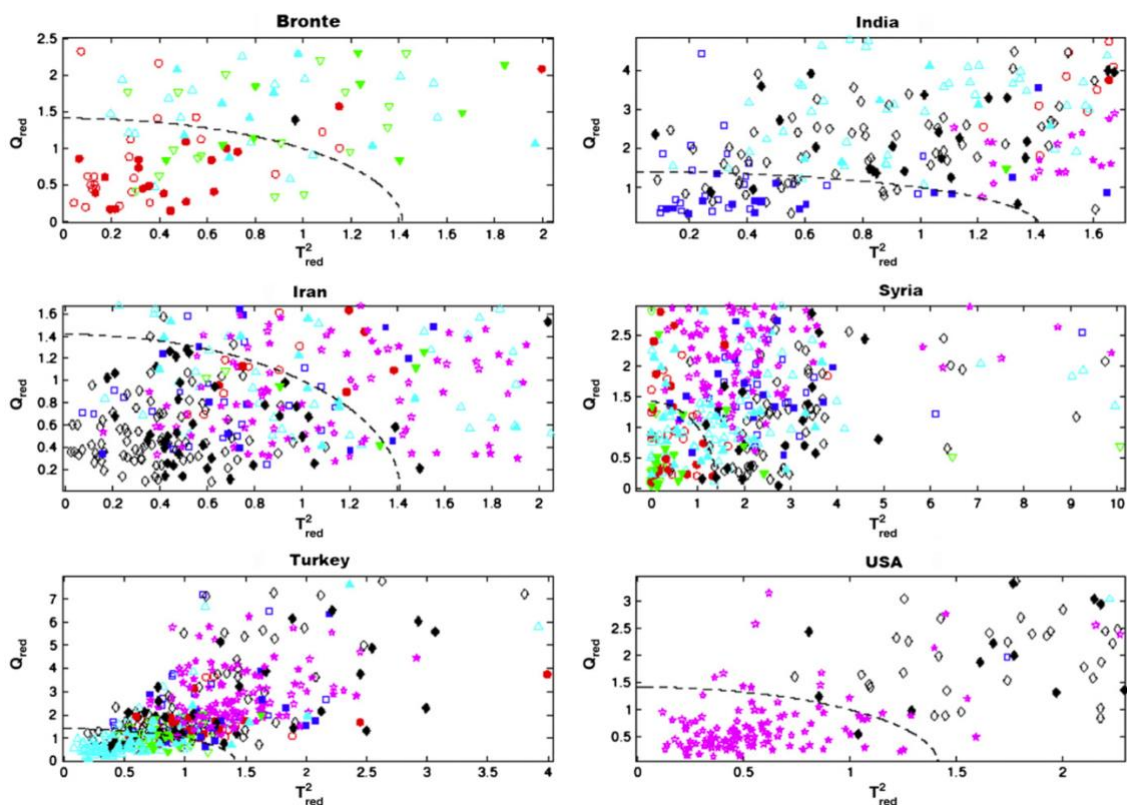


Figura 26. Analisi SIMCA delle 6 categorie analizzate, i simboli vuoti corrispondono ai campioni usati per la calibrazione del metodo, mentre quelli pieni sono di convalida (rosso = Bronte, blu = India, nero = Iran, verde = Siria, turchese = Turchia, viola = USA) (Vitale et. al, 2013).

I risultati per entrambi gli approcci di classificazione sono molto soddisfacenti: l'origine di oltre il 95% dei campioni di convalida è stata correttamente prevista utilizzando PLS-DA e questi risultati sono stati confermati dalla modellazione SIMCA degli stessi dati che ha permesso di costruire modelli molto sensibili e altamente specifici per l'autenticazione della provenienza dei pistacchi. In particolare, i risultati ottenuti per la categoria Bronte sono davvero promettenti e pongono le basi per costruire un modello di tracciabilità affidabile. Possiamo concludere che la spettroscopia NIR accoppiata alle tecniche chemiometriche è un valido strumento per tracciare l'origine dei campioni di pistacchio, fornendo un'analisi rapida, economica e non invasiva (Vitale et. al, 2013).

4.7 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DELLA PASTA DI PISTACCHIO CON OLIO DI GIRASOLE

Le varietà di pistacchi italiani sono considerate tra le migliori al mondo, il che giustifica i loro prezzi relativamente elevati, che possono arrivare a circa 25€ al chilogrammo. La pasta di pistacchio, menzionata precedentemente, viene ottenuta dai semi di pistacchio sia tostati che non, ed è un ingrediente di grande rilevanza nell'industria dolciaria. In Italia, la produzione di gelati, da sola, utilizza centinaia di tonnellate di questa pasta ogni anno (Bernardi et.al, 2014).

Le paste di pistacchio solitamente presentano un contenuto lipidico che oscilla tra il 40% e il 50%, tuttavia, il notevole aumento del prezzo della pasta di pistacchio rispetto ad altre fonti lipidiche meno costose ha portato a un incremento dell'uso di adulteranti intenzionali a base di oli vegetali, come ad esempio l'olio di girasole, che ha un costo di circa 1€ al chilogrammo, raggiungendo livelli fino al 15% di adulterazione nei prodotti commercializzati. Come indicatore per identificare l'avvenuta adulterazione si analizza la composizione degli steroli totali e la ricerca di Bernardi et.al si propone di valutare il potenziale della spettroscopia NIR come strumento di screening per rilevare l'eventuale adulterazione della pasta di pistacchio nell'industria dolciaria (Bernardi et.al, 2014).

Non viene utilizzata l'analisi tradizionale della composizione degli acidi grassi perché non è abbastanza efficace, dato che le variazioni nella composizione sono solitamente minime e non permettono una netta distinzione tra gli acidi grassi appartenenti al campione puro, non adulterato rispetto agli acidi grassi appartenenti all'adulterante; d'altra parte, i parametri quantitativi degli adulteranti, come l'olio di girasole, sono influenzati da fattori come il clima, l'origine geografica e il grado di maturazione dei semi che possono essere alterati facilmente dalla raffinazione e dalla lavorazione degli oli.

Non solo l'analisi degli acidi grassi presenta delle criticità, ma anche l'analisi dei trigliceridi non è adatta a causa delle differenze minime nella composizione in caso di adulterazione a basso livello, che impediscono la distinzione tra le variazioni naturali e quelle derivanti dalla presenza dell'adulterante (Bernardi et.al, 2014).

In questo contesto, si ritiene che la frazione di steroli offra la massima specificità per l'individuazione degli adulteranti e rappresenti un'"impronta" distintiva per ciascun olio vegetale, non influenzata da fattori come la selezione delle piante o l'ibridazione. Di conseguenza, viene spesso utilizzata come strumento per individuare l'eventuale adulterazione degli alimenti con oli vegetali (Bernardi et.al, 2014).

Nell'olio di girasole, il $\Delta 7$ -stigmastenolo è naturalmente presente in media al 15% del totale degli steroli, mentre nella pasta di pistacchio varia tra lo 0,2% e lo 0,8% del totale degli steroli, indipendentemente dalla provenienza delle sementi, dal grado di tostatura o dal processo di raffinazione. Di conseguenza, l'aumento della quantità di $\Delta 7$ -stigmastenolo nella pasta di pistacchio è proporzionale all'adulterazione, solitamente in concentrazioni maggiori al 2% possiamo affermare con ragionevole certezza l'adulterazione; ed infatti, il cambiamento nella composizione previsto dello sterolo, in linea con la composizione dello sterolo del girasole, conferma l'adulterazione: nei campioni adulterati si nota una diminuzione del β -sitosterolo, uno sterolo presente in elevate percentuali nei campioni di pasta di pistacchio non adulterata, ed un aumento del contenuto di tre steroli: $\Delta 7$ -avenasterolo, $\Delta 7$ -campesterolo e $\Delta 7$ -stigmastenolo, presenti in percentuale maggiore nell'olio di girasole (Berardi et. al, 2014).

Gli intervalli tipici per ogni sterolo in pasta di pistacchio non adulterata e girasole adulterata sono forniti nella figura 27.

	Stigmasterol	$\Delta 7$ -campesterol	β -sitosterol	$\Delta 7$ -stigmastenol	$\Delta 7$ -avenasterol
Unadulterated pistachio paste	0.6–1.3%	0.01–0.03%	82–86%	0.2–0.8%	0.3–0.5%
Sunflower adulterated pistachio paste	1.4–2.2%	0.2–0.3%	78–81%	2.6–3.8	0.9–1.3%

Figura 27. Composizione, in percentuale, del contenuto di differenti steroli in pasta di pistacchio non adulterata (sopra) ed adulterata (sotto) (Bernardi et.al, 2014)

Negli ultimi anni, il NIR è stato ampiamente adottato con successo per sostituire i metodi analitici tradizionali che richiedono tempo e risorse per l'analisi di vari componenti alimentari, come ad esempio le proteine nella farina, le antocianine nel vino e i polifenoli nelle verdure. Bernardi e colleghi propongono un'alternativa più rapida ed economica al metodo AOCS (che prevede l'utilizzo del gascromatografo) per identificare l'adulterazione della pasta di pistacchio con olio di girasole, basata sulla relazione tra il contenuto di $\Delta 7$ -stigmastenolo nella frazione totale di steroli e gli spettri NIR.

La calibrazione NIR per prevedere il contenuto di $\Delta 7$ -stigmastenolo nella pasta di pistacchio adulterata è stata sviluppata utilizzando 62 campioni scansionati due volte; un terzo del set di campioni è stato tenuto fuori per la convalida. L'analisi chemiometrica è stata condotta mediante il software NIRCal 5.5 (Büchi Labortechnik AG, Svizzera).

I campioni di convalida sono stati predetti con un errore standard di predizione (SEP) pari allo 0,23% del contenuto totale di steroli, un RPD (Ratio of Performance to Deviation) di 5,0, che indica

una buona affidabilità del modello ed un coefficiente di correlazione pari a 0,98 che indica quindi un'eccellente correlazione tra i dati analizzati.

È stata utilizzata una regressione PLS per stabilire la correlazione tra gli spettri NIR e il contenuto di $\Delta 7$ -stigmastenolo nella frazione totale di steroli e, come determinato attraverso i metodi ufficiali, sia l'errore standard di predizione (SEP) che il rapporto tra prestazione e deviazione (RPD) indicano un buon rendimento del modello, permettendo di monitorare il contenuto di $\Delta 7$ -stigmastenolo. Considerando la rapida acquisizione dei dati e il breve tempo totale di analisi, questi risultati suggeriscono il potenziale del NIR come metodo di screening rapido e standard in questo contesto industriale, giustificando ulteriori sviluppi in questo settore.

4.8 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA RAMAN PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DI PISTACCHIO MACINATO

La strada verso la spettroscopia Raman inizia nel 1923, quando Adolf Smekal teorizzò che la luce poteva essere diffusa in modo anelastico. Cinque anni dopo, uno scienziato indiano, C.V. Raman stava studiando come la luce viaggia attraverso diversi liquidi ed è stato in grado di osservare la diffusione anelastica precedentemente prevista da Smekal; questa scoperta valse a Raman il premio Nobel nel 1930. Nonostante questi primi sviluppi, l'effetto Raman non fu utilizzato sperimentalmente per diversi decenni, ciò era in gran parte dovuto alla sorgente luminosa utilizzata all'epoca: una lampada al mercurio filtrata per creare un fascio monocromatico. Il raggio risultante era molto debole, il che significava che gli esperimenti richiedevano ore, a volte giorni per essere condotti.

Fu solo negli anni '60, con la scoperta del laser, che questo problema fu superato grazie alla capacità del laser fornire una potente sorgente di luce monocromatica, aprendo così la strada alla spettrometria Raman permettendole di diventare una tecnica analitica tradizionale (Bruker).

La spettroscopia Raman si basa sull'interazione della luce con i legami chimici di una sostanza, fornendo informazioni dettagliate sulla struttura chimica. Uno spettro Raman è come un'“impronta digitale” chimica che identifica chiaramente una molecola o un materiale e, proprio come un'impronta digitale umana, può essere confrontata con le biblioteche di riferimento per distinguerla dagli altri. Tali librerie spettrali Raman contengono spesso centinaia di spettri con cui viene confrontato lo spettro di un campione per determinare l'analita (Bruker).

Quando la luce viene diffusa da un campione ci sono due possibili risultati: la diffusione elastica, nota anche come diffusione di Rayleigh, che si verifica quando la luce diffusa ha la stessa energia della luce che inizialmente ha colpito il campione e la diffusione anelastica, o diffusione Raman, che si verifica quando la luce diffusa ha un'energia diversa rispetto alla luce che inizialmente ha colpito il campione.

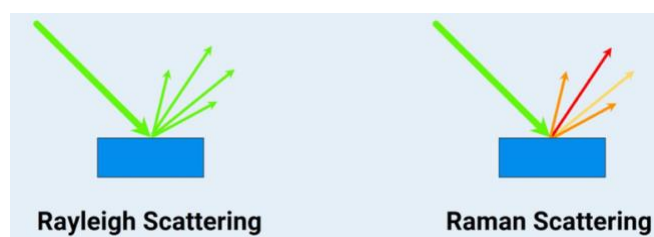


Figura 28. Differenza tra diffusione elastica (a sinistra) e diffusione anelastica (a destra) (Bruker)

Se una molecola viene illuminata dalla luce essa può assorbire parte di quella luce per eccitare una vibrazione molecolare. Se ciò accade, la luce che si disperde dalla molecola tornerà con una frequenza e un colore diversi poiché parte di essa è stata assorbita dalla molecola. Questo fenomeno è chiamato effetto Raman ed è la causa dell'omonima diffusione Raman.

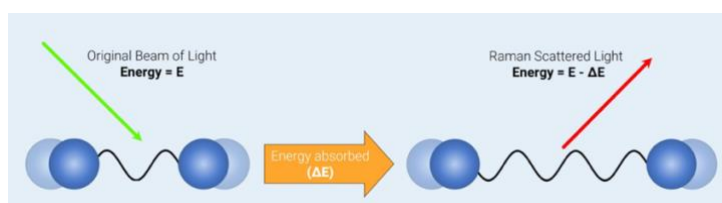


Figura 29. (A sinistra) Applicazione di una sorgente luminosa al campione. (A destra) emissione da parte del campione di una sorgente luminosa con minor energia (Bruker)

Poiché le frequenze della luce assorbita quando una molecola viene illuminata sono uniche per la molecola e per il tipo di legami, il rilevamento di tali frequenze ci consentirà di capire quali molecole sono presenti nel campione.

Utilizzando un laser monocromatico possiamo facilmente determinare la frequenza del raggio di luce originale, poiché i laser emettono luce che ha la stessa lunghezza d'onda e frequenza. La scelta tipica è un laser verde (532 nm) ed una volta applicata la sorgente luminosa, la luce diffusa Raman viene raccolta da un rivelatore che ne determina la frequenza e ci fornisce tutte le informazioni di cui abbiamo bisogno.

Conoscendo gli spostamenti Raman, possiamo tracciare tali informazioni per creare lo spettro: ciascun picco dello spettro corrisponde ad una diversa frequenza della luce assorbita dal campione che ha eccitato un legame. Poiché queste frequenze sono uniche per la molecola e per i tipi di legami che contiene, gli spettri Raman creano una “impronta digitale chimica” che ci consente di identificare e quantificare un'ampia varietà di sostanze.

Ad esempio, sappiamo che l'ossigeno vibra a circa 1550 cm^{-1} mentre l'azoto vibra a 2330 cm^{-1} , se illuminiamo questi gas con il nostro laser verde, i gas assorbiranno quelle frequenze di luce che vedremo negli spettri Raman: ci sarà un picco per l'ossigeno intorno a 1550 cm^{-1} e un picco per l'azoto intorno a 2330 cm^{-1} . Ciò significa che la spettroscopia Raman sarebbe in grado di distinguere facilmente queste due molecole, anche se sono entrambi gas incolori.

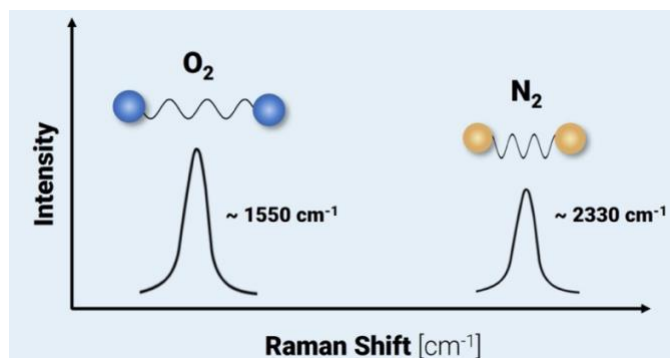


Figura 30. Esempio di uno spettro di assorbimento dell'ossigeno e dell'azoto (Bruker)

Naturalmente, non tutti i campioni sono semplici come l'ossigeno o l'azoto, molte molecole sono piuttosto complesse e contengono diversi legami chimici con vibrazioni molecolari differenti. Pertanto, lo spettro Raman per la maggior parte delle molecole conterrà molti picchi (Bruker)

La tecnologia Raman è stata utilizzata in diverse applicazioni come la distribuzione di formulazioni farmaceutiche, il rilevamento di singole molecole, batteri o cellule, analisi forensi e applicazioni alimentari; fornisce informazioni dettagliate sui campioni e consente un'analisi qualitativa e quantitativa delle diverse componenti. La combinazione della spettroscopia Raman con diversi metodi multivariati consente ai ricercatori di identificare con una maggiore precisione le contaminazioni fisiche, chimiche (ad esempio, melamina, pesticidi), microbiche (ad esempio, batteriche o fungine), la rilevazione di adulteranti e difetti negli alimenti.

Per quanto a conoscenza di Kocak, nel 2016, non era ancora disponibile uno studio per la rilevazione dell'adulterazione da pisello verde nelle miscele di pistacchio utilizzando il metodo Raman; pertanto, il loro obiettivo è stato quello di investigare e rilevare il contenuto di piselli verdi nei granuli di pistacchio grezzi utilizzando la tecnica FT-Raman. A tal fine, sono state analizzate e categorizzate sei diverse concentrazioni di granuli di piselli verdi in miscele di pistacchio: 0%, quindi pistacchio puro, 20%, 40%, 60%, 80% e 100% di presenza di pisello verde. Per analizzare i dati sono stati utilizzati sia l'analisi delle componenti principali (PCA) che la regressione parziale dei minimi quadrati (PLSR) (Kocak et. al, 2016).

Nello studio di Kocak e colleghi sono state utilizzate dieci diverse specie di pistacchi crudi (*Pistacia vera L.*) e piselli congelati (*Pisum sativum L.*), sia i pistacchi che i piselli sono stati acquistati da mercati locali in diverse regioni della Turchia. I campioni di piselli sono stati essiccati in forno a 70 °C per 12 ore al fine di abbassare il contenuto di umidità, successivamente sono stati miscelati ai pistacchi a percentuali diverse: 20, 40, 60 e 80 % (peso: peso). Prima sono stati

analizzati i campioni di pistacchio e piselli puri singolarmente, poi quelli adulterati, vedremo prima quelli analizzati singolarmente.

Gli spettri Raman dei granuli di pistacchio puro e del pisello verde sono stati ottenuti nell'intervallo tra 3700 e 200 cm^{-1} con l'applicazione di una sorgente laser e le bande spettrali sono chiaramente mostrate in figura 30a: i campioni puri differiscono in maniera ben definita l'uno dall'altro, queste differenze derivavano dai diversi contenuti di lipidi e proteine.

Le assegnazioni dei valori delle bande sono state identificate grazie alla letteratura: la banda situata a 3006 cm^{-1} è stata assegnata alla vibrazione di allungamento simmetrica dei gruppi $=\text{CH}$, la regione tra 3100 e 2800 cm^{-1} indica le vibrazioni di allungamento dei gruppi di metilici (CH_3) e metilenici (CH_2) delle molecole alifatiche, il picco debole a 1746 cm^{-1} è stato correlato alla vibrazione di allungamento del gruppo carbonilico ($\text{C}=\text{O}$) degli esteri dei pistacchi; infine, è stata osservata una banda distintiva a 1655 cm^{-1} , che è stata assegnata alle vibrazioni di allungamento degli alcheni nei granuli di pistacchio.

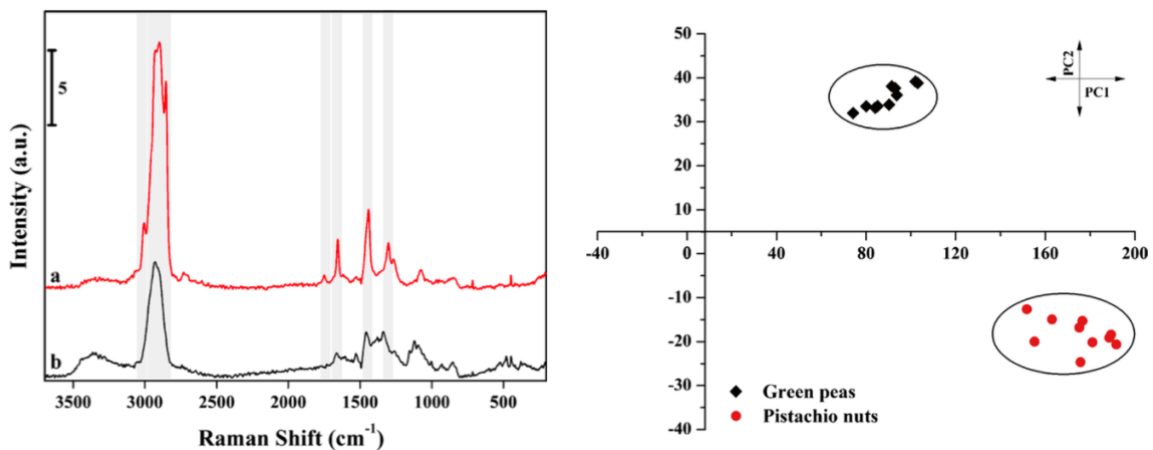


Figura 31a e 31b. A: Spettro Raman di piselli e pistacchi puri B: PCA plot, comprendente l'intero spettro Raman, utilizzato per la discriminazione di pistacchi e piselli puri (Kocak et. al, 2016).

Sono state utilizzate due componenti principali per visualizzare il raggruppamento dei campioni: la componente principale 1 (PC1) ha spiegato il 95,79 % della varianza totale, la componente principale 2 (PC2) ha spiegato il 3,99 % della varianza totale. Il grafico del punteggio PCA rivela che c'era una grande distanza tra campioni di pistacchio e piselli verdi, evidenziando quindi con successo la separazione tra i due campioni.

I campioni di pistacchio sono stati miscelati con il pisello verde e successivamente, per ottenere una massa omogenea, sono stati compressi a bassa pressione. Questa procedura è stata applicata per ottenere una superficie del campione piatta al fine di avere una messa a fuoco accurata durante l'analisi.

Uno dei principali vantaggi della mappatura Raman è la sua capacità di visualizzare la distribuzione delle componenti nei campioni, fornendo informazioni sia sui dati sia spaziali che spettrali. Le figure 32a e 32b mostrano le mappe di distribuzione dei campioni adulterati con diverse concentrazioni di pisello verde, queste mappe riescono a dimostrare i cambiamenti nei valori di intensità Raman rispetto alla lunghezza d'onda specificata in ogni punto del campione.

Sulla base degli spettri dei campioni puri, sono state selezionate le bande a 1655 e 1441 cm^{-1} per monitorare i livelli di adulterazione.

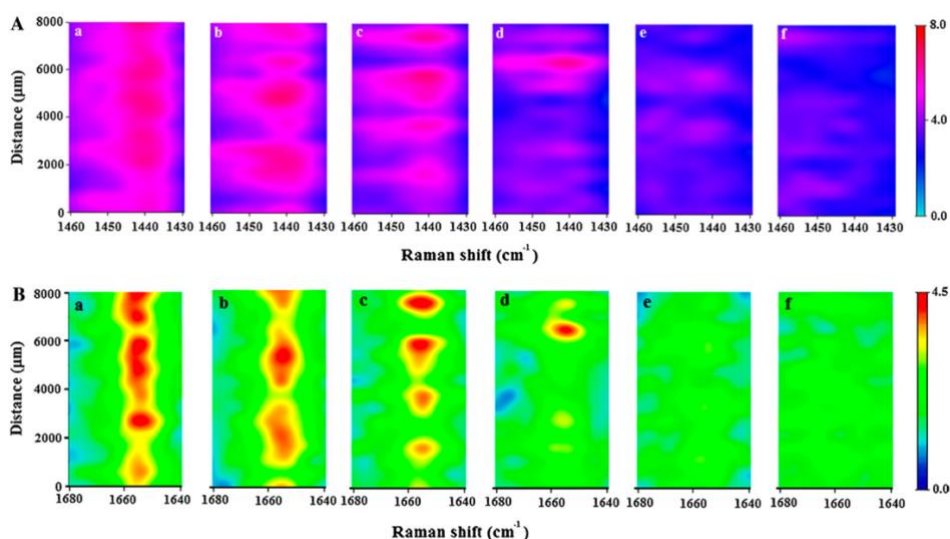


Figura 32 A. A sinistra ci sono i campioni puri di pistacchio, la sezione A indica la banda a 1460-1430 cm^{-1} e la sezione B indica la banda a 1680-1640 cm^{-1} . Andando verso destra la concentrazione di adulterante diventa via via maggiore. L'immagine "f" rappresenta il pisello verde puro (Kocak et. al, 2016).

Si può vedere sia in Fig. 32-A che 32-B che le regioni rosa e rosse, ricche di pistacchio, sono diminuite in seguito all'aumento delle concentrazioni di piselli; ciò indica che il rapporto di adulterazione più elevato riduce l'intensità delle bande, in particolare quella a 1655 cm^{-1} , assegnata allo stretching vibrazionale degli acidi grassi. (Kocak et. al, 2016).

Il livello di adulterazione nei granuli di pistacchio è stato determinato utilizzando un modello di regressione PLSR: la quantità di adulterante è stata prevista con un valore di coefficiente di determinazione (R^2) di 0,99, mentre il valore di previsione dell'errore quadratico medio della

previsione (RMSEP) è stato di 0,048; l'alto valore dell' R^2 e il basso valore dell'RMSEP dimostrano che il modello è adatto per il rilevamento dell'adulterazione del pisello verde.

La combinazione di spettri Raman, analisi PCA e PLSR si sono dimostrate tecniche efficaci nel predire e visualizzare l'adulterazione dei semi di pistacchio macinati con piselli verdi; inoltre, i risultati hanno confermato la validità del modello sviluppato per la predizione dell'adulterazione, dimostrando la potenziale utilità di questa tecnica nel contesto dell'analisi alimentare. (Kocak et al, 2016).

In conclusione, questa metodologia potrebbe essere di grande interesse per gli operatori del settore alimentare e per i ricercatori impegnati nello sviluppo di metodi di analisi rapidi e non distruttivi nell'ambito del controllo qualità e della sicurezza alimentare.

Ulteriori studi, non riportati in questo elaborato, dimostrano l'efficacia di metodi analitici per la determinazione di frodi nella filiera del pistacchio, ad esempio:

-Khanban et al. nel 2022 hanno sviluppato un metodo per rilevare oli commestibili aggiunti fraudolentemente nelle creme di pistacchio, utilizzando la spettroscopia FT-IR.

-Temizkan et al. nel 2020 hanno lavorato sullo sviluppo di un metodo che sfrutta la spettroscopia del vicino e del medio infrarosso per individuare l'aggiunta fraudolenta di pisello verde nella granella di pistacchio

-Ali Sheibani e colleghi, nel 2014, hanno pubblicato sull'Oriental Journal of Chemistry un paper in cui utilizzavano la spettroscopia FT-IT per l'identificazione dell'adulterazione dell'olio di pistacchio con oli di mais, girasole e soia.

5. LA NOCCIOLA

5.1 GENERALITA' SULLA NOCCIOLA

Al giorno d'oggi la nocciola è una delle tipologie di frutta a guscio più coltivate e consumate al mondo: vengono mangiate tostate o, più frequentemente, lavorate dall'industria alimentare e trasformate per essere aggiunte in altre preparazioni a base di cioccolato, nelle torte, nei biscotti, ecc. Il famoso cioccolato tradizionale “Gianduia” è attribuito ai pasticceri di Torino, che mescolando parte del cacao con la nocciola hanno creato questo tipo di cioccolato. Una delle più importanti industrie dolciarie del mondo, la società Ferrero, ha impostato gran parte della sua produzione sull'uso del cioccolato alla nocciola sotto i marchi di Ferrero e Kinder: il suo “bestseller”, Nutella, è appunto una crema al cioccolato e nocciola (una variazione del cioccolato "Gianduia") (Allegrini, 2022).

Tra le piante appartenenti alla famiglia delle Betulaceae, il nocciolo, è un albero che già 10.000 anni fa era presente nell'area mediterranea dove si è diffuso spontaneamente, trovando il proprio habitat naturale; successivamente l'uomo ha iniziato a coltivarlo e a selezionarne le specie più adatte, poi, con l'inizio del 1900, iniziarono a svilupparsi le prime produzioni intensive sia in Europa che in Nord America (principalmente in Oregon) portando a selezionare la specie con la resa più alta: *Corylus avellana*.

Il nocciolo può crescere fino a 6 m di altezza, ha un aspetto cespuglioso a causa dei numerosi polloni che escono dalla ceppaia, ha un tronco che presenta una corteccia liscia e compatta, di colore bianco-rossastro e senza variazioni intense di colore; presenta foglie decidue, con margine seghettato e che arrivano fino a 10 cm di larghezza (figura 33B). I fiori si formano in estate e raggiungono la completa fioritura in inverno (figura 33 C e D). Le nocciole crescono solo a grappoli da 2 a 4 e sono protette da brattee verdi che ricoprono il frutto fino all'estremità che raggiungono la caratteristica colorazione bruna una volta raggiunta la maturazione (Nutsbook, 2019).

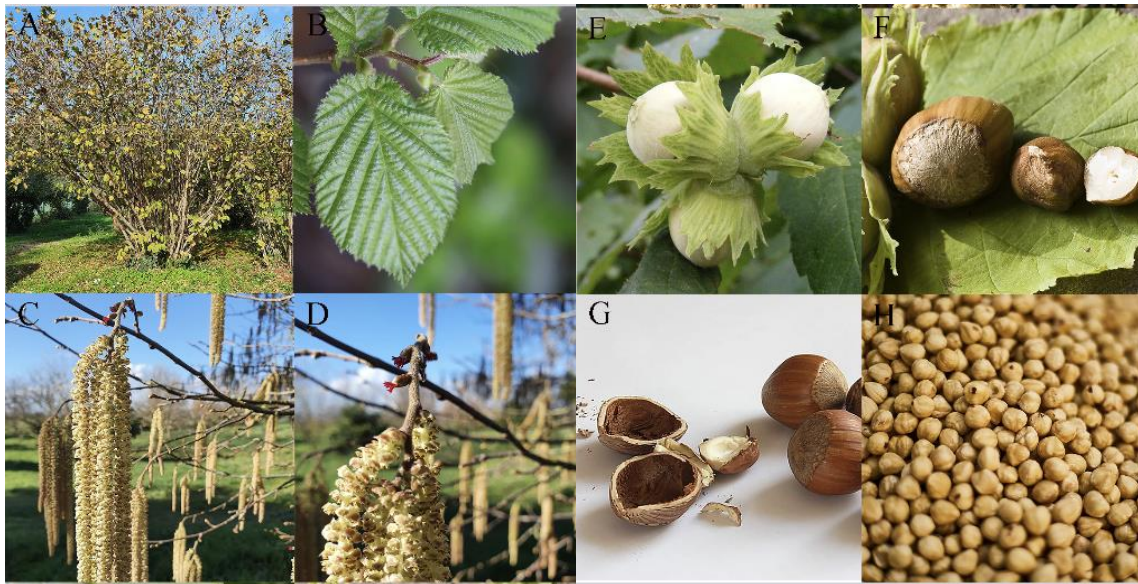


Figura 33. La nocciola e le sue parti principali: (A) Il nocciolo. (B) Le foglie. (C) Infiorescenze maschili non mature. (D) Fiori femminili. (E) Nocciole con pericarpo non maturo. (F) Nocciole con pericarpo maturo. (G) Nocciole con e senza pericarpo. (H) Nocciola senza pericarpo e buccia. (Allegrini et al., 2022.)

Il nocciolo richiede temperature medie annuali comprese tra i 12° e i 16 °C e non cresce bene in terreni argillosi: predilige terreni permeabili, fertili, con un pH del terreno compreso tra 5,5 e 7,8 e con una percentuale di calcare attivo non superiore al 7/8 %; infatti i terreni vulcanici come quelli ai piedi dell'Etna sono destinati a questa tipologia di coltura. Inoltre, il nocciolo ha un apparato radicale che si estende fino a 60 cm nel sottosuolo, ciò comporta un discreto e costante apporto d'acqua.

Le nocciole sono caratterizzate da diverse proprietà nutritive che le rendono un alimento utile per la salute e prezioso dal punto di vista nutrizionale: sono ricche di aminoacidi essenziali, fibre alimentari, vitamine, minerali e acidi grassi insaturi, che svolgono un ruolo preventivo chiave di molte malattie. Per quanto riguarda la frazione lipidica possiamo dire che costituiscono oltre il 60% del peso secco della nocciola e che tra gli acidi grassi quello maggiormente presente è l'acido oleico con l'82,8% del totale degli acidi grassi, seguito dal linoleico, palmitico e stearico. Un alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi rende l'olio di nocciola molto simile all'olio d'oliva, rendendolo uno dei “protagonisti” nell’adulterazione dell'olio d'oliva, infatti, sta diventando una procedura sempre più comune, ed abbastanza difficile da rilevare a causa del profilo chimico molto simile degli oli; anche se l'olio di nocciole non costituisce un rischio per la salute, come accade con gli oli di bassa qualità utilizzati per le adulterazioni, questa questione rappresenta un problema serio sia per i produttori d'olio d'oliva che per i consumatori (Allegrini et. al, 2022).

5.2 PROCESSO PRODUTTIVO: RACCOLTA E LAVORAZIONE

La raccolta delle nocciole inizia nella seconda metà di agosto, quando il frutto giunge a piena maturazione. Per non prolungare troppo la permanenza dei frutti sul terreno umido, dato che hanno capacità di assorbire velocemente l'acqua, viene fatta il prima possibile l'andatura meccanica con macchine trainate con dispositivi di raccolta laterale per minimizzare il più possibile la quantità di nocciole cadute. Le tappe fondamentali del processo di produzione della nocciola, comuni sia alle nocciole in guscio che a quelle sgusciate sono:

Cernita e lavaggio

Le nocciole, una volta raccolte, vengono inserite in una vasca di lavaggio con acqua in continua agitazione dove i corpi estranei come terra e sassi cadono sul fondo e le nocciole, galleggiando, vengono recuperate da uno scivolo grigliato che permette ad un secondo getto d'acqua di lavarle ulteriormente (NutsBook, 2019).

Essiccazione

Di norma la frutta a guscio viene raccolta con un'umidità intorno al 20%: per abbassare il tasso di umidità ed avvicinarlo a quello commerciale del 6% si provvede all'essiccazione in modo naturale o forzato. L'essiccazione naturale avviene su pavimentazione in cemento o graticci, dove le nocciole vengono esposte al sole; l'operazione richiede molto più tempo dell'essiccazione forzata. Oggi molte aziende si sono dotate di essiccatori che lavorano ad aria calda (45 °C), con movimento continuo del prodotto, sia nella fase di riscaldamento che di raffreddamento, tale operazione dura dalle 10 alle 20 ore a seconda dell'umidità di partenza delle nocciole (NutsBook, 2019).

Prima conservazione

Dopo l'essiccazione le nocciole vengono immesse in magazzini per lo stoccaggio. È importante che in questi locali l'umidità sia contenuta a bassi livelli e, nel caso in cui le nocciole debbano subire la sgusciatura, il processo continua.

Calibratura e sgusciatura

La calibratura è un'operazione eseguita utilizzando dei vagli oscillanti con fori da 14 a 20 mm che permettono non solo di eliminare le nocciole più piccole o più grandi di tali dimensioni, ma di fare anche da filtro per eventuali corpi estranei non eliminati nelle fasi precedenti (tali misure fanno riferimento allo standard UNECE DDP-10 (United Nations Economic Commission for Europe; Dry and Dried Produce, revisione del 2010)).

La sgusciatura si esegue con due cilindri di cui uno fisso a superficie convessa e l'altro mobile con la parte inferiore concava, di pietra dura o di altro materiale, che operano a una distanza di poco inferiore al calibro delle nocciole e ne provocano la rottura del guscio.

Vengono successivamente tolti i semi neri, raggrinziti, marci o intaccati da insetti e in qualche modo alterati (NutsBook, 2019).

Tostatura e seconda conservazione

Consiste in un trattamento termico a 115 °C per 30 minuti delle nocciole che permette loro di acquistare i sapori e gli aromi tipici.

La conservazione della nocciola sgusciata e tostata, presso i grandi magazzini di lavorazione, è effettuata in sacchi da una tonnellata ciascuno in celle refrigerate con temperature di 4-6 °C e umidità relativa del 55 o 60% (NutsBook, 2019).

Numerosi sono anche gli impieghi di prodotti derivanti dalla lavorazione delle nocciole: la granella viene prodotta sia da nocciole sgusciate che da nocciole tostate di calibri inferiori ai 14 mm, le nocciole “a fette” prodotte tagliando le nocciole sgusciate, la farina di nocciole ottenuta dalla macinatura delle nocciole sgusciate o tostate, l'olio utilizzato come condimento... (NutsBook, 2019).

5.3 IL MERCATO DELLA NOCCIOLA

Nel 2022/23, il raccolto globale di nocciole ammontava a 585.150 tonnellate (di sole nocciole sgusciate), la cifra più alta dell'ultimo decennio e, con un raccolto di 415.300 tonnellate e il 71% della produzione globale, la Turchia si è distinta di gran lunga come il principale paese produttore. Dopo un anno negativo nel 2021/22, l'Italia è tornata ai livelli di produzione medi nel 2022/23 con un raccolto totale di 38.700 tonnellate e recuperando il suo status di secondo produttore più grande del mondo. Le colture statunitensi e cilene sono aumentate in modo significativo nell'ultimo decennio, raggiungendo ancora una volta nuovi massimi, si prevede che la produzione di nocciole aumenterà progressivamente nella maggior parte dei principali paesi produttori (Nuts and Dried fruit statistical yearbook, 2023).

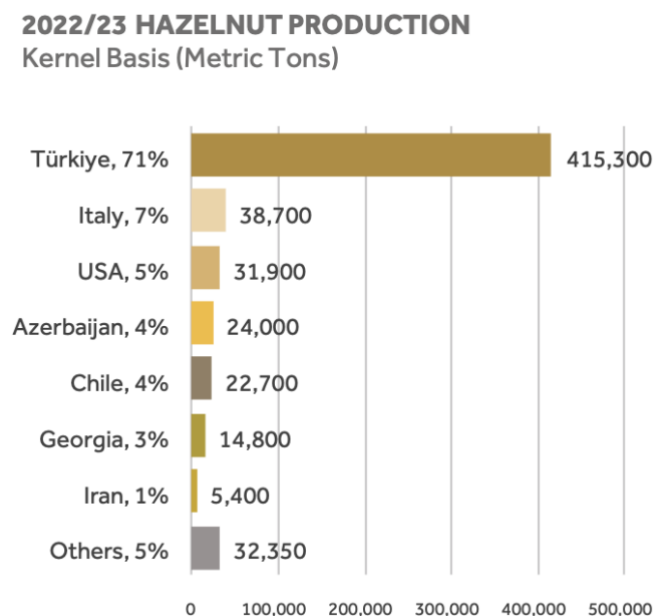


Figura 34. Produzione di nocciole nel 2022/23 (INC,2022/23)

Le esportazioni globali di nocciole hanno totalizzato 455.463 tonnellate nel 2021, con la Turchia che ha continuato a guidare il mondo nelle esportazioni con il 75% della quota. L'Unione europea e il Regno Unito hanno rappresentato il 76% delle esportazioni della Turchia, guidate rispettivamente da Germania e Italia con il 24% e il 23%.

L'Italia non è solo il secondo produttore mondiale di nocciole e il principale produttore europeo, ma ha anche visto un aumento delle esportazioni di nocciole negli anni, insieme ad altri paesi come il Cile, gli Stati Uniti, l'Azerbaijan e la Georgia, a differenza della Turchia. La Germania è il principale importatore di nocciole italiane, seguita da Francia, Belgio, Polonia e Spagna. Sebbene

la Turchia venda volumi di nocciole molto maggiori rispetto all'Italia, la qualità delle nocciole italiane è più apprezzata e meglio retribuita dagli importatori europei.; tuttavia, questa alta qualità è minacciata da agenti patogeni e da pratiche fraudolente (Allegrini et. al, 2022).

Per quanto riguarda i consumi: le mandorle e le noci sono state le noci più consumate nel 2021, rappresentando rispettivamente il 31% e il 21% della quota mondiale. Anacardi, pistacchi e nocciole si sono classificati al secondo, terzo e quarto posto, rappresentando rispettivamente il 19%, il 15% e l'11% del consumo. L'Asia è stata la regione più consumata (32%), seguita dall'Europa (31%) e dal Nord America (20%). Il consumo in Medio Oriente ammontava a circa il 12% del totale globale.

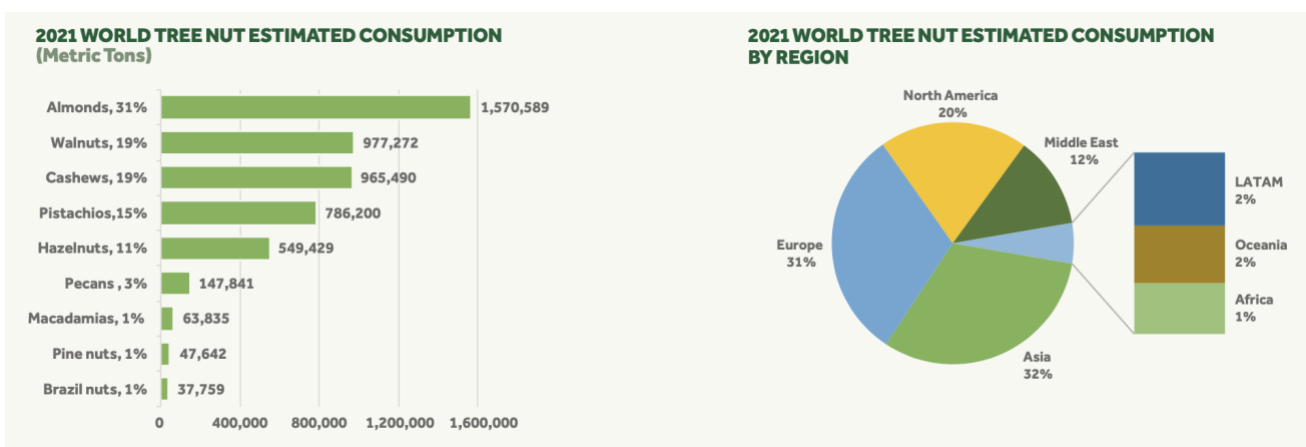


Figura 35. consumo stimato di alberi per la produzione di frutta a guscio (INC, 2022/23)

Negli ultimi anni in Italia, l'esportazione ha mostrato una tendenza al rialzo (con un aumento di 116 milioni di dollari americani tra il 2020 e il 2021), mentre l'importazione è diminuita (-27,1 milioni di dollari americani). Questo indica che la produzione interna sta sempre più soddisfacendo la fiorente industria agroalimentare e dolciaria nazionale. I produttori italiani di questo settore hanno ottenuto eccellenti risultati di mercato e hanno mostrato una chiara preferenza per le materie prime italiane negli ultimi anni.

Secondo l'analisi degli indicatori di complessità economica, l'Italia dovrebbe avere ottime opportunità di incrementare le esportazioni nei prossimi anni, con buone prospettive di crescita economica e profitti, oltre a buone performance sociali e ambientali a livello mondiale (AgroNotizie, Duccio Caccioni, 2023).

6. METODI ANALITICI PER DETERMINARE LE PRINCIPALI FRODI NEL MERCATO DELLA NOCCIOLA:

Le frodi nella filiera delle nocciole rappresentano un problema significativo che, similmente a quanto osservato per il pistacchio, minaccia non solo l'integrità del mercato ma anche la sicurezza dei consumatori. La filiera delle nocciole, che include la coltivazione, la raccolta, la trasformazione e la distribuzione, è vulnerabile a vari tipi di frode e queste possono comprendere: l'adulterazione della materia prima o dei prodotti derivati, la sostituzione delle nocciole di alta qualità con varietà inferiori, la falsificazione dell'origine geografica e l'etichettatura ingannevole. Tali pratiche fraudolente non solo compromettono la qualità del prodotto finale, ma possono anche avere gravi ripercussioni economiche per i produttori onesti; per contrastarle è necessaria una stretta collaborazione tra produttori, enti regolatori e tecnologie avanzate di tracciabilità, per garantire la trasparenza e l'affidabilità lungo tutta la filiera.

In questo capitolo esamineremo alcune tecniche analitiche utilizzate per individuare alcune pratiche fraudolente.

6.1 UTILIZZO DELLA GAS CROMATOGRAFIA PER L'IDENTIFICAZIONE DI UN MARKER SPECIFICO NELLE CREME A BASE DI NOCCIOLA

Le creme a base di nocciola vengono realizzate utilizzando un semilavorato chiamato “pasta di nocciole”, un prodotto semisolido formato da particelle di nocciole di dimensioni comprese tra 7 e 45 μm disperse nell'olio di nocciola. Questo ingrediente è fondamentale nella produzione di prodotti da forno, glasse, ripieni e gelati, poiché contribuisce positivamente alle caratteristiche organolettiche e tecnologiche del prodotto finito, abbassando il punto di fusione della miscela per una sensazione più cremosa in bocca. Inoltre, è una fonte eccellente di acidi grassi insaturi, proteine, fibre e composti fenolici antiossidanti (Bonvehi & Coll, 2009).

Le ricette delle creme spalmabili di nocciole variano da paese a paese e, oltre a una certa quantità di pasta di nocciole, includono zuccheri, oli vegetali e aromi artificiali; le preferenze dei consumatori si basano sul contenuto e sulla composizione delle nocciole utilizzate nella loro produzione.

Il punto di riferimento per le creme spalmabili di nocciole è la Nutella, diventata sinonimo di crema spalmabile di nocciole e cioccolato in tutto il mondo. Prodotti simili di altri marchi contengono dal 10% al 20% di nocciole; tuttavia, esistono anche creme spalmabili di nocciole con un contenuto

dichiarato di nocciole di circa il 2%, così come "creme con sapore di nocciola" che contengono solo aromi artificiali di nocciole o un contenuto molto basso di nocciole che varia dallo 0,1% al 2%. I metodi per analizzare il contenuto di nocciole possono essere suddivisi in base allo scopo: rilevare la presenza di allergeni, valutare l'autenticità del prodotto o determinare l'aggiunta non consentita di olio di nocciola nell'olio d'oliva, poiché hanno una composizione di acidi grassi simile (Cizkova et al., 2013).

Una frode piuttosto comune consiste nel formulare una crema spalmabile alla nocciola con un basso contenuto di materia prima e dichiarare in etichetta una percentuale maggiore, con il solo scopo di attirare più clienti ed avere un maggior ritorno economico, ingannando di fatto il consumatore; questa tipologia di frode può essere fatta sia aggiungendo meno pasta di nocciole di quanto dichiarato, sia diluendo la crema spalmabile con degli oli vegetali a minor costo (Cizkova et al., 2013).

Per determinare la tipologia di olio vegetale si utilizzano comunemente tecniche analitiche che si basano sulla determinazione del profilo degli acidi grassi, dei trigliceridi, del contenuto di stigmasta-3,5-diene e dei tocoferoli, seguite dall'elaborazione statistica dei risultati (Bonvehi & Coll 2009); di recente si usano sempre di più tecniche analitiche che vanno ad identificare i composti aromatici volatili tipici; ne esistono diversi ma quelli cromatografici sono i più accurati perché riescono a distinguere nettamente i vari composti aromatici volatili (Cizkova et al., 2013).

Per quanto riguarda i composti volatili della nocciola possiamo affermare che dipendono da molti fattori, come ad esempio: dalla cultivar, dal suo grado di maturità, dalle condizioni climatiche e dalle condizioni di tostatura (nelle nocciole tostate sono stati identificati più di 70 composti aromatici); tra quelli più abbondanti abbiamo le pirazine ed il filbertone, (conosciuto anche come (e)-5-methylhept-2-en-4-one) ovvero l'odore primario delle nocciole tostate (Pfnuer et al. 1999). Tale composto, il filbertone, si trova naturalmente nelle nocciole crude, ma il suo contenuto aumenta ampiamente durante la tostatura: in un lavoro del 2009 condotto da Belitz e colleghi è stato dimostrato che il contenuto di filbertone aumentava a 180°C, in 9 minuti, da 1,4 a 660 µg/kg e in 15 minuti a 1150 µg/kg; infatti, sono stati trovati nell'olio prodotto da nocciole tostate 315 µg/kg, mentre nell'olio da nocciole non tostate ne sono stati trovati solo 10 µg/kg (Cizkova et al., 2013).

Gli obiettivi dello studio condotto da Cizkova e colleghi furono quelli di utilizzare il filbertone come composto di riferimento per valutare la percentuale di pasta di nocciole presente nelle creme spalmabili e di proporre un metodo per stimarne il contenuto nelle creme spalmabili.

Per questo studio sono stati considerati cinque campioni (contrassegnati dalle lettere: A, B, C, D ed E) di pasta di nocciole, ai quali è stato quantificato il contenuto di filbertone; i risultati sono riportati in tabella 5.

Sample	Declared content of hazelnuts (%)	Origin (area of hazelnuts cultivation)	Filbertone concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
A	100	Turkey	344
B	100	Italy	400
C	100	Italy	516
D	100	Italy	304
E	100	Turkey	584

Tabella 5. Caratteristiche dei 5 campioni di pasta di nocciole (Cizkova et al., 2009)

Per la valutazione della metodologia è stato preparato un set di 30 campioni, da questo set sono stati preparati 20 campioni con contenuto noto di pasta di nocciola (0,1, 5, 10, 13 e 28%) a base di paste A, D ed E e 10 campioni di prova con contenuti noti di pasta di nocciole (0,1, 5, 10 e 13%), a base di paste B e C; sono stati acquistati anche 7 campioni di creme spalmabili alla nocciola con contenuto di nocciola dichiarato in dei mercati locali. L'analisi delle componenti volatili è stata fatta al gas cromatografo.

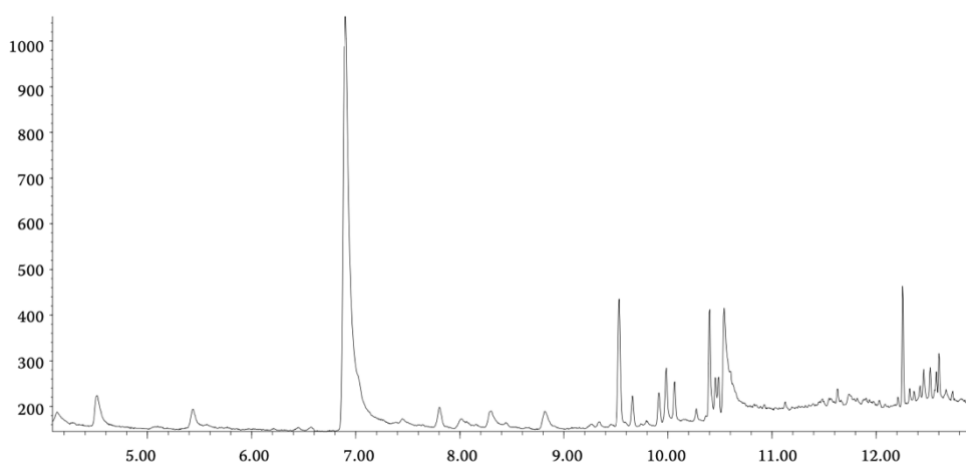


Figura 36. Cromatogramma del campione con il 10% di pasta di nocciola, a 7,1 minuti c'è il picco del filbertone (Cizkova et. al, 2013)

I cromatogrammi ottenuti potrebbero essere utili come primo screening per capire quali campioni vanno bene e quali sono sospetti o sensorialmente discutibili; un esempio di cromatogramma è quello riportato in figura 36 che rappresenta i campioni con il 10% di pasta di nocciola,

corrispondente alla concentrazione di filbertone di 34 µg/kg, il suo picco di riferimento lo possiamo notare al tempo di ritenzione di 7,1 min (Cizkova et. al, 2009).

Per produrre un modello utile alla classificazione dei prodotti in base al contenuto di pasta di nocciole è stata utilizzata la regressione lineare grazie all'utilizzo di un set di 30 campioni di creme spalmabili, con un contenuto noto di pasta di nocciola variabile dallo 0,1 al 28% ai quali è stato analizzato anche il contenuto di filbertone. La correlazione ottenuta tra il contenuto di pasta di nocciola (X, in %) e il contenuto di filbertone (Y, in µg/kg) è “ $y=4,21x$ ” che ha evidenziato un coefficiente di correlazione relativamente alto ($R^2 = 0,944$) ed un errore standard, purtroppo, non ottimale con un valore di 12,5.

I fattori che concorrono all'insufficiente robustezza di tale metodo sono due: l'uso di un singolo marcatore, il filbertone, che è naturalmente variabile in base alla qualità, all'origine e al livello di tostatura delle nocciole e l'errore del metodo analitico utilizzato che va sempre preso in considerazione. È evidente che lo sfruttamento dell'equazione di regressione per la previsione del contenuto di nocciole in campioni sconosciuti non è eccellente e presenta qualche limite; tuttavia, il modello proposto consente di ordinare le creme di nocciola in base al contenuto di filbertone.

Sono stati riconosciuti tre gruppi all'interno del set analizzato dei campioni modello: (1) prodotti privi di nocciole con contenuto di filbertone sotto il limite di rilevamento di 2 µg/kg; (2) campioni con contenuto medio di nocciole dall'1% al 10%, che corrispondono ad un contenuto di filbertone di 4-45 µg/kg e (3) campioni con un alto contenuto di nocciole, oltre il 10%, con un contenuto di filbertone superiore a 45 µg/kg. Questa classificazione ha riconosciuto correttamente tutti e 30 i campioni misurati.

La tabella 6 riporta: il contenuto di filbertone nelle creme di nocciole acquistate nei mercati locali, la percentuale di nocciola calcolata con il modello ottenuto precedentemente ed il contenuto effettivo di nocciole dichiarate in etichetta.

Sample	Filbertone ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Calculated content of hazelnuts (%)	Final sample evaluation	Declared content of hazelnuts (%)
1	59 ± 5	14	superior sample with a high content of hazelnuts	13
2	70 ± 6	17	superior sample with a high content of hazelnuts	16
3	12 ± 1	3	sample with a middle content of hazelnuts	5
4	80 ± 6	19	superior sample with a high content of hazelnuts	not declared
5	61 ± 5	14	superior sample with a high content of hazelnuts	not declared
6	below quantification limit	traces	sample with a minimal content of hazelnuts	0.01
7	below quantification limit	traces	sample with a minimal content of hazelnuts	0

Tabella 6: Contenuto di filbertone nelle creme di nocciole disponibili in commercio in relazione a quanto dichiarato in etichetta (Cizkova et. al, 2013)

Tutte le creme di nocciole analizzate, che sostenevano di contenere particolari quantità di nocciole, sono risultate autentiche ed hanno soddisfatto i requisiti legislativi dell'UE. Da notare dalla tabella 6 che nel campione n. 7 sono state trovate tracce di nocciole non dichiarate, fattore molto importante in termini di sicurezza alimentare perché rappresenta un allergene non dichiarato.

Possiamo concludere che, a causa della sua elevata variabilità, il filbertone non può essere utilizzato come unico indicatore di autenticità o per una quantificazione precisa del contenuto di nocciole; tuttavia, esso permette solamente di fare una stima del contenuto di nocciole e di valutare la qualità e l'autenticità delle creme spalmabili. Inoltre, il modello proposto non è abbastanza robusto da permettere il calcolo del contenuto di nocciole con un margine di errore adeguato, ma consente di classificare i prodotti in base al contenuto di filbertone in tre gruppi di qualità (con basso contenuto di nocciola, con medio contenuto di nocciola e con alto contenuto di nocciola). Questo approccio può essere utilizzato dalle aziende del settore alimentare per monitorare e valutare la situazione del mercato.

6.2 UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA NIR PER DETERMINARE L'ORIGINE GEOGRAFICA DELLE NOCCIOLE

Negli ultimi anni, i consumatori stanno diventando sempre più consapevoli e attenti a diverse tematiche, tra queste la salute e il benessere rappresentano motivazioni importanti che spingono all'acquisto di prodotti sani. Inoltre, l'etica e la giustizia sociale sono fattori rilevanti che hanno portato un numero crescente di consumatori a preferire prodotti fair-trade, che garantiscono condizioni di lavoro dignitose e prodotti la cui origine sia chiara: molti consumatori desiderano conoscere la provenienza dei prodotti alimentari e assicurarsi che siano stati rispettati standard etici e di sicurezza.

L'origine degli alimenti, infatti, non solo assicura la qualità, ma garantisce anche caratteristiche organolettiche e nutrizionali ben definite; una falsa dichiarazione di origine può avere ripercussioni negative sulle economie locali, regionali e nazionali. Pertanto, l'autenticazione dell'origine degli alimenti, in particolare delle materie prime, diventa cruciale per prevenire attività illegali e proteggere sia i consumatori che i produttori locali.

Le nocciole italiane rappresentano una delle eccellenze del territorio, la loro qualità è confermata dalle certificazioni DOP e IGP: in particolare, “Tonda Gentile delle Langhe” in Piemonte ha ottenuto la certificazione IGP nel 1996, così come “Tonda di Giffoni” dalla Campania, mentre “Tonda Gentile Romana” ha la certificazione DOP; purtroppo, quando dei prodotti sono conosciuti per le loro caratteristiche, e possiedono delle certificazioni rinomate, i prezzi sono maggiori rispetto alla media, rendendoli protagonisti di frodi di autenticità; infatti, l'abbondanza di nocciole turche e i prezzi più bassi delle nocciole dell'Azerbaijan e della Georgia spingono i produttori e i fornitori disonesti ad aggiungerle ai lotti di nocciole italiane, o addirittura a sostituirle. Per combattere e prevenire queste attività illegali sono state prese in considerazione diverse soluzioni analitiche, tra cui l'uso della tecnica $^1\text{H NMR}$ (Nuclear Magnetic Resonance), un metodo analitico robusto e ad alta risoluzione, e la spettroscopia nel vicino infrarosso (NIR), una tecnica rapida in grado di analizzare anche piccole quantità di campione senza la necessità di preparazioni preliminari (Sammarco et al., 2023).

Sammarco et al. nel 2023 hanno svolto un lavoro con lo scopo di sviluppare un metodo rapido ed efficace per la determinazione geografica delle nocciole crude, tostate e della pasta di nocciole, prendendo in considerazione l'FT-NIR, nella gamma spettrale $4000\text{-}10000\text{ cm}^{-1}$.

I campioni sono stati presi da diverse regioni italiane e non, considerando sia le campagne di raccolta del 2020 che del 2021; i campioni italiani includono “Tonda Gentile delle Langhe” IGP del Piemonte, “Nocciola Romana” DOP del Lazio e “Mortarella” della Campania.

Per ogni matrice, queste tre varietà sono state mescolate per avere i "campioni italiani" (N =36, 9 crudi, 9 tostati, 9 tostati pelati e 9 di pasta di nocciole); poi, considerando lo stesso numero di lotti e gli stessi fattori, sono stati suddivisi anche i campioni provenienti dalla Turchia, dall'Azerbaijan e dalla Georgia, per un totale di 144 campioni, di cui 108 non italiani.

Successivamente, per ogni tipologia di prodotto le nocciole italiane sono state mescolate casualmente con una delle non italiane, a diverse percentuali di adulterazione (10, 20, 50, 70, 90 %); i campioni crudi erano composti da nocciole italiane e georgiane, quelle tostate presentavano matrici italiane e azere, mentre le paste sono state preparate mescolando campioni italiani e turchi. Ogni campione è stato analizzato in duplicato.

Sono stati acquisiti gli spettri di 216 campioni, 144 sono stati utilizzati come set di “addestramento” del metodo per creare un modello statistico, mentre 72 campioni, misti e puri, sono stati selezionati come set di convalida per mettere alla prova il modello precedentemente costruito.

Le regioni di assorbimento più rilevanti dei campioni italiani presentavano bande di assorbimento più interessanti intorno a 750-800 nm, 1000-1100 nm, 1360 nm e 1650 nm: le bande tra 750 e 800 nm sottolineano la presenza dell'acqua infatti sono associate all'allungamento del gruppo O-H, spiegando così il contenuto di umidità, la regione tra 1000 e 1100 nm potrebbe essere collegata alla presenza dei polifenoli e la banda a 1360 nm è associata a gruppi -CH, CH₂ e -CH₃, inerenti alla componente lipidica.

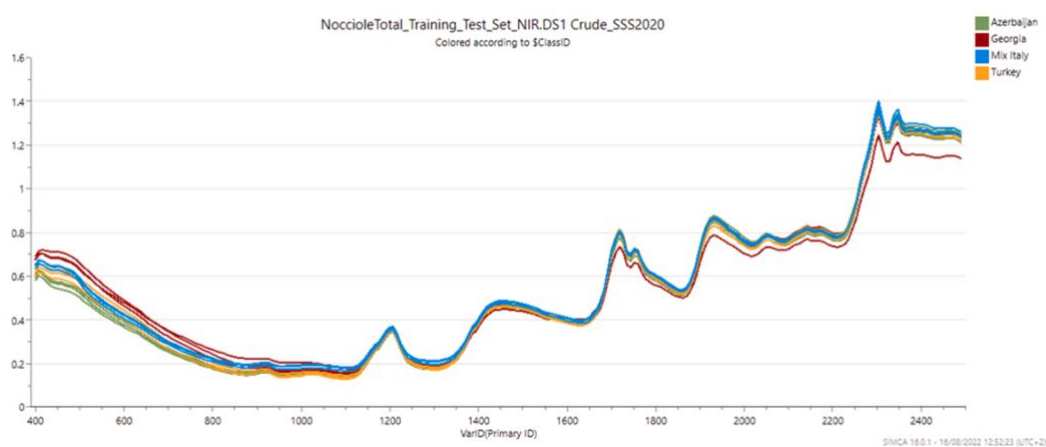


Figura 37: Spettri NIR dei campioni raccolti durante la campagna 2020. (Spettro verde: Azerbaijan, spettro rosso: Georgia, spettro turchese: Mix di campioni italiani, spettro giallo: Turchia) (Sammarco et al., 2023).

È stato costruito successivamente un modello PCA per riassumere e visualizzare i dati, considerando ogni matrice individualmente; la figura 38 mostra come la PCA abbia raggruppato i campioni: tutti i grafici dei punteggi evidenziano una chiara separazione tra campioni italiani e non italiani, ma il raggruppamento tra questi ultimi non è l'ideale, ciò potrebbe essere in dovuto in parte all'area di raccolta simile dei campioni georgiani, azerbaigiani e turchi, ma anche al numero di campioni relativi alle classi; infatti, la separazione dei campioni tostati non italiani (B) è notevolmente migliore, poiché questa matrice contiene più campioni rispetto alle altre.

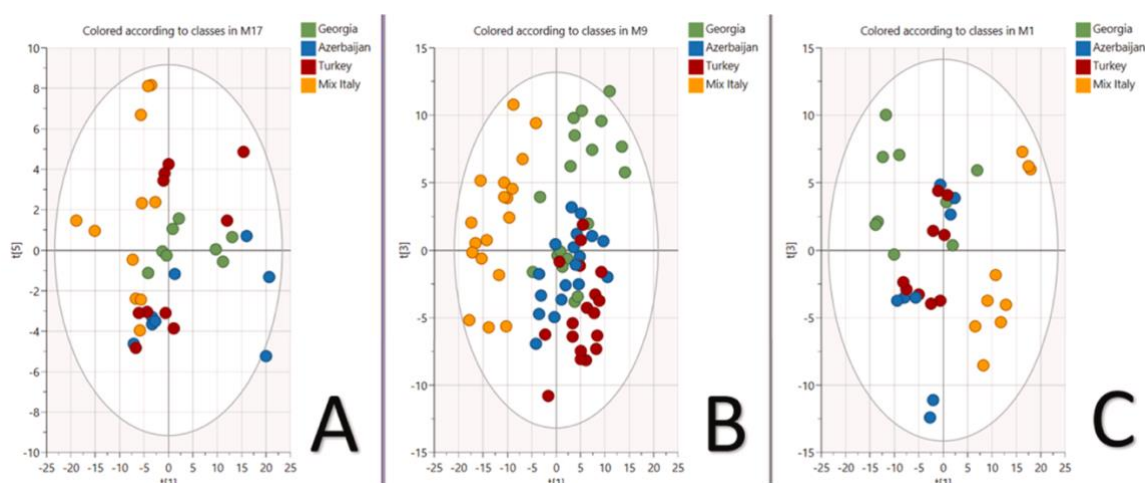


Figura 38. Modello PCA dei campioni di nocciola cruda (A), tostata (B) e della pasta di nocciola (C) (Spettro verde: Georgia, spettro rosso: Turchia, spettro turchese: Azerbaijan, spettro giallo: Mix di campioni italiani) (Sammarco et al., 2023)

Per quanto riguarda il modello PLSDA (figura 39) notiamo che nei campioni tostati c'è un'errata classificazione tra campioni azeri e turchi che ha influenzato negativamente il tasso di correttezza del modello, portandolo al 74 %; tuttavia, tutti i campioni italiani si sono ben distinti dai campioni non italiani e la matrice di confusione presentava il 100 % del punteggio di correttezza. Analizzando la figura 39-C riguardo la pasta di nocciole, notiamo una netta distinzione dei campioni italiani, con un ottimo raggruppamento tra la classe stessa ma con risultati non eccellenti di classificazione per i campioni non italiani.

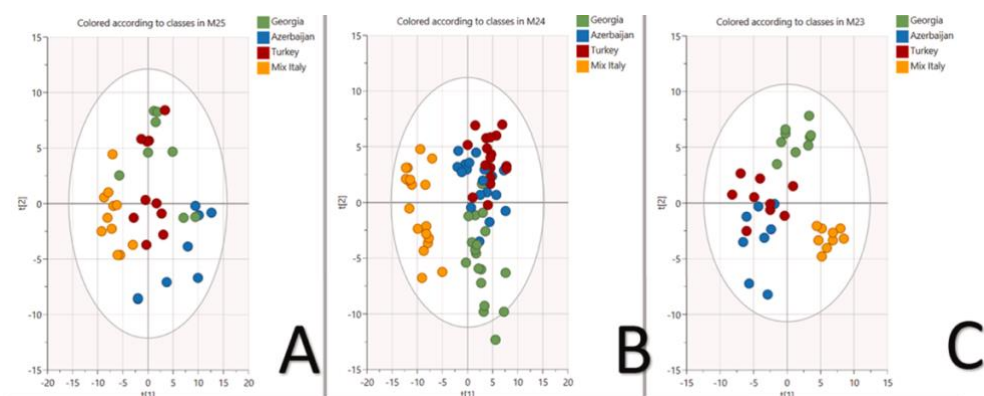


Figura 39. Modello PLS-DA dei campioni di nocciola cruda (A), tostata (B) e della pasta di nocciola (C) (Spettro verde: Georgia, spettro rosso: Turchia, spettro turchese: Azerbaijan, spettro giallo: Mix di campioni italiani) (Sammarco et al., 2023)

Per confermare la robustezza dei modelli di allenamento del metodo e la capacità predittiva della tecnica, è stato analizzato anche il set di convalida comprendente 72 campioni suddivisi tra miscele di campioni italiani con campioni non italiani in diverse percentuali e campioni puri acquistati nei mercati locali.

I risultati di questa seconda analisi hanno permesso di classificare correttamente i campioni puri (ad eccezione di un campione georgiano classificato “al confine” tra le classi georgiane e turche) e di “scoprire” dei campioni potenzialmente adulterati di pasta di nocciola: dopo l’indicazione del potenziale rischio di frode, i campioni appartenenti ai marchi n.1 (nocciole fresche) e n.4 (pasta di nocciole) sono stati sottoposti ad ulteriori indagini con altre tecniche analitiche, confermando i sospetti (ad oggi i risultati non sono ancora pubblicati) (Sammarco et al., 2023).

In conclusione, possiamo affermare che i risultati evidenziano una preziosa discriminazione tra campioni puri con tassi di accuratezza della classificazione compresi tra l’89 % e il 100 %, sono stati ottenuti anche risultati promettenti sui campioni misti, in particolare per quanto riguarda le nocciole fresche e tostate, che hanno presentato tassi di accuratezza di classificazione dell’81 % e del 91 %; mentre, per quanto riguarda le paste di nocciola, si sono ottenuti risultati non eccellenti, il che ha sottolineato una bassa sensibilità della tecnica su questa specifica matrice, probabilmente a causa della sua complessità.

Pertanto, questa tecnica analitica potrebbe svolgere un ruolo strategico nella valutazione dell’origine geografica considerando che si tratta di un approccio rapido, diretto, non distruttivo e conveniente.

6.3 USO DELLA CROMATOGRAFIA PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DELLA PASTA DI NOCCIOLA CON OLI A MINOR COSTO

La pasta di nocciole è molto apprezzata nell'industria alimentare per il suo sapore distintivo; tuttavia, le pratiche illegali possono coinvolgere anche questi prodotti, in particolare con l'aggiunta di oli vegetali a basso costo per diluire la pasta. Se la quantità di olio aggiunto supera il 5%, la qualità del prodotto finale può essere compromessa, alterandone le caratteristiche organolettiche, interferendo con la durata di conservazione e introducendo allergeni (soprattutto da olio di arachidi o soia) che potrebbero avere effetti negativi sulla salute dei consumatori.

Per analizzare che tipologia di oli vengono aggiunti, e in che quantità, Bonvehi e colleghi nel 2009 hanno riportato nel loro lavoro anche le caratteristiche dell'olio di nocciole per capirne le differenze rispetto agli adulteranti.

L'olio contenuto all'interno della pasta di nocciole deriva dalla macinazione delle nocciole intere ed ha un alto contenuto di acidi grassi insaturi MUFA (MonoUnsaturated Fatty Acid) e PUFA (Polyunsaturated Fatty Acid) che rappresentano il 92% degli acidi grassi totali presenti e contiene molta vitamina E; in particolare, si trova un alto contenuto di α -tocoferolo, considerato un nutriente importante per la dieta umana. Di conseguenza, dal punto di vista della qualità del prodotto è importante la conoscenza della distribuzione qualitativa e quantitativa dei composti caratteristici come gli acidi grassi e il tocoferolo (Bonvehi et al., 2009).

La presenza di oli estranei aggiunti alla pasta di nocciole può essere rilevata controllando alcuni composti, come la composizione TAG (triacilgliceroli, conosciuti come "trigliceridi"), gli idrocarburi steroidei (stigmasta-3,5- diene, abbreviato con STIG, o "stigmasta") derivanti da olio raffinato e i tocoferoli. È tuttavia difficile rilevare oli simili all'olio di nocciole quando vengono miscelati a basse percentuali (ad esempio arachidi, olio di girasole ad alto contenuto di acido oleico, mais e soia) a causa della loro elevata somiglianza a livello analitico (Fernandez-Moya et al., 2005). Per questo lavoro di Bonvehi et al. del 2009 gli obiettivi sono stati in sequenza: la rilevazione di pasta di nocciole adulterata, l'identificazione dei composti correlati all'adulterazione utilizzando procedure cromatografiche specifiche, l'analisi del profilo dei tocoferoli e delle posizioni 1,3 dei trigliceridi.

Sono stati acquistati 40 campioni di pasta di nocciole e sono stati scelti, in modo casuale, dieci marchi di oli di nocciole, arachidi, mais, soia e girasole ad alto contenuto di acido oleico; successivamente, per ciascuno dei cinque tipi di olio, i campioni sono stati miscelati in percentuali

dal 5 al 30%. Ogni analisi è stata fatta in duplicato e per l'estrazione della frazione lipidica è stato utilizzato il metodo Soxhlet (Bonvehi et al., 2009).

6.3.1 Profilo degli acidi grassi:

Fatty acid	Hazelnut oil	Peanut oil	5% added	10% added	20% added	30% added
C16:0	5.6	12.5	5.9	6.27	6.8	7.4*
C18:0	1.9	2.1	1.9	1.9	2	2.1
C18:1	77.9	51.1	76.8	75.8	73.8	71.3
C18:2	13.9	28.2	14.6	15.3	16.5	18.3
C18:3	0.11	ND	ND	ND	ND	ND
C20:0	ND	1.4	0.12	0.12	0.13	0.13
C20:1	0.24	1.1	0.24	0.24	0.26	0.28
C22:0	ND	3.8	0.16	0.24	0.38	0.68*
C24:0	ND	1.8	ND	0.11	0.26*	0.39
Fatty acid	Hazelnut oil	Sunflower oil	5% added	10% added	20% added	30% added
C16:0	5.6	3.7	5.5	5.4	5.3	5.2
C18:0	1.9	4.4	1.9	1.92	2.1	2.3
C18:1	77.9	75.3	78.2	78.1	78	77.7
C18:2	13.9	14.6	13.9	14.1	13.9	14.1
C18:3	0.11	ND	ND	ND	ND	ND
C20:0	ND	0.35	ND	ND	0.1	0.11
C20:1	0.24	0.39	0.23	0.23	0.24	0.24
C22:0	ND	1.26	ND	0.12	0.16	0.20*
C24:0	ND	0.42	ND	ND	0.07	0.11
Fatty acid	Hazelnut oil	Corn oil	5% added	10% added	20% added	30% added
C16:0	5.6	12.1	5.8	6.3	6.7*	7.4
C18:0	1.9	2.3	1.9	1.9	1.9	1.9
C18:1	77.9	32.6	76.2	73.9	69.7*	65
C18:2	13.9	49.9	15.4	17.2	20.8	24.8*
C18:3	0.11	1.1	0.11	0.11	0.11	0.12
C20:1	0.24	0.35	0.24	0.24	0.24	0.25
C24:0	ND	0.34	ND	ND	0.06*	0.10
Fatty acid	Hazelnut oil	Soybean oil	5% added	10% added	20% added	30% added
C16:0	5.6	9.4	5.84	6.1	6.24	6.87
C18:0	1.9	3.7	2	2.1	2.2	2.37
C18:1	77.9	23.3	75.3	72.4	68.1	62.1
C18:2	13.9	54.1	15.9	18	21.5	25.9
C18:3	0.11	7.4	0.42	0.81*	1.46	1.94
C20:1	0.24	0.27	0.24	0.24	0.24	0.24

Number of samples: 48.

^aND, not detected: <0.05%.

*Discriminant compound where value is significantly different from that of hazelnut oil ($P < 0.05$).

Tabella 7: influenza dei diversi oli non raffinati aggiunti alla pasta di nocciola. L'asterisco indica un valore significativamente differente da quello dell'olio di nocciola originale, i risultati sono espressi in percentuale. (Bonvehi et al., 2009)

I campioni di pasta di nocciole sono stati adulterati sperimentalmente in diverse proporzioni (5%, 10%, 20% e 30%) con oli vegetali non raffinati (arachidi, girasole ad alto contenuto di acido oleico, mais e soia) e la composizione degli acidi grassi ha mostrato alcune differenze significative: si sono notate differenze soprattutto nei livelli di acido palmitico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2)

e linolenico (C18:3) e nello specifico possiamo dire che, analizzando la tabella 7, l'incorporazione di olio d'arachidi nella pasta di nocciole ha aumentato la percentuale di acido linoleico (C18:2), ma a causa della grande variazione di questo acido grasso nell'olio di nocciola stesso (varia dal 6,8% al 20,1%,) riduce la possibilità di rilevare con precisione l'adulterazione.

Per quanto riguarda l'aggiunta dell'olio di arachidi notiamo che l'acido lignocericico (C24:0), non presente nell'olio di nocciola, aumenta gradualmente con l'aumentare dell'adulterazione; la sua determinazione si è rilevata accurata con un'aggiunta di olio superiore al 20%.

L'analisi degli acidi grassi ottenuta dalla miscela con l'olio di girasole ha mostrato differenze significative nei livelli di acido beenico (C22:0), assente nell'olio di nocciola, quando l'aggiunta di olio era del 30%; mentre, i risultati dell'incorporazione dell'olio di mais hanno rivelato sia la diminuzione del contenuto di acido oleico che l'aumento del contenuto di acido linoleico che da 13,9% è passato al 25%; entrambi correlati alla percentuale di adulterazione del 30%.

La sola identificazione dell'acido lignocericico e beenico nell'olio di nocciola può quindi essere utilizzata per rilevare una possibile adulterazione con l'olio di arachidi, girasole e mais, vista la sua assenza nel prodotto "puro".

6.3.2 Composizione dei trigliceridi (TAG):

Il vantaggio dell'uso del profilo TAG rispetto ai profili degli acidi grassi è che la loro distribuzione stereospecifica sulla molecola di glicerolo è geneticamente controllata, quindi, le informazioni derivanti dal profilo TAG potrebbero essere maggiori.

Bonvehi e colleghi hanno identificato e quantificato 25 TAG ed i principali correlati alle adulterazioni sono: LLLn, LLL, OLL, OOL, PLL, PPL, OOO, POO e SOO (le lettere utilizzate per ogni acido grasso sono: P = C16:0 (acido palmitico); S = C18:0 (acido stearico); O = C18:1 (acido oleico); L = C18:2 (acido linoleico); Ln = C18:3 (acido linolenico)). La principale differenza che si può osservare tra l'olio di nocciola e gli oli vegetali sono stati i livelli di trigliceridi contenenti tre acidi grassi insaturi come LLLn, LLL ed OOO.

I campioni di olio di nocciola utilizzati in questo lavoro hanno mostrato alti livelli di LLL, OLL, OOL ed OOO, e l'assenza di LLLn, OLLn, e SLL, in accordo con la letteratura (Parcerisa et al., 1995). Un importante dato è la presenza di un alto contenuto di SOO in seguito all'aggiunta di olio di semi di girasole in percentuali tra il 20% ed il 30%; è importante notare come l'aumento significativo di questo TAG corrisponda ad una riduzione di OOL, con livelli di adulterazione del 30%.

Triacylglycerol (ECN)	Hazelnut oil	Peanut oil	5% added	10% added	20% added	30% added
LLL (42)	1.32	2.7	1.36	1.43	1.54	1.71
OLL (44)	4.5	19.7	5.3	5.9	7.41	8.84
OOL (46)	17.1	21.8	17.2	17.7	18.1	18.8
POL (46)	3.4	15.3	3.94	4.7	5.44*	6.82
PPL (46)	0.37	3.1	0.39	0.47	0.92*	1.2
OOO (48)	55.1	12.9	54.1	51.9	49.3	45.1
POO (48)	12.9	7.7	12.7	12.5	12.1	11.8
Triacylglycerol	Hazelnut oil	Sunflower oil	5% added	10% added	20% added	30% added
LLL (42)	1.32	ND	1.27	1.21	1.08	0.89
OOL (46)	17.1	5.7	16.7	16.1	15.5	14.3
POL (46)	3.4	ND	3.17	3.0	2.78	2.43
OOO (48)	55.1	75.1	56.8	57.4	58.9	60.8
POO (48)	12.9	ND	12.1	11.7	10.5	9.1
PPO (48)	0.3	6.4	0.41	0.78	1	1.27
SOO (50)	3.41	12.4	4.3	4.69	5.41	7.09*
Triacylglycerol	Hazelnut oil	Corn oil	5% added	10% added	20% added	30% added
LLL (42)	1.32	25.9	2.47	3.64	5.96	8.47
OLL (44)	4.5	21.1	5.3	5.9	7.1	9
PLL (44)	0.3	16.2	0.94	1.94	2.86*	4.53
OOL (46)	17.1	12.9	16.9	16.8	16.3	15.4
POL (46)	3.4	ND	3.16	2.99	2.78	2.52
POL + SOL (46)	ND	12.7	0.6	1.04*	1.9	3.69
PPL (46)	0.37	2.7	0.53	0.68	0.79*	1.03
OOO (48)	55.1	3.1	53.1	51.3	48.2	42.5
POO (48)	12.9	ND	12.3	11.4	10.3	8.6
Triacylglycerol	Hazelnut oil	Soybean oil	5% added	10% added	20% added	30% added
LLL _n (40)	ND	8.1	0.38*	0.77	1.56	2.42
LLL (42)	1.32	19.7	2.11	2.96	4.89	6.67
OLL _n (42)	ND	4.6	0.21*	0.37	0.92	1.32
PLL _n (42)	ND	2.4	0.11*	0.19	0.42	0.68
OLL (44)	4.5	21.8	5.26	6.1	7.94	9.62
OOL (46)	17.1	12.4	16.9	16.4	15.7	14.5
POL (46)	3.4	2.2	3.67	3.89	4.34	4.89
SLL (46)	ND	3.8	0.17*	0.34	0.71	1.1
OOO (48)	55.1	1.47	52.8	50.5	45.3	39.6
POO (48)	12.9	1.42	12.51	11.9	10.8	9.58

Tabella 8: differenze tra l'olio di nocciola e i diversi oli dal punto di vista del profilo dei trigliceridi, i valori significativamente discriminanti sono segnati con l'asterisco. ECN= Equivalent Carbon Number (Bonvehi et al., 2009).

Per analizzare le adulterazioni è stato utilizzato il metodo del Δ ECN (Equivalent Carbon Number). Per capire questo metodo dovremmo fare “un passo indietro” e spiegare come si calcola il l'ECN, il quale prende in considerazione sia la lunghezza della catena carboniosa che il grado di insaturazione (numero di doppi legami) dell'acido grasso ed è calcolato come segue:

$$\text{ECN} = \text{Numero di atomi di carbonio} - 2 \times (\text{Numero di doppi legami})$$

Volendo fare l'esempio con l'acido linoleico (C18:2) abbiamo che:

$$ECN = 18 - 2 \times 2 = 14$$

L'ECN è quindi utile a caratterizzare i profili degli acidi grassi negli oli, aiutando a determinarne le proprietà.

Il ΔECN si calcola facendo una sottrazione tra l'ECN trovato analiticamente e l'ECN teorico:

$$\Delta ECN = ECN \text{ trovato} - ECN \text{ teorico}$$

Il ΔECN ottenuto dall'olio di nocciole di diversa provenienza aveva valori tra 0,52 e 1,42; questa varietà è associata alla provenienza diversa delle nocciole. Bonvehi e colleghi, quindi, si aspettarono che i valori al di fuori di questo intervallo riconducessero ad una probabile adulterazione (Bonvehi et al., 2009).

Il valore ΔECN ottenuto dalla pasta di nocciole adulterata con il 5% di olio di mais e con il 10% di olio di soia supera l'intervallo di riferimento dell'olio di nocciola genuino. D'altra parte, l'aggiunta di olio di arachidi non era rilevabile a livelli inferiori al 30%, mostrando risultati non ottimali; questi risultati indicano che la determinazione con il metodo ΔECN ha migliorato il limite di rilevamento nell'olio di nocciola adulterato con olio di mais o di soia (Bonvehi et al., 2009).

6.3.3 Profilo dei tocoferoli:

Bonvehi e colleghi, prima di esaminare l'effetto dei vari oli aggiunti sulla composizione dei tocoferoli, hanno condotto uno studio preliminare sul profilo dei tocoferoli di tutte le diverse tipologie di oli vegetali impiegati nell'esperimento.

Lo studio del profilo iniziale ha permesso di ottenere una mappa dettagliata delle concentrazioni dei singoli tocoferoli, facilitando così l'identificazione di eventuali cambiamenti significativi dovuti all'aggiunta di oli diversi (Bonvehi et al., 2009).

Sulla base di questi dati, Bonvehi e colleghi hanno tenuto in considerazione il rapporto α - / γ - tocoferolo per determinare l'adulterazione; infatti, dalla tabella 9 possiamo notare come solo una percentuale di adulterazione del 5% possa essere determinante nello scovare una potenziale frode (Bonvehi et al., 2009).

Vitamin E	Hazelnut oil	Peanut oil	5% added	10% added	20% added	30% added
α -Tocopherol	382	202	369	353	341	332
β -Tocopherol	ND	13	ND	ND	ND	ND
γ -Tocopherol	26	288	16.7	30.1	49.4*	80.6
δ -Tocopherol	ND	6.4	ND	ND	ND	ND
Total	408	509.4	385.7	383.1	390.4	412.6
α/γ -Tocopherol	14.7	0.7	22.1	11.7	6.9*	4.12
Vitamin E	Hazelnut oil	Sunflower oil	5% added	10% added	20% added	30% added
α -Tocopherol	382	803	417	434	472	521
β -Tocopherol	ND	14.1	ND	ND	ND	ND
γ -Tocopherol	26	18.5	24.7	25.2	24.6	24.1
δ -Tocopherol	ND	16	ND	ND	ND	5.6*
Total	408	851.6	441.7	459.2	496.6	550.7
α/γ -Tocopherol	14.7	43.4	16.9	17.2	19.2	21.6
Vitamin E	Hazelnut oil	Corn oil	5% added	10% added	20% added	30% added
α -Tocopherol	382	415	385	385	387	387
β -Tocopherol	ND	203	14.6	19.7	36	53.8
γ -Tocopherol	26	1617	87*	164	312	456
δ -Tocopherol	ND	38	ND	5.7*	7.9	10.2
α -Tocotrienol	ND	117	ND	10.8*	17.3	26.8
γ -Tocotrienol	ND	145	ND	11.4*	24.8	35.8
δ -Tocotrienol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	408	2535	486.6	590.9	777.1	969.6
α/γ -Tocopherol	14.7	0.26	4.43*	2.35	1.24	0.85
Vitamin E	Hazelnut oil	Soybean oil	5% added	10% added	20% added	30% added
α -Tocopherol	382	287	376	372	364	358
β -Tocopherol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ -Tocopherol	26	1954	119*	189	375	572
δ -Tocopherol	ND	685	27	62	128	198
α -Tocotrienol	ND	32	ND	ND	ND	ND
γ -Tocotrienol	ND	87	ND	6.8*	14.4	24.1
δ -Tocotrienol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total	408	3045	522	623	881.4	1152.1
α/γ -Tocopherol	14.7	0.15	3.16*	1.97	0.97	0.63

Tabella 9: Influenza dei diversi oli aggiunti (5%, 10%, 20% e 30%) all'olio di nocciola sulla composizione del tocoferolo (mg kg^{-1}) (Bonvehi et al., 2009)

Le analisi sui profili degli acidi grassi e TAG non hanno permesso la rilevazione di adulterazioni maggiori al 20% con olio di arachidi, il profilo dei tocoferoli ha invece offerto un'opzione aggiuntiva per il suo riconoscimento.

Il riconoscimento dell'olio di girasole aggiunto all'olio di nocciola è stato più difficile perché ha avuto un impatto minimo sulla distribuzione del tocoferolo; infatti, l'adulterazione con l'olio di girasole è stata rilevata ad un livello minimo del 30%; al contrario, l'olio di mais può essere facilmente identificato utilizzando la frazione dei tocotrienoli come riferimento ad un livello di addizione del 10% e il rapporto α/γ -tocopherolo ad un livello di aggiunta del 5%.

Questi risultati confermano la variabilità della frazione lipidica nella pasta di nocciole, probabilmente a causa di fattori come lo sviluppo della nocciola durante la crescita, la varietà, il contenuto di olio e il tipo di olio vegetale sospettato di frode.

In sintesi, possiamo affermare che: l'applicazione delle procedure cromatografiche è uno strumento utile per distinguere tra olio di nocciola puro e altri oli; le adulterazioni tra il 5% e il 20% possono essere rilevate accuratamente (in base al tipo di metodo; queste metodiche non sono in grado di rilevare l'adulterazione dell'olio di nocciole con olio di girasole ad alto contenuto di acido oleico tra il 5 e 25% a causa della loro elevata somiglianza (Bonvehi et al., 2009).

6.4 UTILIZZO DELLA RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE (NMR) PER DETERMINARE L'ADULTERAZIONE DI CREME SPALMABILI ALLA NOCCIOLA

Nei precedenti capitoli abbiamo visto che le creme spalmabili di nocciole sono dispersioni di solidi in oli, derivati dalla macinazione delle nocciole e che si presentano come una massa cremosa e spalmabile a temperatura ambiente, grazie alla cristallizzazione parziale dei trigliceridi con un alto punto di fusione come l'olio di palma (PO) e il burro di cacao (CB).

Quando utilizziamo il termine “creme” facciamo riferimento a prodotti contenenti nocciole finemente macinate, zucchero, latte e cacao in polvere e olio di palma addizionato per dare al prodotto una consistenza cremosa e più stabilità.

A causa dei problemi ecologici di attualità riguardo alla produzione di olio di palma, sono al centro della ricerca degli studi che portino all'identificazione di grassi strutturanti alternativi (Trapp et al., 2024); tuttavia, la sostituzione dell'olio di palma per le aziende rappresenta dei costi aggiuntivi perché le materie prime sostitutive hanno prezzi più elevati, parametri fisici peggiori e conferiscono un gusto diverso; ad esempio: l'olio di palma nel settembre del 2023 aveva un prezzo di 830 dollari per tonnellata (Banca Mondiale, 2023), mentre i suoi “sostituti” avevano un prezzo da cinque a dieci volte maggiore (Trapp et al., 2024).

Per quanto a conoscenza di Trapp et al., finora non esiste alcun approccio analitico per rilevare possibili frodi nelle creme di nocciola in modo veloce, non distruttivo, conveniente e con una buona riproducibilità; pertanto, l'obiettivo dello studio è stato di sviluppare un metodo non invasivo e ripetibile per distinguere i grassi presenti nelle creme di nocciole, in particolare per rilevare la sostituzione del burro di cacao con oli meno costosi come quello di palma. Il metodo impiegato è quello del “rilassamento trasversale” misurato attraverso la risonanza magnetica nucleare in dominio del tempo (TD-NMR) a idrogeno (^1H); gli esperimenti sono stati condotti su 20 campioni di creme di nocciole commerciali e 5 campioni di riferimento di grassi e oli vegetali.

La risonanza magnetica nucleare (NMR) rappresenta un dispositivo potente e non distruttivo che è ben consolidato nell'ambiente alimentare nella rilevazione delle adulterazioni; in particolare nelle industrie alimentari, nei reparti di controllo qualità è molto utilizzato l'NMR “time domain” ^1H ad alta efficienza (TD-NMR) con strumenti a “low-field”. “ ^1H ” indica che si sta osservando il comportamento dei nuclei di idrogeno (protoni) all'interno del campione; viene analizzato l'idrogeno perché è il nucleo più comune e sensibile (Oxford instruments).

La NMR nel dominio del tempo, o TD-NMR (Time Domain Nuclear Magnetic Resonance), utilizza strumenti da banco compatti che più comunemente misurano olio, acqua e determinano il contenuto

di grassi in vari campioni; è una tecnica analitica non distruttiva che sfrutta i principi della risonanza magnetica nucleare (NMR) per ottenere informazioni sulla composizione e sulla struttura di un materiale. A differenza della tecnica NMR convenzionale, che analizza il segnale nel dominio della frequenza, la TD-NMR si concentra sul comportamento del segnale nel tempo dopo l'eccitazione con un impulso di radiofrequenza (RF).

Tale tecnica funziona attraverso tre fasi principali: inizialmente, un impulso di radiofrequenza (RF) viene applicato al campione, causando la rotazione dei nuclei magnetici presenti nel materiale; successivamente, una volta terminato l'impulso RF, i nuclei magnetici ritornano al loro stato di equilibrio, rilasciando energia sotto forma di un segnale oscillatorio. Infine, il segnale oscillatorio, noto come decadimento ad induzione libera (FID), viene rilevato e analizzato nel tempo. La forma del FID fornisce informazioni sulla composizione chimica e sulla struttura del materiale (Oxford Instruments).

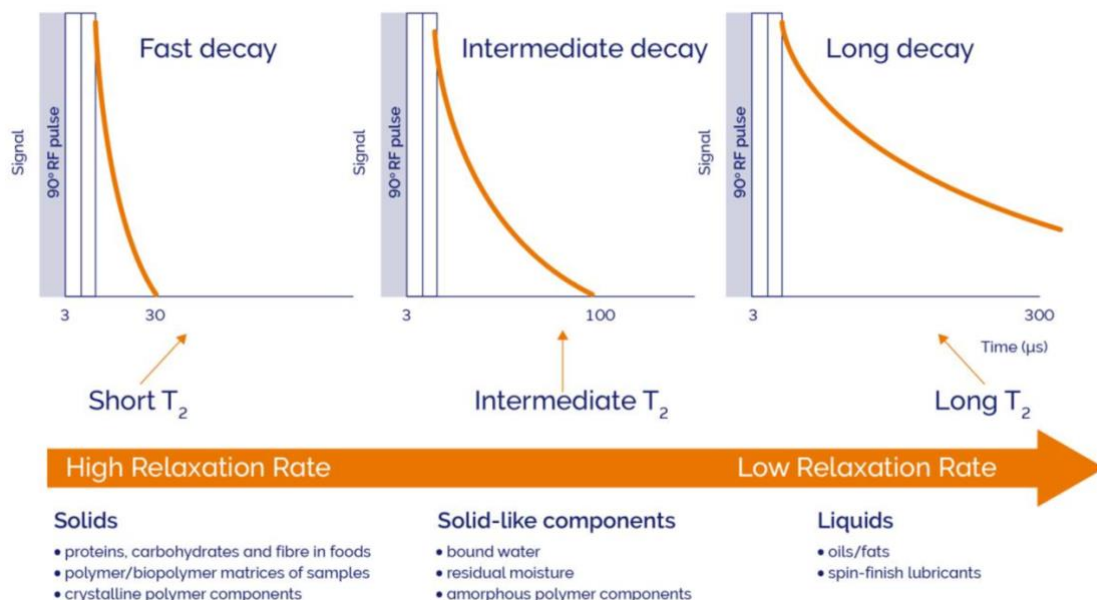


Figura 40: Grafico che dimostra le differenze tra campioni solidi, semisolidi e liquidi in seguito all'applicazione di impulsi di radiofrequenza (Oxford instruments)

Presenta diversi vantaggi, come: ha un basso costo perché richiede magneti a bassa intensità e componenti elettronici relativamente semplici, il che la rende una tecnica analitica più economica rispetto alla NMR convenzionale. È inoltre una tecnica robusta perché meno sensibile alle variazioni di temperatura e all'eterogeneità del campione, rendendola più adatta per l'analisi di materiali solidi e porosi. Infine, è una tecnica non distruttiva perché non altera il campione.

I risultati del lavoro di Trapp e colleghi mostrano che la tecnica TD-NMR può distinguere tra burro di cacao e olio di palma sulla base delle differenze nella temperatura di fusione grazie a tassi di

rilassamento trasversale: la temperatura di fusione del burro di cacao è più bassa rispetto a quella dell'olio di palma, il che si riflette nei diversi comportamenti di rilassamento osservati. Il metodo si è rivelato affidabile per classificare le creme di nocciole in base al loro contenuto di burro di cacao o olio di palma, nonostante le varie ricette e composizioni degli ingredienti.

La valenza statistica del metodo TD-NMR per il rilevamento di frodi nelle creme di nocciole è stata valutata attraverso la misurazione della ripetibilità delle misurazioni; gli autori hanno condotto esperimenti per determinare sia l'errore strumentale (caso A) che l'errore di preparazione del campione (caso B).

Nel caso A, sono state eseguite dieci misurazioni consecutive sullo stesso campione di crema di nocciole contenente olio di palma, a temperatura ambiente (considerata come scenario peggiore) e i risultati hanno mostrato che l'errore assoluto standard delle misurazioni era inferiore al 1% per tempi superiori a 1 secondo, e non superiore al 2% per tempi inferiori a 1 secondo; questo indica che lo strumento ha una buona ripetibilità e che soddisfa le specifiche di una riproducibilità del segnale NMR del 5% (Trapp et al., 2024).

Nel caso B, l'errore introdotto dalla preparazione del campione è stato valutato preparando e misurando dieci campioni indipendenti della stessa crema di nocciole. Gli errori relativi erano leggermente più alti rispetto al caso A, con un errore relativo massimo del 4% per tempi inferiori a 1 secondo. In sintesi, la valenza statistica del metodo TD-NMR è stata confermata attraverso la dimostrazione di una buona ripetibilità delle misurazioni, sia in termini di errore strumentale che di errore nella preparazione del campione. Gli errori sono quindi stati quantificati e sono risultati all'interno dei limiti accettabili per un'analisi significativa nel controllo qualità e nel rilevamento di frodi nelle creme di nocciole.

Il lavoro di Trapp et al., infine, fornisce una procedura operativa standard (SOP) per l'applicazione industriale del metodo TD-NMR nel controllo qualità e nel rilevamento di frodi nelle creme di nocciole; suggerendo che l'uso di uno spettrometro NMR a basso campo, con sonda da 10 mm e campioni preparati in apposite provette, consenta misure precise e riproducibili.

In conclusione, lo studio ha dimostrato che la TD-NMR è uno strumento efficace per analizzare le creme di nocciole e rilevare la presenza di grassi diversi dal burro di cacao, contribuendo così alla lotta contro la frode alimentare e al mantenimento degli standard qualitativi nei prodotti alimentari.

Ulteriori studi, non riportati in questo elaborato, dimostrano l'efficacia di metodi analitici per la determinazione di frodi nella filiera della nocciola, ad esempio:

-Lopez et. al nel 2014 hanno lavorato sull'identificazione di pasta di mandorle e farina di ceci nella pasta di nocciole con l'utilizzo della spettroscopia NIR.

-Sammarco et al, nel 2023 hanno valutato l'autenticità l'origine geografica delle nocciole in diversi punti della filiera, con l'uso della gas cromatografia.

-Banu et al, nel 2002 hanno pubblicato su "Agricultural and Food Chemistry" un lavoro sull'identificazione dell'adulterazione dell'olio di nocciola utilizzando la spettroscopia FT-IR

7. CONCLUSIONI

Questo elaborato ha analizzato i metodi analitici per individuare le adulterazioni del pistacchio e della nocciola, sia come materie prime che come prodotti trasformati. È emerso che gli adulteranti più comuni sono il pisello verde e gli spinaci essiccati per la granella di pistacchio, e gli oli a basso costo, soprattutto l'olio di girasole, per le paste di pistacchio e di nocciola.

La maggior parte degli articoli ha riportato risultati chiari, indicando la spettroscopia IR, e in particolare l'uso del NIR sulle paste di pistacchio, come uno dei metodi migliori per combinare bassi costi di investimento e ottima affidabilità; questo metodo, conforme all'obiettivo iniziale, ha permesso di identificare con precisione i campioni adulterati con olio di girasole analizzando il profilo dei tocoferoli.

Con costi di investimento più elevati, un'analisi valida ed efficace è la cromatografia, utilizzata per rilevare le adulterazioni nella pasta di nocciola con oli meno costosi, esaminando il profilo degli acidi grassi, dei trigliceridi e dei tocoferoli.

La ricerca futura dovrebbe continuare ad esplorare nuovi metodi analitici e migliorare quelli esistenti, rendendoli più accessibili alle aziende e garantendo un controllo sempre più preciso. Inoltre, è importante considerare un maggior numero di prodotti lungo tutta la filiera, poiché la complessità della stessa permette che pratiche fraudolente possano avvenire in qualsiasi punto; sviluppare metodi capaci di identificarle è essenziale non solo per la salute del consumatore, ma anche per preservare il valore del prodotto.

In conclusione, un aspetto cruciale che emerge è la necessità di una vigilanza costante e dello sviluppo di tecniche analitiche avanzate per contrastare le frodi in continua evoluzione.

BIBLIOGRAFIA

- Allegrini, Agnese, et al. «Multipurpose Plant Species and Circular Economy: *Corylus Avellana* L. as a Study Case». *Frontiers in Bioscience-Landmark*, vol. 27, fasc. 1, gennaio 2022, p. 1. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.31083/j.fbl2701011>.
- Arena, E., et al. «Distribution of Fatty Acids and Phytosterols as a Criterion to Discriminate Geographic Origin of Pistachio Seeds». *Food Chemistry*, vol. 104, fasc. 1, gennaio 2007, pp. 403–08. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.029>.
- Aykas, Didem Peren, e Ahmed Menevseoglu. «A Rapid Method to Detect Green Pea and Peanut Adulteration in Pistachio by Using Portable FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy Combined with Chemometrics». *Food Control*, vol. 121, marzo 2021, p. 107670. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107670>.
- Balasubramanian, D. «PH—Postharvest Technology». *Journal of Agricultural Engineering Research*, vol. 78, fasc. 3, marzo 2001, pp. 291–97. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1006/jaer.2000.0603>.
- Barthet, V. J. «Canola: Overview». *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2016, p. B9780081005965000299. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00029-9>.

- Bastianelli, D., et al. «Feeding Value of Pea (*Pisum Sativum* , L.) 1. Chemical Composition of Different Categories of Pea». *Animal Science*, vol. 67, fasc. 3, dicembre 1998, pp. 609–19. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S1357729800033051>.
- Bernardi, N., et al. «Preliminary Assessment of Vegetable Oil Adulteration of Pistachio Paste by near Infrared Spectroscopy». *NIR News*, vol. 25, fasc. 4, giugno 2014, pp. 20–21. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1255/nirn.1447>.
- Bonvehi, Josep Serra, e Francesc Ventura Coll. «Detecting Vegetable Oil Adulteration in Hazelnut Paste (*Corylus Avellana* L.)». *International Journal of Food Science & Technology*, vol. 44, fasc. 3, marzo 2009, pp. 456–66. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01742.x>.
- Bulló, M., et al. «Nutrition Attributes and Health Effects of Pistachio Nuts». *British Journal of Nutrition*, vol. 113, fasc. S2, aprile 2015, pp. S79–93. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S0007114514003250>.
- Campmajó, Guillem, et al. «Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry for Nut Classification and Marker Identification». *Food Control*, vol. 152, ottobre 2023, p. 109834. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109834>.
- Čížková, H., et al. «Filbertone as a marker for the assessment of hazelnut spread quality». *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 31, fasc. 1, febbraio 2013, pp. 81–87. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.17221/493/2011-CJFS>.

Downes, Andrew, e Alistair Elfick. «Raman Spectroscopy and Related Techniques in Biomedicine».

Sensors, vol. 10, fasc. 3, marzo 2010, pp. 1871–89. *DOI.org (Crossref)*,

<https://doi.org/10.3390/s100301871>.

Eksi-Kocak, Haslet, et al. «Detection of Green Pea Adulteration in Pistachio Nut Granules by Using

Raman Hyperspectral Imaging». *European Food Research and Technology*, vol. 242, fasc. 2,

febbraio 2016, pp. 271–77. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2538-3>.

Everstine, Karen D., et al. «Database of Food Fraud Records: Summary of Data from 1980 to 2022».

Journal of Food Protection, vol. 87, fasc. 3, marzo 2024, p. 100227. *DOI.org (Crossref)*,

<https://doi.org/10.1016/j.jfp.2024.100227>.

Faruk Gamlı, Ö., e İbrahim Hayoğlu. «The Effect of the Different Packaging and Storage Conditions

on the Quality of Pistachio Nut Paste». *Journal of Food Engineering*, vol. 78, fasc. 2, gennaio

2007, pp. 443–48. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.10.013>.

Gussow, K. E. (2020). «Finding food fraud: Explaining the detection of food fraud in the

Netherlands». [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

Gilani, H., e H. Sahebi. «Optimal Design and Operation of the Green Pistachio Supply Network: A

Robust Possibilistic Programming Model». *Journal of Cleaner Production*, vol. 282, febbraio

2021, p. 125212. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125212>.

Gwenzi, Willis, et al. «Chicanery in the Food Supply Chain! Food Fraud, Mitigation, and Research Needs in Low-Income Countries». *Trends in Food Science & Technology*, vol. 136, giugno 2023, pp. 194–223. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.03.027>.

Iqbal, Amjad, et al. «Nutritional Quality of Important Food Legumes». *Food Chemistry*, vol. 97, fasc. 2, luglio 2006, pp. 331–35. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.011>.

Kashaninejad, M., et al. «Some Physical Properties of Pistachio (*Pistacia Vera* L.) Nut and Its Kernel». *Journal of Food Engineering*, vol. 72, fasc. 1, gennaio 2006, pp. 30–38. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.11.016>.

Kennedy, Shaun P. «History of Food Fraud and Development of Mitigation Requirements and Standards». *Food Fraud*, Elsevier, 2021, pp. 9–22. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817242-1.00018-X>.

Khanban, Fatemeh, et al. «Evaluation of FT-IR Spectroscopy Combined with SIMCA and PLS-DA for Detection of Adulterants in Pistachio Butter». *Infrared Physics & Technology*, vol. 127, dicembre 2022, p. 104369. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2022.104369>.

Kucukoner, Erdogan, e Bayram Yurt. «Some chemical characteristics of *Pistacia vera* varieties produced in Turkey». *European Food Research and Technology*, vol. 217, fasc. 4, ottobre 2003, pp. 308–10. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0763-7>.

López, M. Isabel, et al. «Multivariate Screening in Food Adulteration: Untargeted versus Targeted Modelling». *Food Chemistry*, vol. 147, marzo 2014, pp. 177–81. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.139>.

Luparelli, Anna, et al. «Tree Nuts and Peanuts as a Source of Beneficial Compounds and a Threat for Allergic Consumers: Overview on Methods for Their Detection in Complex Food Products». *Foods*, vol. 11, fasc. 5, marzo 2022, p. 728. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/foods11050728>.

M., Kashaninejad, M. Kashaninejad, Gorgan, *Pistachio* «*Pistacia vera L.*»

Mancini, Annamaria, et al. «Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health». *Molecules*, vol. 20, fasc. 9, settembre 2015, pp. 17339–61. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/molecules200917339>.

Mandalari, Giuseppina, et al. «Pistachio Nuts (*Pistacia Vera L.*): Production, Nutrients, Bioactives and Novel Health Effects». *Plants*, vol. 11, fasc. 1, dicembre 2021, p. 18. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.3390/plants11010018>.

Manning, Louise, e Jan Mei Soon. «Food Fraud Vulnerability Assessment: Reliable Data Sources and Effective Assessment Approaches». *Trends in Food Science & Technology*, vol. 91, settembre 2019, pp. 159–68. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.007>.

- Márquez, Cristina, et al. «FT-Raman and NIR Spectroscopy Data Fusion Strategy for Multivariate Qualitative Analysis of Food Fraud». *Talanta*, vol. 161, dicembre 2016, pp. 80–86. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.08.003>.
- Menevseoglu, Ahmed, et al. «Non-Targeted Approach to Detect Green Pea and Peanut Adulteration in Pistachio by Using Portable FT-IR, and UV–Vis Spectroscopy». *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 15, fasc. 2, aprile 2021, pp. 1075–82. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00710-y>.
- Ozen, Banu F., e Lisa J. Mauer. «Detection of Hazelnut Oil Adulteration Using FT-IR Spectroscopy». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, fasc. 14, luglio 2002, pp. 3898–901. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1021/jf0201834>.
- Rabadán, Adrián, et al. «Effect of Roasting Conditions on Pigment Composition and Some Quality Parameters of Pistachio Oil». *Food Chemistry*, vol. 264, ottobre 2018, pp. 49–57. *DOI.org* (*Crossref*), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.030>.
- Riza, Temizkan, et al. *Rapid detection of green pea adulteration in ground pistachio nuts using near and mid-infrared spectroscopy*. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Sciences*, 2020.
- Sammarco, Giuseppe, Daniele Bardin, et al. «A Geographical Origin Assessment of Italian Hazelnuts: Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry Coupled with Multivariate Statistical Analysis

and Data Fusion Approach». *Food Research International*, vol. 171, settembre 2023, p. 113085.
DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113085>.

Sammarco, Giuseppe, Chiara Dall'Asta, et al. «Near Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistical Analysis as Rapid Tools for the Geographical Origin Assessment of Italian Hazelnuts». *Vibrational Spectroscopy*, vol. 126, maggio 2023, p. 103531. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2023.103531>.

Sen, Fatima, et al. «The *trnL* (UAA)- *trnF* (GAA) Intergenic Spacer Is a Robust Marker of Green Pea (*Pisum Sativum* L.) Adulteration in Economically Valuable Pistachio Nuts (*Pistacia Vera* L.)». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 100, fasc. 7, maggio 2020, pp. 3056–61.
DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1002/jsfa.10336>.

Sezer, Banu, et al. «Detection of *Pistacia Vera* Adulteration by Using Laser Induced Breakdown Spectroscopy». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 99, fasc. 5, marzo 2019, pp. 2236–42. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1002/jsfa.9418>.

Shakerardekani, Ahmad, et al. «The Effect of Replacing Honey with Sugar on Oxidative Stability Properties of Pistachio Butter». *Pistachio and Health Journal*, vol. 3, fasc. 4, dicembre 2020.
DOI.org (CSL JSON), <https://doi.org/10.22123/phj.2021.275981.1087>.

Sheibani, Ali, et al. «FT-IR Application for the Detection of Pistachio Oil Adulteration». *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 30, fasc. 3, settembre 2014, pp. 1205–09. www.orientjchem.org, <http://www.orientjchem.org/vol30no3/ft-ir-application-for-the-detection-of-pistachio-oil-adulteration/>.

Shokraii, Esmail H., e Asim Esen. «Composition, Solubility and Electrophoretic Patterns of Proteins Isolated from Kerman Pistachio Nuts (*Pistacia Vera L.*)». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 36, fasc. 3, maggio 1988, pp. 425–29. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1021/jf00081a006>.

Spink, John, e Douglas C. Moyer. «Defining the Public Health Threat of Food Fraud». *Journal of Food Science*, vol. 76, fasc. 9, novembre 2011. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02417.x>.

Suman, Michele, et al. «Fighting Food Frauds Exploiting Chromatography-Mass Spectrometry Technologies: Scenario Comparison between Solutions in Scientific Literature and Real Approaches in Place in Industrial Facilities». *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 142, settembre 2021, p. 116305. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116305>.

Taylan, Osman, et al. «Rapid Detection of Green-pea Adulteration in Pistachio Nuts Using Raman Spectroscopy and Chemometrics». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 101, fasc. 4, marzo 2021, pp. 1699–708. *DOI.org (Crossref)*, <https://doi.org/10.1002/jsfa.10845>.

Terzo, Simona, et al. «Health Benefits of Pistachios Consumption». *Natural Product Research*, vol. 33, fasc. 5, marzo 2019, pp. 715–26. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1408093>.

Trapp, Lena, et al. «Quality control of hazelnut-based spreads: 1H TD-NMR transverse relaxation». *Frontiers in Food Science and Technology*, vol. 3, gennaio 2024, p. 1294332. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3389/frfst.2023.1294332>.

Vinothkanna, Annadurai, et al. «Advanced Detection Tools in Food Fraud: A Systematic Review for Holistic and Rational Detection Method Based on Research and Patents». *Food Chemistry*, vol. 446, luglio 2024, p. 138893. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138893>.

Visciano, Pierina, e Maria Schirone. «Food Frauds: Global Incidents and Misleading Situations». *Trends in Food Science & Technology*, vol. 114, agosto 2021, pp. 424–42. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.010>.

Vitale, Raffaele, et al. «A Rapid and Non-Invasive Method for Authenticating the Origin of Pistachio Samples by NIR Spectroscopy and Chemometrics». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 121, febbraio 2013, pp. 90–99. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2012.11.019>.

Wu, Ding-Tao, et al. «A Comprehensive Review of Pea (*Pisum Sativum* L.): Chemical Composition, Processing, Health Benefits, and Food Applications». *Foods*, vol. 12, fasc. 13, giugno 2023, p. 2527. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.3390/foods12132527>.

SITOGRAFIA

-Nuts Book, 2019, ISBN: 978-88-944736-8-1

-INC, NUTS AND DRIED FRUIT STATISTICAL YEARBOOK 2022/23:

<https://inc.nutfruit.org/wp-content/uploads/2023/05/Statistical-Yearbook-2022-2023.pdf>

-Istituto zooprofilattici dell'Emilia e della Lombardia, articolo sulla Melamina:

<https://www.izsler.it/2009/01/08/melamina-domande-e-risposte>

-Articolo 178: [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:IT:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:IT:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:IT:PDF)

-Articolo 1169/2011: [https://eur-](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:it:PDF)

[lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:it:PDF](https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:it:PDF)

-articolo 515 Codice penale:

https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaArticolo?art.versione=1&art.idGruppo=44&art.flagTipoArticolo=1&art.codiceRedazionale=030U1398&art.idArticolo=515&art.idSottoArticolo=1&art.idSottoArticolo1=10&art.dataPubblicazioneGazzetta=1930-10-26&art.progressivo=0

- Reg 915/2023: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915>

-Reg 2429/2023: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=CELEX%3A32023R0429>

-Reg 1308/2013: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32013R1308>

-Standard UNECE pistacchio: www.unece.org/trade/agr

Prezzo del pisello verde e dei pistacchi:

<https://www.ismeamercati.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/2140>

Spiegazione PCR, NCBI:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/#:~:text=The%20polymerase%20chain%20reaction%20\(PCR,In%201985%2C%20PCR%20was%20introduced](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/#:~:text=The%20polymerase%20chain%20reaction%20(PCR,In%201985%2C%20PCR%20was%20introduced)

Immagine PCR: <https://www.the-scientist.com/optimizing-pcr-proven-tips-and-troubleshooting-tricks-71660>

Funzionamento LIBS: <https://www.uwindsor.ca/people/rehse/299/libs>

Funzionamento Raman : <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/infrared-and-raman/raman-spectrometers/what-is-raman-spectroscopy.html#:~:text=Raman%20spectroscopy%20is%20based%20on,polymorphism%2C%20crystallinity%20and%20molecular%20dynamics.>

Spiegazione NMR: <https://nmr.oxinst.com/application-detail/what-is-td-nmr>