

DIPARTIMENTO
DI MANAGEMENT



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**TESI FINALE DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MERCEOLOGICHE**

CICLO XXVI

**MISCELE DI OLI DI OLIVA ED ALTRI OLI VEGETALI:
PROPOSTA DI UN METODO DI ANALISI PER IL
CONTROLLO DELLA CONFORMITÀ ALLE NORME DI
ETICHETTATURA**

PRESENTATA DA

MARIA MONFREDA

MATRICOLA 1379582

TUTOR

PROF.SSA LAURA GOBBI

COORDINATORE DEL DOTTORATO

PROF. FABRIZIO D'ASCENZO

INTRODUZIONE.....	4
CAPITOLO 1 OLIO DI OLIVA E MISCELE CON ALTRI OLI VEGETALI.....	8
1.1. L'olio di oliva, tra classifica doganale e normativa internazionale.....	9
1.1.1. Nomenclatura e tariffa doganale	9
1.1.2. Classifica doganale dell'olio di oliva e Reg. CEE 2568/91 e ss.mm.	12
1.1.3. Il Consiglio Oleicolo Internazionale (COI).....	16
1.1.4. Sviluppi della regolamentazione dell'Unione europea e nazionale nel settore degli oli di oliva.....	18
1.1.5. Il Codex Alimentarius	22
1.2. Etichettatura degli oli di oliva, fenomeno della contraffazione e "made in". ...	24
1.2.1. Etichettatura degli alimenti: evoluzione normativa.....	24
1.2.2. Normativa nazionale ed europea a confronto: il D.Lgs. 109/1992 e il Reg. UE 1169/2011.....	28
1.2.2.1. Lingua ufficiale	31
1.2.2.2. Indicazioni obbligatorie.....	31
1.2.2.3. Denominazione di vendita.....	33
1.2.2.4. Il termine minimo di conservazione e la data di scadenza	34
1.2.3. Etichettatura nel campo degli oli di oliva.....	35
1.2.3.1. Origine.....	37
1.2.3.2. Indicazioni obbligatorie ed etichettatura volontaria.....	38
1.2.3.3. Le novità introdotte dalla Legge 9/2013.	39
1.2.4. Contraffazione.....	41
1.2.5. Origine e "made in".	45
1.3. Miscela di olio di oliva e altri oli vegetali.....	51
1.3.1. Riferimenti normativi.....	51
1.3.2. Il problema analitico delle miscele: letteratura di riferimento	53
1.3.3. Il profilo degli acidi grassi negli oli vegetali.....	55
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI E PIANO DI LAVORO.....	59
CAPITOLO 3 TECNICHE STATISTICHE IMPIEGATE PER IL TRATTAMENTO DEI DATI ANALITICI	62
3.1. Test F e analisi della varianza (ANOVA).....	63
3.2. Analisi statistica multivariata.....	66
3.2.1. Analisi delle componenti principali (PCA).....	67

3.2.2.	Target factor analysis (TFA).....	74
3.2.3.	Soft independent modelling of class analogy (SIMCA)	76
3.2.4.	Partial least squares (PLS)	81
CAPITOLO 4 SPERIMENTAZIONE PRELIMINARE: STUDIO DI MISCELE DI OLI DI OLIVA E		
	OLIO DI GIRASOLE.....	85
4.1.	Materiali e metodi	86
4.1.1.	Selezione dei campioni	86
4.1.2.	Preparazione del campione e analisi GC-FID	89
4.1.3.	Test statistici preliminari: verifica della ripetibilità analitica e analisi della varianza (ANOVA).....	90
4.1.4.	Analisi statistica multivariata.....	91
4.2.	Risultati e discussione	93
4.2.1.	Ripetibilità analitica	93
4.2.1.	Analisi della varianza.....	94
4.2.2.	Analisi delle componenti principali (PCA).....	94
4.2.3.	Target factor analysis	96
4.2.4.	Tecniche di modellamento di classe: Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA)	96
4.2.5.	Tecniche di calibrazione multivariata: Partial Least Square (PLS).....	99
4.3.	Conclusioni della sperimentazione preliminare condotta sul data set oliva - girasole.....	100
CAPITOLO 5 CARATTERIZZAZIONE SPERIMENTALE DI MISCELE DI OLI DI OLIVA CON		
	ALTRI OLI VEGETALI	102
5.1.	Materiali e metodi	104
5.2.	Risultati e discussione.....	106
5.2.1	Analisi della varianza.....	106
5.2.2	Analisi delle componenti principali (PCA).....	108
5.2.2.1	Miscela olio di oliva – olio di arachide	108
5.2.2.2	Miscela olio di oliva – olio di mais	109
5.2.2.3	Miscela olio di oliva-olio di riso	110
5.2.2.4	Miscela olio di oliva-olio di vinacciolo.....	112
5.2.2.5	PCA applicata ad un data set costituito da tutte le miscele	113
5.2.3.	Target factor analysis	115
5.2.4.	SIMCA	117

5.2.5. PLS.....	124
5.2.6. Analisi di miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva	126
5.2.6.1 SIMCA	126
5.2.6.2 PLS.....	134
5.3 Conclusioni della sperimentazione	137
CONCLUSIONI.....	138
BIBLIOGRAFIA	141
Riferimenti bibliografici	142
Riferimenti normativi e giurisprudenziali.....	148
Sitografia.....	153

INTRODUZIONE

L'etichettatura dei prodotti alimentari, aspetto fondamentale della legislazione alimentare, costituisce un importante strumento per orientare il consumatore verso una decisione di natura commerciale. Il legislatore italiano, da sempre proteso alla tutela del mercato nazionale contro il rischio di frodi, contraffazioni e sofisticazioni, opera in un contesto che, anche alla luce dell'elaborazione giurisprudenziale della Corte di Giustizia dell'UE e della Corte Costituzionale, vede la prevalenza delle norme europee sulle leggi nazionali.

Nel settore degli oli di oliva la legislazione europea ha accuratamente regolamentato il campo dei controlli mediante il Reg. CEE 2568 del 1991, che rappresenta una pietra miliare nel settore. Tale regolamento ha subito numerose modifiche negli anni, anche al fine di contrastare le tipologie di frodi che si sono via via diffuse nel mercato: dalla miscela di oli vergini con oli di sansa, con oli di semi, alle riesterificazioni e deacidificazioni, fino alla pratica della deodorazione introdotta negli ultimi anni.

Per quanto attiene al campo delle miscele degli oli di oliva e degli oli di semi, la legge italiana ha vietato la preparazione e la vendita di tali prodotti con il Regio Decreto Legge n. 2033 del 1925 (all'art. 23, così come modificato dal Regio Decreto Legge n. 2316 del 1929). La ratio di tale provvedimento, presente anche nelle legislazioni di altri Paesi europei produttori di olio, riposa nella volontà di preservare la qualità e la tradizione della produzione locale di olio di oliva, ma soprattutto ha la finalità di tutelare la salute dei consumatori; ciò anche in considerazione della mancanza di un metodo di controllo idoneo a quantificare i componenti delle miscele di oli.

Il legislatore europeo non ha tuttavia introdotto un divieto assoluto delle miscele di oli diversi, rivolgendo piuttosto la propria attenzione alla problematica della etichettatura di prodotti alimentari, che, contenendo olio di oliva, potessero ingannare “il consumatore sfruttando la reputazione dell'olio di oliva, senza indicare la composizione reale del prodotto”. Con il Reg. CE 1019/2002, attualmente trasfuso nel Reg. UE 29/2012, viene quindi imposto l'obbligo di indicare la percentuale di olio di oliva nella miscela e la possibilità di indicare la presenza dell'olio d'oliva in etichetta attraverso immagini o simboli grafici, unicamente se la percentuale di olio d'oliva sia superiore al 50%.

Nonostante la legislazione europea abbia regolamentato da oltre dieci anni il campo delle miscele legali di oli di oliva e oli di semi, non esiste ancora un metodo analitico ufficiale che sia in grado di quantificare la percentuale di olio di oliva in una miscela e, in particolare, di stabilire se l'olio di oliva sia presente in quantità inferiore o superiore al 50%, valore che limita, ai fini legali, la possibilità di utilizzare le citate immagini o simboli grafici.

Il presente lavoro di tesi si pone dunque l'obiettivo di elaborare un metodo analitico che consenta di riconoscere in miscele binarie "olio di oliva – olio di semi" la quantità del 50% di olio di oliva, abbinando all'analisi di parametri chimici, quali gli esteri metilici degli acidi grassi, idonee procedure chemiometriche. Si tratta di una tematica ancora poco esplorata, considerando l'assenza di un metodo ufficiale per l'analisi delle miscele e, viceversa, la presenza in letteratura di una notevole quantità di lavori incentrati sulla ricerca di adulteranti in una matrice costituita da olio di oliva puro.

La possibilità di disporre di un metodo analitico che permetta il controllo della percentuale di olio di oliva in una miscela legale con altri oli di semi assume importanza fondamentale, in quanto tale problematica può investire anche gli organi di controllo italiani, nonostante il divieto esistente per la produzione e il consumo interno. In effetti, mentre a seguito dell'introduzione del Reg. CE 1019/2002 le società italiane non riuscivano ad ottenere l'autorizzazione per produrre miscele di oli, seppure queste fossero destinate al di fuori del mercato nazionale (cfr. sentenza del Consiglio di Stato n. 482 del 2003), tale situazione è mutata con la disposizione introdotta dal Reg. CE 182/2009 e anch'essa trasferita nel Reg. UE 29/2012. Il legislatore europeo ha infatti stabilito che, a prescindere da eventuali divieti posti dalle leggi nazionali sulla produzione di miscele per il consumo interno, gli Stati membri non possono vietare, nel proprio territorio, la commercializzazione delle suddette miscele di oli provenienti da altri Paesi, né vietarne la produzione ai fini della esportazione o della commercializzazione in un altro Stato membro.

Alla luce di tutte le considerazioni appena svolte, si comprende come la messa a punto di un metodo per l'analisi di miscele legali di oli di oliva e oli di semi, obiettivo del presente lavoro di tesi, trovi idonea collocazione in un contesto che

attualmente registra l'impossibilità di procedere a controlli diretti sulla composizione delle miscele di oli: ciò costituendo una mancanza di tutela per il consumatore, solo in parte evitabile con un'appropriata etichettatura, e che comunque lascia irrisolto il problema di non poter verificare eventuali condotte non corrette delle imprese.

CAPITOLO 1

OLIO DI OLIVA E MISCELE CON ALTRI
OLI VEGETALI

1.1. L'olio di oliva, tra classifica doganale e normativa internazionale

1.1.1. Nomenclatura e tariffa doganale

Nell'ambito degli scambi internazionali, la corretta individuazione dei beni rappresenta un atto di importanza fondamentale, costituendo il presupposto per l'applicazione delle misure tariffarie, non tariffarie e di politica commerciale previste dalla legislazione doganale. Detta operazione viene effettuata, in tutti i Paesi del mondo, attraverso l'associazione a ciascun bene di un codice identificativo.

Tali codici, oltre ad assolvere ad una funzione tariffaria – in quanto consentono di risalire ai diritti doganali dovuti all'importazione o, eventualmente, all'esportazione del prodotto cui si riferiscono – hanno anche un valore statistico, in quanto permettono di raccogliere ed ordinare più facilmente i dati relativi ai flussi di interscambio relativi alle merci, così agevolando anche la comparazione con le statistiche formate da altri Paesi. Occorre tuttavia distinguere la "Nomenclatura" dalla "Tariffa". La prima, infatti, rappresenta semplicemente un elenco di beni accompagnato dalle relative denominazioni, organizzato in una struttura gerarchica ordinata per settori merceologici, cui corrispondono una serie di codici identificativi degli stessi. Maggiore è il numero di cifre (digit) con il quale viene identificato un prodotto, maggiore è il livello di sofisticazione merceologica dello stesso (le materie prime, ad esempio, sono codificate con un numero di cifre minore rispetto ai prodotti dell'alta tecnologia). Se poi alla nomenclatura sono abbinati anche i diritti doganali dovuti in relazione all'importazione (o all'esportazione) di ciascun bene, si parla più propriamente di "Tariffa" doganale.

Il Sistema Armonizzato (SA), introdotto dalla "Convenzione Internazionale sul Sistema Armonizzato di designazione e codificazione delle merci" (conclusa a Bruxelles il 14 giugno 1983 ed in vigore dal primo gennaio 1988), rappresenta oggi il sistema di classificazione delle merci di gran lunga più diffuso al mondo. Esso consiste in una codifica numerica a 6 digit (i primi 2 individuano il capitolo, il 3° e 4° la voce doganale, il 5° la sottovoce, il 6° la ripartizione di una sottovoce) completata da note e premesse per ciascuna sezione e capitolo in cui si articola,

nonché da regole generali per l'interpretazione che ne guidano l'utilizzazione. A causa della sua complessità, la struttura dei codici del Sistema Armonizzato viene aggiornata dall'Organizzazione Mondiale delle Dogane a cicli di 5 anni per riflettere i cambi e le evoluzioni nei prodotti oggetto di scambio internazionale. La versione attuale del SA (quella cioè comprensiva delle ultime modifiche adottate) è entrata in vigore il 1° gennaio 2012.

Nella sua prima edizione, tuttavia, il SA, nonostante le oltre 5.000 voci e sottovoci in cui si articolava, non era sufficiente a soddisfare le esigenze di classificazione di Paesi altamente industrializzati, quali gli Stati Uniti, il Giappone e la Comunità Europea, caratterizzati da un elevato grado di sofisticazione e complessità merceologiche, con conseguente esigenza di elaborare statistiche più complesse delle merci scambiate. Pertanto, la Comunità Europea, con il Reg. CEE n. 2658/87, ha adottato, a partire dal primo gennaio 1988, la Nomenclatura combinata (NC), la quale riprende la codifica a sei cifre del SA, integrandola con ulteriori 2 cifre, per un totale di 8 digit complessivi, rendendo così possibile la classificazione delle merci con un maggiore livello di dettaglio. La settima e l'ottava cifra identificano le sottovoci NC; quando le voci e sottovoci del SA non sono ulteriormente suddivise per esigenze comunitarie, la settima e l'ottava cifra sono "00".

L'allegato 1 del Reg. CEE 2658/87 costituisce la fonte normativa di riferimento per la nomenclatura tariffaria e statistica ed è soggetto ad aggiornamento annuale da parte della Commissione (art. 12 del Reg. CEE 2658/87); l'ultimo di essi afferisce al Reg. UE 1001/2013 (in vigore dal 1° gennaio 2014). L'allegato 1 riporta la tabella dei dazi; essa è suddivisa in 21 sezioni che riassumono le diverse categorie merceologiche in 99 capitoli. Le sezioni sono strutturate secondo schema logico: prima i prodotti base, poi i semilavorati, infine i prodotti finiti. La nomenclatura combinata comprende anche le disposizioni preliminari, le note complementari di sezioni o di capitoli e le note a piè di pagina relative alle sottovoci NC.

Per quanto riguarda le Tariffe doganali, all'interno della Comunità Europea, la prima ad essere adottata fu la "Tariffa Doganale Comune" (TDC), istituita dal Regolamento CEE n. 950/1968, entrato in vigore il primo luglio 1968. Questo Regolamento rappresenta una tappa importante per la Comunità Europea, in

quanto segna il momento in cui i singoli Stati membri perdono definitivamente qualsiasi competenza in materia di tariffa. Quello che prima costituiva una prerogativa sovrana, ossia il compito di stabilire i livelli daziari relativi alle merci importate o esportate nel proprio territorio, di fatto passava al Consiglio delle CE, che lo esercitava con riferimento all'intero territorio doganale comunitario (ai sensi dell'ex art. 26 Trattato CE – ora art. 31 TFUE – il Consiglio stabilisce i dazi deliberando a maggioranza qualificata su proposta della Commissione). Successivamente, con il citato Reg. CEE 2658/87, venne istituita (all'art. 2) la Tariffa Integrata della Comunità europea (TARIC), la quale si sostituì, abrogandola, alla TDC del Reg. CEE 950/1968. Rispetto alla NC (che è una semplice nomenclatura), la TARIC (che invece costituisce una tariffa) fissa, per ogni specie di bene elencato nella NC, anche l'ammontare dei diritti doganali e degli altri prelievi corrispondenti, così come rende note le specifiche disposizioni dei regolamenti dell'UE cui questi beni sono soggetti. La TARIC rappresenta, dunque, lo strumento che consente di avere una visione completa di tutte le numerose misure, sia a carattere tariffario che non tariffario, che si applicano all'interno della UE, con specifico riferimento alle singole merci che vi sono importate o esportate: dalle misure commerciali (es. dazi antidumping e dazi compensatori), a quelle restrittive della circolazione delle merci (proibizioni e restrizioni all'importazione ed all'esportazione, contingenti quantitativi), alle misure tariffarie (sospensioni, contingenti, massimali tariffari ed altri tipi di preferenze tariffarie), ed altre di tipo diverso (es. misure di sorveglianza, restituzioni all'esportazione, ecc.) (sitografia rif. [1]). Nella TARIC, la classificazione ad 8 cifre del sistema NC viene espansa di 2 cifre, fino a raggiungere un totale di 10 cifre, integrate a loro volta, in alcuni casi, da ulteriori 4 caratteri alfanumerici che costituiscono il codice addizionale "CADD"; tale codifica addizionale individua in maniera più puntuale alcune tipologie particolari di prodotti oggetto di specifiche regolamentazioni dell'UE non codificate, o parzialmente codificate, con la nona e la decima cifra TARIC (es.: dazi antidumping, dazi compensatori, elementi agricoli, sostanze farmaceutiche, prodotti rientranti nella CITES, ecc.). Questa estensione del codice di base della NC permette di passare dalle circa 10.000 rubriche della NC alle circa 18.000 della TARIC. La TARIC, come le tariffe di lavoro nazionali, non ha lo statuto di

home>consultazione>nomenclature taric - indice taric>nomenclature taric - visualizza	
Elenco Nomenclature TARIC	
Criteri	
Codice	Descrizione
1509	Olio d'oliva e sue frazioni, anche raffinati, ma non modificati chimicamente
1509 10	- vergini
1509 1010 00	-- Olio d'oliva lampante
1509 1090 00	-- altri
1509 9000 00	- altri

Figura 2: TARIC: voce 1509

Alla voce 1510 (figura 3) vengono normalmente classificati gli oli ottenuti dalle olive mediante solventi (oli di sansa), distinti a seconda che siano greggi (codice 1510 0010) o altri (ovvero raffinati, codice 1510 0090).

home>consultazione>nomenclature taric - indice taric>nomenclature taric - visualizza	
Elenco Nomenclature TARIC	
Criteri	
Codice	Descrizione
1510	Altri oli e loro frazioni, ottenuti esclusivamente dalle olive, anche raffinati, ma non modificati chimicamente e miscele di tali oli o frazioni con gli oli o le frazioni della voce 1509
1510 0010 00	- Oli greggi
1510 0090 00	- altri

Figura 3: TARIC: voce 1510

A livello nazionale il Regio Decreto Legge n. 1986 del 1936 ha rappresentato una pietra miliare nella classificazione degli oli di oliva, determinando il passaggio dalla semplice distinzione tra oli di semi, oli di sansa commestibili ed oli di oliva, alla più complessa discriminazione delle varie tipologie di oli di oliva sulla base dell'acidità percentuale. E' possibile constatare che il termine "vergine" compare per la prima volta nella denominazione di una classe commerciale di oli di oliva, mentre il termine "extra vergine" è stato introdotto con la successiva classificazione ad opera della Legge 1407 del 1960.

Anche a livello europeo sono stati emanati numerosi regolamenti, a partire dal Reg. CEE 136/1966 che attuava l'Organizzazione Comune dei Mercati (OCM) nel settore dei grassi, fino a giungere al Reg. CEE 2568/91, che ha rappresentato una decisa innovazione rispetto ai Regolamenti precedenti. Tale Regolamento aveva lo scopo principale di riorganizzare la normativa comunitaria in materia di oli d'oliva, oltre a uniformare le diverse metodiche analitiche riportandole in un unico testo di legge. Il regolamento ha introdotto l'obbligatorietà dell'analisi sensoriale ai fini della commercializzazione degli oli d'oliva vergini; vengono pertanto disciplinate non solo le caratteristiche merceologiche degli oli di oliva e di sansa di oliva, ma anche i metodi di analisi da utilizzare per stabilire la conformità di un olio di oliva ai requisiti previsti per ciascuna categoria merceologica. Anche le note complementari del capitolo 15 della TARIC

rimandano al suddetto Regolamento per la determinazione della caratteristiche degli oli di oliva (Caponio et al. 2012).

Il campo applicativo dei controlli sugli di oliva è in continua evoluzione; per tale effetto, il Reg. CEE 2568/91 ha subito continue modificazioni che hanno riguardato vari aspetti: dall'inserimento di nuovi parametri analitici, alla revisione dei relativi metodi di analisi e/o dei valori limite associati in corrispondenza delle diverse categorie merceologiche, ecc.. In particolare, il Regolamento CE n. 1989/2003 ha nuovamente modificato la classificazione degli oli di oliva, eliminando la categoria commerciale dell'*olio di oliva vergine corrente*. Con lo stesso Regolamento è stato introdotto lo schema di campionamento per gli oli d'oliva confezionati e lo schema decisionale per la verifica della conformità di un campione di olio d'oliva alla categoria dichiarata (Caponio et al. 2012).

Il Reg. CEE 2568/91 e ss.mm. individua otto categorie merceologiche entro le quali può essere classificato un olio di oliva. Gli oli ottenuti dalla spremitura diretta delle olive possono rientrare nelle categorie *extra vergine* (categoria 1), *vergine* (categoria 2) o *lampante* (categoria 3). Gli oli di oliva vergine ed extra vergine (che possiede caratteristiche qualitative superiori) sono destinati ad uso alimentare, a differenza dell'olio di oliva lampante (che, tra le altre caratteristiche, presenta un'acidità > 2% m/m, valutata secondo il metodo descritto all'allegato II del Regolamento), che viene sottoposto al processo di raffinazione, con l'obiettivo principale di neutralizzarne l'acidità. Gli oli sottoposti ad un processo di raffinazione chimica rientrano nelle categorie *olio di oliva raffinato* (categoria 4), oppure *olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini* (categoria 5, ottenuta quindi miscelando oli della categoria 4 con oli della categoria 1 o 2). Gli oli ottenuti per estrazione con solvente possono essere invece *olio di sansa di oliva greggio* (categoria 6), *olio di sansa di oliva raffinato* (categoria 7, ottenuto sottoponendo a raffinazione l'olio di sansa di oliva greggio) oppure *olio di sansa di oliva* (categoria 8, composto da una miscela di olio di sansa di oliva raffinato e oli vergini o extra vergini).

Raffrontando la classifica merceologica degli oli di oliva, in base al Reg. CEE 2568/91 e ss.mm., con il codice di nomenclatura combinata, si osserva che:

1. gli oli extra vergini e vergini (categorie 1 e 2 del Reg. CEE 2568/91) rientrano entrambi nel codice 1509 1090; in altre parole la tariffa

doganale, a differenza del Reg. CEE 2568/91 e ss.mm., non discrimina tra oli vergini e oli extra vergini;

2. l'olio di oliva lampante, categoria 3, viene classificato al codice 1509 1010;
3. l'olio di oliva raffinato (categoria 4) e l'olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e di oli di oliva vergini (categoria 5) sono classificabili entrambi al codice 1509 9000;
4. l'olio di sansa di oliva greggio (categoria 6) viene classificato al codice 1510 0010;
5. l'olio di sansa di oliva raffinato (categoria 7) e l'olio di sansa di oliva (composto da una miscela di olio di sansa di oliva raffinato e oli vergini o extra vergini categoria 8) sono entrambi classificati al codice 1510 0090.

Si deduce pertanto che le voci della TARIC non discriminano completamente le otto categorie merceologiche previste dal Regolamento, risultando alcune di esse accorpate in un unico codice tariffario.

L'appartenenza di un campione di olio di oliva a una di queste categorie merceologiche viene stabilita verificando che determinati parametri chimici (e talvolta organolettici) rientrino nei limiti fissati dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm. per quella determinata categoria merceologica; ciò mediante l'uso, come si è già detto, dei metodi di analisi allegati allo stesso Regolamento.

Le tipologie di analisi associate al controllo degli oli di oliva possono essere suddivise in due gruppi, a seconda che vengano verificati criteri di *qualità* o di *purezza* degli oli. I criteri di qualità di un olio possono essere considerati un indice di quanto le caratteristiche chimiche e organolettiche dell'olio siano conformi ai requisiti previsti dalla legislazione europea per la categoria merceologica di appartenenza. I parametri chimici associati alla qualità di un olio sono l'acidità (acidi grassi liberi), il numero di perossidi, i parametri spettrofotometrici nell'ultravioletto e la valutazione organolettica.

I criteri di purezza consentono invece di valutare l'aggiunta fraudolenta di differenti tipologie di oli rispetto a quanto dichiarato. In particolare l'analisi degli stigmastadieni e degli isomeri trans degli acidi grassi consentono la rivelazione dell'aggiunta di oli raffinati (sia di oliva che di semi) ad oli vergini; le determinazioni delle cere e dell'eritrodiole e uvaolo permettono di evidenziare

l'aggiunta di oli di sansa; l'aggiunta di oli di semi può essere invece rivelata mediante l'analisi di acidi grassi, steroli e Δ ECN42, mentre la presenza di olio derivante da esterificazione chimica può determinarsi attraverso l'analisi del 2-gliceril monopalmitato. Si segnala infine il metodo di rilevazione della presenza di oli estranei negli oli di oliva, introdotto con il Reg. UE 1348/2013.

Se negli anni 1980 e ancora prima le frodi più diffuse riguardavano la miscela di oli vergini con oli di sansa, di semi, oppure riesterificazioni, deacidificazioni, ed altro, oggi uno dei principali problemi è rappresentato dalla deodorazione. Si tratta di un trattamento di tipo fisico che, usando basse pressioni e alte temperature, “strippa” via i cattivi odori dell'olio. È un trattamento fraudolento che altera comunque la qualità dell'olio. Si può considerare al riguardo che il Reg. CE 1234/2007 (All.XVI) riporta la seguente definizione di oli di oliva vergini: “Gli oli ottenuti dal frutto dell'olivo soltanto mediante processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni che non causano alterazioni dell'olio, e che non hanno subito alcun trattamento diverso dal lavaggio, dalla decantazione, dalla centrifugazione e dalla filtrazione, esclusi gli oli ottenuti mediante solvente o con coadiuvanti ad azione chimica o biochimica, o con processi di riesterificazione e qualsiasi miscela con oli di altra natura”.

Il trattamento della deodorazione viene attualmente rivelato con l'analisi degli alchil esteri, parametro introdotto dal Reg. UE 61/2011, che ha modificato il Reg. CEE 2568/91.

Tale parametro costituisce un essenziale indicatore della qualità per gli oli di oliva extra vergini, in quanto permette sia di individuare false miscele di oli extra vergini di oliva e di oli di bassa qualità, sia di capire se si tratti di oli vergini, lampanti o deodorati.

1.1.3. Il Consiglio Oleicolo Internazionale (COI)

Il Consiglio oleicolo internazionale, creato nel 1959 sotto il patrocinio delle Nazioni Unite, è l'unica organizzazione intergovernativa mondiale nel settore dell'olio di oliva e delle olive da tavola. Il Consiglio ha sede a Madrid.

Il COI si adopera a favore di un'olivicultura sostenibile e responsabile e costituisce un forum di confronto a livello mondiale che riunisce i produttori, i

consumatori e gli operatori del settore dell'olio di oliva e delle olive da tavola. Annovera tra i suoi membri anche l'Unione Europea.

La vita del COI è legata alla formulazione dell'Accordo Internazionale sull'Olio d'Oliva, approvato per la prima volta nel 1955 sotto gli auspici delle Nazioni Unite.

Questo primo accordo multilaterale è stato il frutto di un'ampia concertazione e di sforzi convergenti, istituendo le basi per una cooperazione internazionale rinnovabile in modo costante e permanente. Il primo Accordo vide la partecipazione congiunta della Federazione Internazionale di Olivicoltura (FIO), dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Agricoltura e l'Alimentazione (FAO), nonché del Consiglio Economico e Sociale delle Nazioni Unite. Al primo Accordo seguirono altri tre (1963, 1979 e 1986), rinnovati e/o rinegoziati con le relative denominazioni, fino alla redazione dell'Accordo Internazionale del 2005 sull'Olio d'Oliva e le Olive da Tavola, attualmente in vigore sino al 2014 (Olivae/No 113- 2010).

Per raggiungere i suoi obiettivi, il COI:

- 1 favorisce la cooperazione tecnica internazionale attraverso progetti di ricerca e sviluppo, attività di formazione e trasferimenti di tecnologia;
- 2 favorisce la crescita del commercio internazionale di olio di oliva e olive da tavola, fissa e aggiorna le norme commerciali, si adopera per il miglioramento della qualità;
- 3 lavora per una maggiore integrazione della dimensione ambientale nelle attività del settore olivicolo/oleario;
- 4 promuove il consumo mondiale di olio d'oliva e olive da tavola mediante campagne innovative e programmi specifici;
- 5 pubblica statistiche e informazioni chiare e puntuali sul mercato mondiale dell'olio di oliva e delle olive da tavola;
- 6 riunisce periodicamente i rappresentanti dei governi, che riflettono sui problemi del settore e sulle priorità di azione del COI;
- 7 collabora strettamente con il settore privato (sitografia rif. [2]).

Il COI ha svolto e continua tuttora a svolgere un ruolo fondamentale per la definizione dei metodi di analisi associati all'olio di oliva e successivamente introdotti nella legislazione europea. Per citare un esempio, si consideri l'analisi

sensoriale dell'olio vergine di oliva. Nei primi anni '80 il COI si interrogò sulla possibilità di mettere a punto un metodo che permettesse la valutazione delle caratteristiche organolettiche con approccio "scientifico" ed in linea con gli sviluppi nel campo della standardizzazione dell'analisi sensoriale e in particolare dei progressi compiuti in sede ISO. Fin dal 1982 il Consiglio ha dunque collaborato con istituti e laboratori dei Paesi membri (hanno partecipato esperti spagnoli, francesi, greci, italiani, portoghesi e turchi) alla messa a punto di un metodo per la valutazione organolettica, che è stato poi adottato dal COI nel 1987. Il suddetto metodo è stato quindi recepito dalla legislazione europea nel 1991, nel Reg. CEE n. 2568 (sitografia rif. [3]; *Olivae/No. 117-2012*).

Il COI promuove dunque sperimentazioni per la messa a punto di nuovi metodi di analisi, per le loro revisioni e il riesame dei valori limite, avvalendosi della collaborazione fornita dai numerosi esperti tecnici e istituti specializzati appartenenti ai Paesi membri. Tali metodi di analisi entrano poi a far parte delle regolamentazioni nazionali. Tra gli esempi più attuali figurano la determinazione degli alchilesteri, introdotta nell'UE con il Reg. UE 61/2011, nonché tutte le modifiche recate dal recentissimo Reg. UE 1348/2013, che verranno esaminate nel paragrafo 1.1.4.

1.1.4. Sviluppi della regolamentazione dell'Unione europea e nazionale nel settore degli oli di oliva

Storicamente, l'introduzione di nuovi parametri chimici nel campo dei controlli alimentari viene accompagnata da provvedimenti successivi miranti a creare delle condizioni via via più restrittive (ad esempio restringendo il campo di conformità alla categoria merceologica); ciò al fine di limitare il rischio di frodi, ma anche in seguito al consolidarsi della conoscenza della variabilità del parametro e del metodo analitico applicato. Tale destino segna anche il parametro degli alchilesteri, il cui valore limite per l'olio extra vergine è stato recentemente revisionato sia in ambito COI che europeo. Tale valore limite era stato inizialmente espresso come somma di metilesteri (la cui presenza è legata all'azione di un enzima nell'ambito del normale processo di lavorazione delle olive e non costituisce un indizio di cattiva qualità dell'olio) ed etilesteri (il cui elevato valore è indice di fermentazione e cattiva conservazione delle olive).

Per gli oli extra vergine di oliva il Reg. UE 61/2011 aveva previsto un valore limite di alchilesteri pari a 75 mg/kg, stabilendo, alternativamente, che il suddetto limite potesse essere compreso tra i valori di 75 e 150 mg/kg qualora il rapporto tra etilesteri e metilesteri fosse $\leq 1,5$.

Il Reg. UE 1348/2013, che modifica il Reg. CEE 2568/1991 e si applica a decorrere dal 1° marzo 2014, prevede, tra l'altro, una graduale rivisitazione del valore limite degli alchilesteri per l'olio extra vergine di oliva. Viene considerato soltanto il parametro degli etilesteri (anziché la somma di metilesteri ed etilesteri) il cui valore limite è portato a 30 mg/kg, con decorrenza dalla raccolta del 2015 (al fine di consentire un graduale adeguamento si applica un limite di 40 mg/kg per l'annata agricola 2013-2014, e per l'annata 2014-2015 un limite pari a 35 mg/kg).

Il Reg. UE 1348/2013 ha apportato altre significative novità nel campo del controllo degli oli di oliva, revisionando in senso restrittivo altri parametri chimici, quali le cere, gli stigmastadieni e l'acido miristico. Sono stati modificati quindi alcuni schemi decisionali che servono a verificare se un campione di olio di oliva è conforme alla categoria dichiarata. Sono stati elaborati nuovi schemi decisionali relativi al campesterolo e al delta-7-stigmastenolo corredandoli di parametri più restrittivi al fine di agevolare gli scambi e garantire l'autenticità degli oli, nell'interesse della protezione dei consumatori. Sono stati inoltre revisionati alcuni metodi di analisi, quali la valutazione organolettica, mentre i metodi per la determinazione degli steroli e dei diacoli triterpenici sono stati accorpati in un unico metodo di analisi. E' stato rivisto il procedimento di campionamento e si è infine inserito un metodo per la rilevazione della presenza di oli vegetali estranei negli oli di oliva; tale metodo, tecnicamente assimilabile all'analisi dei triacilgliceroli con ECN 42, prevede l'adozione di una procedura di calcolo modificata.

Per quanto attiene alla legislazione nazionale, si rileva altresì che è stato recentemente adottato un provvedimento volto a tutelare l'olio extra vergine *made in Italy*, il cui mercato viene fortemente danneggiato da prodotti importati dall'estero a basso costo e rivenduti come nazionali. Particolare attenzione è stata rivolta agli alchilesteri.

La Legge 134/2012 (di conversione del D.L. 83/2012) ha portato da 75 mg/kg a 30 mg/kg il valore limite degli alchilesteri, limitatamente agli oli extra vergini di oliva etichettati con la dicitura “Italia” o “italiano”. A fronte del superamento di tale valore si prevede l’avvio automatico di un piano straordinario di sorveglianza dell’impresa da parte delle Autorità nazionali competenti per i controlli. In tale legge viene inoltre riaffermata l’obbligatorietà della valutazione organolettica e il suo valore probatorio nei procedimenti giurisdizionali, elementi, peraltro, che i giudici nazionali già devono applicare, in conformità alla vigente normativa europea.

I provvedimenti esaminati sono stati inseriti nell’art. 43, comma 1 bis e 1 ter, aggiunti dalla Legge 134/2012 al D.L. 83/2012. Successivamente è stata emanata la Legge 9/2013 : “Norme sulla qualità e la trasparenza della filiera degli oli di oliva vergini” (detta anche “Legge salva olio”), contenente una serie di disposizioni volte alla tutela dell’olio di qualità e dei consumatori, di cui si parlerà più ampiamente nel paragrafo 1.2.3.3.. Alla luce delle considerazioni appena effettuate, si rileva che il parametro degli alchilesteri è stato oggetto di una notevole attenzione sia da parte del legislatore europeo che nazionale.

Altri parametri chimici, quali le *pirofeofitine* (derivati dalla clorofilla) e i *diacilgliceroli* sono stati studiati, analogamente agli alchilesteri, come marker per la deodorazione.

Le pirofeofitine si formano per degradazione dei pigmenti clorofilliani; sono state rivelate, ad esempio, in oli sottoposti al processo di deodorazione (Gandul-Rojas et al., 1999). Tuttavia anche durante lo stoccaggio di oli vergini il profilo dei pigmenti clorofilliani subisce delle variazioni (Roca et al., 2003) che comportano, tra l’altro, anche la formazione di pirofeofitine (Gallardo-Guerrero et al., 2004).

Per tali ragioni l’analisi delle pirofeofitine non trova unanime accettazione da parte della comunità scientifica di riferimento come marker per la deodorazione, sebbene ne sia comunque riconosciuta la validità come parametro integrativo di qualità.

Per quanto riguarda i diacilgliceroli, gli oli extravergini di oliva a bassa acidità contengono quasi esclusivamente gli 1,2-diacilgliceroli, mentre gli 1,3- sono presenti solo in tracce. Quest’ultimi si formano e aumentano nell’olio all’aumentare degli acidi grassi liberi. Gli acidi grassi liberi possono aumentare nel

tempo (inacidimento) oppure perché l'olio ha subito un trattamento (stress ossidativo, generalmente già a temperature di 35-40°C). L'inacidimento è un fenomeno naturale, che prende il via dal momento del distacco del frutto dalla pianta e continua finché nell'olio sono presenti l'enzima lipasi e l'acqua (sitografia rif. [4]; Cognissani et al., 2001; Cognissani et al., 2007; Vichi et al., 2012).

In buona sostanza si può affermare che le pirofeofitine e i diacilgliceroli si formano a seguito di ossidazione. Tale reazione può essere causata nell'olio da tre fattori: temperatura, luce ed ossigeno. Con le analisi dei diacilgliceroli e delle pirofeofitine non è però possibile discriminare tra la loro formazione derivante da innalzamenti termici, correlabili a talune pratiche di adulterazione, oppure per effetto dell'esposizione alla luce o all'aria. Oli extravergini vecchi hanno valori di pirofeofitine e diacilgliceroli elevati semplicemente perché ormai ossidati, senza che abbiano subito alcuna manipolazione. E' rilevante inoltre considerare che il valore di tali parametri, associabile alla qualità dell'olio, può essere sensibilmente ridotto miscelando oli vecchi con oli nuovi. Inoltre, le pirofeofitine, essendo derivati della clorofilla, possono essere facilmente eliminate mediante l'utilizzo di terre decoloranti durante il processo di filtrazione.

Un ulteriore parametro considerato è la valutazione della frazione dei *polifenoli*, per la quale il COI ha standardizzato un metodo HPLC: non esiste tuttavia un metodo ufficiale. I polifenoli non costituiscono un parametro di legge, in altri termini la quantità di tale parametro non costituisce un requisito per la classifica merceologica di un olio. Nei disciplinari di produzione di oli extra vergini DOP, peraltro, è indicato un contenuto minimo in composti fenolici.

Sembra comunque improponibile fissare un limite per questo parametro, considerato l'ampio range di variazione che si registra anche solo all'interno del nostro Paese (Caponio et al. 2012; Cinquanta et al. 1997).

Un'ulteriore richiesta dei consumatori e dei produttori riguarda, infine, la possibilità di certificazione dell'*origine*, ad oggi basata su aspetti meramente documentali o su valutazioni di tipo chemiometrico non validate da alcun Ente.

La questione non è di poco conto e non appare di semplicissima risoluzione; in letteratura moltissimi autori hanno applicato queste tecniche a varie classi di composti. L'estrema variabilità in composizione degli oli di oliva e la crescente diffusione dell'ulivo in nuove zone climatiche non agevola questo approccio. Il

problema è stato affrontato anche applicando tecniche differenti, quali la risonanza magnetica nucleare e lo studio degli isotopi stabili (Camini et al. 2010; Caponio et al. 2012; Dais et al. 2013; D'Imperio et al., 2007; Jung et al. 2006; Mannina et al, 2010; Royer et al., 1999).

1.1.5. Il Codex Alimentarius

La Codex Alimentarius Commission (Codex), istituita nel 1963, è il principale organismo mondiale responsabile dell'attuazione del programma congiunto FAO/OMS "Food Standards Programme". Gli obiettivi principali della Commissione sono essenzialmente: proteggere la salute dei consumatori, garantire pratiche corrette nel commercio alimentare, facilitare lo scambio internazionale degli alimenti e promuovere il coordinamento di tutto il lavoro di organizzazioni governative e non governative internazionali in materia di normativa alimentare (sitografia rif. [5]).

Ai lavori del Codex partecipano esperti di diverse discipline scientifiche dell'alimentazione, tra cui autorità di controllo del cibo, esperti scientifici e tecnici alimentari, rappresentanti di associazioni dei consumatori, dei produttori, dell'industria e del commercio. Gli standard elaborati dal Codex Alimentarius contengono regole che vanno dalla produzione degli alimenti, all'etichettatura, alle regolamentazioni sui livelli di sostanze chimiche permesse (inquinanti, pesticidi, tossine, additivi, ecc.), sul trasporto e la tracciatura, nonché alle norme igieniche. Il Codex Alimentarius conta circa 25 Comitati e Task Force, tra cui il *Committee on Fats and Oils*, nel cui ambito sono stati emessi i seguenti standard:

- Code of Hygienic Practice for the Storage and Transport of Edible Oils and Fats in Bulk (CAC/RCP 36-1987);
- Standard for Edible Fats and Oils not Covered by Individual Standards (CODEX STAN 19-1981);
- Standard for Named Vegetable Oils (CODEX STAN 210-1999);
- Standard for Named Animal Fats (CODEX STAN 211-1999);
- Standard for Fat Spreads and Blended Spreads (CODEX STAN 256-2007);
- Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils (CODEX STAN 33-1981):
le disposizioni dettate in questo standard sono coerenti con i limiti imposti

dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm., sebbene non presentino tutti gli aggiornamenti ivi contenuti. Sono presenti inoltre disposizioni relative alla presenza di additivi, contaminanti, all'igiene e all'etichettatura. Per quanto attiene ai metodi di analisi sono citati, quali riferimenti, i metodi COI, ISO e AOCS.

1.2. Etichettatura degli oli di oliva, fenomeno della contraffazione e “made in”.

1.2.1. Etichettatura degli alimenti: evoluzione normativa

L’etichettatura rappresenta un fondamentale strumento per la scelta e la selezione dei beni da parte del consumatore e, nel campo degli alimenti, ha altresì la finalità di fornire informazioni relative alla sicurezza del prodotto (Toti, 2011).

L’etichettatura dei prodotti alimentari costituisce un aspetto particolarmente problematico nell’ambito della legislazione alimentare in quanto in essa si manifestano diverse e talvolta opposte esigenze. Tra queste si possono ricordare la protezione dei consumatori, la difesa del segreto industriale, la tutela della libera circolazione nel mercato UE delle merci, nonché la possibilità di gestire le emergenze conseguenti a crisi alimentari prevedendo il ritiro mirato dal mercato degli alimenti rischiosi o potenzialmente rischiosi per la salute o isolando il punto della filiera che ha prodotto l’alimento a rischio per evitare che il pericolo si ripeta e si diffonda (Unioncamere Piemonte, 2012).

Il settore è stato per la prima volta regolamentato in ambito europeo con la Direttiva 79/112/CEE sul riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l’etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità. Tale prima direttiva conteneva importanti definizioni, quali quella di etichettatura, del termine minimo di conservazione, oltre a un primo elenco di indicazioni che dovevano obbligatoriamente comparire in etichetta. Essa è stata più volte modificata, ad esempio con la Direttiva 89/395/CEE.

Nel quadro storico della regolamentazione europea sull’etichettatura si può inoltre citare la Direttiva 89/396/CEE relativa alle indicazioni che consentono di identificare la partita alla quale appartiene una derrata alimentare. In questa Direttiva viene introdotta la lettera “L” per indicare il lotto di riferimento (tale direttiva è stata abrogata dalla direttiva 2011/91/UE).

Per quanto attiene alla etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari, la Direttiva 90/496/CEE prevedeva disposizioni risalenti per la maggior parte al

1990: essa stabiliva norme sul contenuto e sulla presentazione delle informazioni relative alle proprietà nutritive negli alimenti preimballati (tale direttiva prevedeva l'inserimento, a titolo volontario, dell'etichettatura nutrizionale, a meno che non figurassero informazioni nutrizionali nell'etichettatura dell'alimento).

In ambito nazionale è stato emanato il Decreto Legislativo 109/92 in attuazione delle Direttive 89/395/CEE e 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari. Tale Decreto Legislativo modifica anche la Legge n. 35 del 1968.

Nel 2003, la Direttiva 79/112/CEE è stata abrogata dalla Direttiva 2000/13/CEE. Il legislatore italiano ha attuato tale ultima Direttiva provvedendo a modificare il D.Lgs. 109/1992 che, ancora oggi, continua ad essere il riferimento nazionale contenente la disciplina per etichettare i prodotti alimentari.

La direttiva 2000/13 CE ha rappresentato, fino a dicembre 2011, la normativa europea di riferimento. Tale direttiva si applicava ai prodotti alimentari preimballati destinati ad essere consegnati in detto stato al consumatore finale, ovvero ai ristoranti, agli ospedali o ad altre collettività simili. La direttiva non riguardava i prodotti destinati ad essere esportati al di fuori dell'Unione europea (UE). L'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari non possono essere tali da indurre l'acquirente in errore sulle caratteristiche o sugli effetti di tali prodotti alimentari, o attribuire ad un prodotto alimentare (ad eccezione delle acque minerali naturali e dei prodotti alimentari destinati ad un'alimentazione particolare per i quali esistono disposizioni europee specifiche) delle proprietà di prevenzione, di trattamento e di cura di una malattia umana.

Dopo un complesso iter in cui si sono susseguite emanazioni ed abrogazioni di normative, il 25 ottobre 2011 il Parlamento europeo ed il Consiglio hanno adottato il Regolamento UE 1169 “relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori”.

Negli ultimi decenni le abitudini alimentari hanno subito considerevoli modifiche dovute alla crescente introduzione di prodotti trasformati che hanno in parte sostituito gli alimenti semplici. Di conseguenza l'industria alimentare ha assunto una funzione molto rilevante nell'economia dell'Unione Europea e rappresenta un patrimonio da tutelare, ma non sempre gli interessi dell'industria alimentare sono

sufficientemente cautelativi della tutela della salute dei consumatori. Il Regolamento UE 1169/2011 rappresenta pertanto un grande passo in avanti per migliorare le condizioni di salute dei cittadini dell'Unione Europea ed è determinante tanto per la sicurezza dei consumatori quanto per dare maggiore trasparenza. In tale ottica si può affermare che viene meglio tutelata anche la qualità dei prodotti italiani contro la pratica scorretta del c.d. "italian sounding" (si tratta, cioè, di prodotti che utilizzano nomi italiani per ingannare il consumatore sulla provenienza e la qualità stessa di un alimento).

Con questo Regolamento, il legislatore dell'Unione europea, per rafforzare la certezza giuridica e per garantire un'applicazione razionale e coerente della normativa, ha ritenuto opportuno abrogare, in primis, le Direttive 2000/13/CE e 90/496/CEE sostituendole con un unico Regolamento ed aggiornando le disposizioni in esse contenute. Il legislatore ha abrogato, inoltre, altri atti orizzontali: la Direttiva 87/250/CEE (relativa all'indicazione del titolo alcolometrico volumico nell'etichettatura di bevande alcoliche destinate al consumatore finale), la Direttiva 1999/10/CE (che introduce deroghe alle disposizioni di cui all'art. 7 della Direttiva 79/112/CEE per quanto riguarda l'etichettatura dei prodotti alimentari), la Direttiva 2002/67/CE (relativa all'etichettatura dei generi alimentari contenenti chinino e dei prodotti alimentari contenenti caffeina), il Regolamento CE 608/2004 (relativo all'etichettatura di prodotti e di ingredienti alimentari addizionati di fitosteroli, esteri di fitosterolo, fitostanoli e/o esteri di fitostanolo) e la Direttiva 2008/5/CE (relativa alla specificazione sull'etichetta di alcuni prodotti alimentari e di altre indicazioni obbligatorie oltre a quelle previste dalla Direttiva 2000/13/CE). Le abrogazioni decorrono dal 13 dicembre 2014. È stata predisposta, altresì, la modifica dei Regolamenti CE 1924/2006 e 1925/2006 (relativi rispettivamente alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti alimentari e all'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti).

Il Regolamento UE 1169/2011 ha introdotto quindi diverse novità che riguardano, tra l'altro, la leggibilità dell'etichettatura (è previsto un corpo minimo per i caratteri utilizzati in etichetta), nonché l'obbligatorietà dell'indicazione della dichiarazione nutrizionale e della presenza di ingredienti allergenici. (Unioncamere Piemonte, 2012).

L'assoluta trasparenza della provenienza dei cibi e delle informazioni nutrizionali prevista dal Regolamento rappresenta una importante chiave di tutela della salute e i punti rilevanti del Regolamento possono essere così sintetizzati:

- le etichette devono contenere informazioni precise sul valore nutrizionale degli alimenti, ma allo stesso tempo debbono essere attivate adeguate campagne di informazione su come interpretarle per evitare errori dietetici;
- devono indicare in modo trasparente la presenza negli alimenti di eventuali sostanze potenzialmente pericolose come la caffeina, l'alcol, il chinino, i fitosteroli e le sostanze dotate di potere allergenico;
- viene previsto che nell'elenco degli ingredienti sia segnalata la possibile presenza di nano materiali;
- le etichette devono essere facilmente leggibili e presentare una dimensione minima al fine di facilitarne la leggibilità e l'individuazione da parte dell'acquirente (minimo 1,2 mm o 0,9 mm per le confezioni inferiori a 80 cm²);
- per quanto riguarda l'origine degli alimenti, è obbligatoria l'indicazione per le carni bovine ed i prodotti derivati, mentre per le altre carni l'obbligatorietà si limita ai prodotti freschi. Per quanto riguarda gli altri alimenti le istituzioni europee dovranno prendere delle decisioni in tempi successivi;
- rimane l'obbligo di indicare la data di scadenza o di conservazione dell'alimento, con l'introduzione della prescrizione di indicare la data di scadenza anche su ogni singola porzione confezionata; con la precedente normativa l'obbligo era previsto solo sulla confezione madre (Toti, 2011).

In realtà il Regolamento in esame ha concesso una certa discrezionalità agli Stati membri: il Capo VI, art. 38 "Disposizioni nazionali" prevede che "gli Stati membri possono adottare disposizioni nazionali concernenti materie non specificamente armonizzate dal presente regolamento purché non vietino, ostacolino o limitino la libera circolazione delle merci conformi al presente regolamento". Inoltre, qualora ricorrano motivazioni quali "a) protezione della salute pubblica; b) protezione dei consumatori; c) prevenzione delle frodi; d)

protezione dei diritti di proprietà industriale e commerciale, delle indicazioni di provenienza, delle denominazioni d'origine controllata e repressione della concorrenza sleale”, gli Stati membri possono adottare disposizioni richiedenti ulteriori indicazioni obbligatorie per particolari tipi o categorie di alimenti.

Anche l'art. 18 dell'abrogata Direttiva 2000/13/CEE prevedeva, in verità, un'analogia disposizione.

Le disposizioni previste dal Regolamento sono entrate in vigore il ventesimo giorno successivo alla sua pubblicazione (avvenuta il 22 novembre 2011), ma i soggetti preposti all'etichettatura dei prodotti alimentari possono usufruire di un periodo transitorio di tre anni per adeguarsi. Fa eccezione la novità riguardante l'indicazione della dichiarazione nutrizionale obbligatoria, la cui cogenza è prevista entro un periodo di cinque anni dall'entrata in vigore del Regolamento (Unioncamere Piemonte, 2012).

1.2.2. Normativa nazionale ed europea a confronto: il D.Lgs. 109/1992 e il Reg. UE 1169/2011

Come si è già avuto modo di rilevare, il D.Lgs. 109/1992 costituisce la normativa di riferimento nazionale nel campo dell'etichettatura dei prodotti alimentari, in attuazione delle direttive europee. Un quadro completo della etichettatura dei prodotti alimentari non può tuttavia prescindere da una lettura congiunta del testo del Decreto con il Reg. UE 1169/2011. L'analisi comparata delle prescrizioni previste dalle due norme verrà limitata a quegli aspetti dell'etichettatura che hanno rilievo nel campo degli oli vegetali.

Il D.Lgs. 109/1992 fornisce alcune importanti definizioni. L'etichettatura è considerata come “l'insieme delle menzioni, delle indicazioni, dei marchi di fabbrica o di commercio, delle immagini o dei simboli che si riferiscono al prodotto alimentare e che figurano direttamente sull'imballaggio o su un'etichetta appostavi o sul dispositivo di chiusura o su cartelli, anelli o fascette legati al prodotto medesimo, o, in mancanza di conformità a quanto stabilito negli artt. 14, 16 e 17, sui documenti di accompagnamento del prodotto alimentare” (art. 1, c. 2, lett. a).

Il Reg. UE 1169/2011 definisce analogamente l'etichettatura come “qualunque menzione, indicazione, marchio di fabbrica o commerciale, immagine o simbolo

che si riferisce a un alimento e che figura su qualunque imballaggio, documento, avviso, etichetta, nastro o fascetta che accompagna o si riferisce a tale alimento”.

Il prodotto alimentare può essere *preconfezionato*, *preincartato* o *sfuso*.

Le indicazioni portate dal Regolamento riguardano esclusivamente i prodotti alimentari preconfezionati (preimballati, per utilizzare la dizione utilizzata dal legislatore europeo). L’art. 44, infatti, stabilisce che, qualora gli alimenti siano offerti in vendita al consumatore finale o alle collettività senza preimballaggio oppure siano imballati sui luoghi di vendita su richiesta del consumatore o preimballati per la vendita diretta, spetta agli Stati membri definire quali indicazioni debbano essere obbligatorie. Fa eccezione la disposizione relativa alla “fornitura delle indicazioni di cui all’art. 9, par. 1, lett. c” che è comunque obbligatoria (indicazione relativa alla presenza di allergeni negli ingredienti o coadiuvanti tecnologici).

Il prodotto alimentare preconfezionato è l’unità di vendita destinata ad essere presentata come tale al consumatore e alle collettività. Essa “è costituita da un prodotto alimentare e dall’imballaggio in cui è stato immesso prima di essere posto in vendita, avvolta interamente o in parte da tale imballaggio, ma comunque in modo che il contenuto non possa essere modificato senza che la confezione sia aperta o alterata” (D.lgs. 109/1992 art. 1, c. 2, lett. b). È il caso, ad esempio, di un alimento venduto in porzioni preconfezionate dal produttore.

Il Regolamento europeo, art. 1, par. 2, lett. e) fornisce la definizione di alimento preimballato che essenzialmente ricalca quella appena citata (i concetti di preconfezionato e di preimballato coincidono). Esso esplicita, inoltre, che la definizione di alimento preimballato non comprende gli alimenti imballati nei luoghi di vendita su richiesta del consumatore o preimballati per la vendita diretta.

Il prodotto alimentare preincartato è “l’unità di vendita costituita da un prodotto alimentare e dall’involucro nel quale è stato posto o avvolto negli esercizi di vendita” (D.lgs. 109/1992 art. 1, c. 2, lett. d). Si pensi, ad esempio, ad un alimento preincartato con pellicola protettiva presso il punto vendita per una commercializzazione immediata.

I prodotti sfusi, infine, sono “prodotti alimentari non preconfezionati o generalmente venduti previo frazionamento, anche se originariamente preconfezionati, i prodotti confezionati sui luoghi di vendita a richiesta

dell'acquirente e i prodotti preconfezionati ai fini della vendita immediata" (D.lgs. 109/1992 art. 16, c. 1).

Per consumatore si intende sia il consumatore finale sia "i ristoranti, gli ospedali, le mense ed altre collettività analoghe" (D.lgs. 109/1992 art. 1, c. 2, lett. e).

L'ambito di applicazione previsto dalla normativa italiana attualmente in vigore comprende l'etichettatura dei prodotti alimentari (sfusi, preincartati e preconfezionati) destinati alla vendita al consumatore nell'ambito del mercato nazionale nonché la loro presentazione e la relativa pubblicità. Sono esclusi dal campo di applicazione la somministrazione, i prodotti destinati ad essere commercializzati in altri Paesi e i prodotti venduti negli spazi internazionali degli aeroporti.

Il campo di applicazione del Regolamento è più ampio rispetto a quello indicato nella Direttiva 2000/13/CE. Esso, infatti, si estende:

- agli operatori del settore alimentare in tutte le fasi della catena alimentare quando le loro attività riguardino la fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori;
- a tutti gli alimenti destinati al consumatore finale, compresi quelli forniti dalle collettività e quelli destinati alla fornitura delle collettività (rientrano nell'ambito di applicazione, quindi, i pubblici esercizi, le mense, i catering);
- ai servizi di ristorazione forniti da imprese di trasporto quando il luogo di partenza si trovi nel territorio di Stati membri cui si applica il trattato.

L'obiettivo dell'attuale normativa italiana e di quella della UE è evidenziato, rispettivamente, nel D.Lgs. 109/1992 all'art. 2 ("Finalità dell'etichettatura dei prodotti alimentari") e nel Reg. UE 1169/2011 all'art. 7 ("Pratiche leali d'informazione"). Dalla loro lettura si può rilevare, in sintesi, l'attenzione posta dal legislatore affinché siano utilizzate solo informazioni sugli alimenti tali da non indurre in errore il consumatore. Per quanto riguarda il Regolamento, esso mira a definire in modo generale i principi, i requisiti e le modalità che disciplinano l'informazione sugli alimenti e, in particolare, la loro etichettatura. Obiettivo è la garanzia sia di un elevato livello di protezione dei consumatori in materia di informazioni sugli alimenti, tenendo conto delle differenze di percezione dei consumatori e delle loro esigenze in materia di informazione, sia del buon funzionamento del mercato interno.

1.2.2.1. Lingua ufficiale

Il D.lgs. 109/92 ha previsto che le indicazioni obbligatorie debbano essere riportate nella lingua italiana, anche se è consentita la presenza di più lingue. Tale disposizione è applicabile quando il prodotto finito sia immesso sul mercato per essere destinato al consumatore finale italiano. Se invece il prodotto non è destinato al consumatore finale, le indicazioni obbligatorie possono essere riportate nella sola lingua inglese o nella lingua del Paese di origine della merce.

1.2.2.2. Indicazioni obbligatorie

Il Regolamento fissa precisi requisiti linguistici per le informazioni obbligatorie sugli alimenti (art. 15): esse devono apparire in una lingua facilmente comprensibile ai consumatori degli Stati membri nei quali l'alimento è commercializzato.

Gli Stati membri, sul loro territorio, possono imporre che tali indicazioni siano fornite in una o più lingue ufficiali dell'Unione.

Un alimento prodotto in Italia, per essere commercializzato in un Paese extra-UE, deve seguire le disposizioni in vigore nel Paese di destinazione.

In relazione alle modalità di stesura delle indicazioni obbligatorie sulle etichette dei prodotti alimentari preconfezionati, l'art. 14, c. 1 del D.Lgs. 109/1992 stabilisce che "la denominazione di vendita, la quantità, il termine minimo di conservazione o la data di scadenza (nonché il titolo alcolometrico volumico effettivo) devono figurare nello stesso campo visivo". Questa disposizione ha l'obiettivo di comunicare immediatamente al consumatore le principali caratteristiche del prodotto.

Secondo il Regolamento, invece, dovranno comparire nello stesso campo visivo (art. 13, par. 5) la denominazione dell'alimento, la quantità netta dell'alimento (e, per le bevande che contengono più di 1,2 % di alcol in volume, il titolo alcolometrico volumico effettivo). Non si prevede, quindi, la presenza nello stesso campo visivo della data di scadenza o del termine minimo di conservazione.

D.Lgs. 109/1992	Reg. UE 1169/2011
La denominazione di vendita	La denominazione dell'alimento
L'elenco degli ingredienti	L'elenco degli ingredienti
/	Qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico elencato nell'allegato II o derivato da una sostanza o un prodotto elencato in detto allegato che provochi allergie o intolleranze usato nella fabbricazione o nella preparazione di un alimento e ancora presente nel prodotto finito, anche se in forma alterata
La quantità netta o nel caso di prodotti confezionati in quantità unitarie costanti, la quantità nominale	La quantità netta dell'alimento
Il termine minimo di conservazione o, nel caso di prodotti molto deperibili dal punto di vista microbiologico, la data di scadenza	Il termine minimo di conservazione o la data di scadenza
Il nome o la ragione sociale o il marchio depositato e la sede o del fabbricante o del confezionatore o di un venditore stabilito nell'UE	Il nome o la ragione sociale e l'indirizzo dell'operatore del settore alimentare di cui all'articolo 8, paragrafo 1
La sede dello stabilimento di produzione o di confezionamento	/
Il titolo alcolometrico volumico effettivo per le bevande aventi un contenuto alcolico superiore a 1,2% in volume	Per le bevande che contengono più di 1,2% di alcol in volume, il titolo alcolometrico volumico effettivo
Una dicitura che consenta di identificare il lotto di appartenenza del prodotto	/
Le modalità di conservazione e di utilizzazione qualora sia necessaria l'adozione di particolari accorgimenti in funzione della natura del prodotto	Le condizioni particolari di conservazione e/o le condizioni d'impiego
Le istruzioni per l'uso, ove necessario	Le istruzioni per l'uso, per i casi in cui la loro omissione renderebbe difficile un uso adeguato dell'alimento
Il luogo di origine o di provenienza, nel caso in cui l'omissione possa indurre in errore l'acquirente circa l'origine o la provenienza del prodotto	Il Paese d'origine o il luogo di provenienza ove previsto all'articolo 26
La quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti come previsto all'art. 8	La quantità di taluni ingredienti o categorie di ingredienti
/	Una dichiarazione nutrizionale

Tabella 1: raffronto tra le indicazioni obbligatorie per i prodotti alimentari confezionati previste dal D.lgs. 109/1992 e dal Reg. UE 1169/2011

Mentre il D.Lgs. in esame non fornisce la definizione di campo visivo, il Regolamento prevede non solo la definizione di campo visivo ma anche quella di campo visivo principale, inteso come il “campo visivo di un imballaggio più probabilmente esposto al primo sguardo del consumatore al momento dell’acquisto e che permette al consumatore di identificare immediatamente il carattere e la natura del prodotto ed, eventualmente, il suo marchio di fabbrica”.

In tabella 1 è riportato un raffronto tra le indicazioni obbligatorie per i prodotti alimentari preconfezionati previste, rispettivamente, dal D.lgs. 109/1992 e dal Reg. UE 1169/2011.

Dal confronto dei due elenchi si evince che, nel Regolamento, alcune informazioni:

- sono state indicate utilizzando pressoché la stessa terminologia del passato;
- sono scomparse (il lotto di produzione e la sede dello stabilimento); per quanto riguarda il lotto di produzione, tali informazioni sono disciplinate dalla Direttiva 2011/91/UE;
- sono state aggiunte (ad esempio, la dichiarazione nutrizionale).

La denominazione di vendita (art. 4 del D.lgs. 109/1992) è il nome con cui un prodotto è commercializzato: costituisce l’indicazione obbligatoria più importante e deve sempre essere presente.

1.2.2.3. Denominazione di vendita

La denominazione di vendita non deve essere confusa con la classificazione dei prodotti prevista dalla tariffa doganale, né con il marchio aziendale, né con la denominazione commerciale (che è facoltativa e serve unicamente a qualificare meglio il prodotto).

Per individuare la denominazione di vendita, il legislatore ha previsto una precisa gerarchia cui fare riferimento. In particolare, ha stabilito che essa sia scelta seguendo un triplice ordine di criteri:

- in primo luogo occorre verificare la presenza di una denominazione legale prevista in ambito UE;
- in mancanza, si deve utilizzare la denominazione legale prevista dall’ordinamento nazionale;

- in assenza delle precedenti disposizioni, si deve fare ricorso al nome consacrato da usi e da consuetudini o ad una descrizione del prodotto alimentare. Se necessario, tale spiegazione è integrata da “informazioni sulla sua utilizzazione, in modo da consentire all’acquirente di conoscere l’effettiva natura e di distinguerlo dai prodotti con i quali potrebbe essere confuso”.

Le denominazioni legali previste dall’ordinamento dell’Unione europea sono contenute sia in specifici regolamenti (nei quali sono stabilite le regole per la commercializzazione di tali prodotti) sia nelle norme nazionali di attuazione di direttive.

1.2.2.4. Il termine minimo di conservazione e la data di scadenza

Il D.lgs. 109/1992 disciplina il termine minimo di conservazione all’art. 10 e la data di scadenza all’art. 10 bis.

Il termine minimo di conservazione (TMC) è la data fino alla quale il prodotto alimentare conserva le sue proprietà specifiche in adeguate condizioni di conservazione. La sua determinazione compete al produttore o al confezionatore (per i prodotti importati spetta al primo venditore stabilito nell’Unione europea). Esso è apposto sotto la loro diretta responsabilità.

Ai fini degli scambi tra i Paesi UE, l’indicazione del TMC deve essere espressa nella lingua del Paese nel quale si vuole commercializzare il prodotto.

Il TMC deve essere indicato con la dicitura “da consumarsi preferibilmente entro” se la data evidenzia giorno, mese e anno, oppure “da consumarsi preferibilmente entro la fine” negli altri casi. Quest’ultima menzione è seguita dalla data (es.: “entro la fine di gennaio 2014”) oppure dall’indicazione del punto della confezione in cui essa figura (es.: “vedi bordo di chiusura”, “vedi sul tappo”, ecc.).

Il TMC è composto dall’indicazione in chiaro, e nell’ordine, del giorno, del mese e dell’anno; può essere espresso con l’indicazione del giorno e del mese per prodotti conservabili per meno di tre mesi, con l’indicazione del mese e dell’anno per prodotti conservabili per più di tre mesi e per meno di diciotto mesi e con la sola indicazione dell’anno per prodotti conservabili per più di diciotto mesi.

Il TMC è sostituito dalla data di scadenza nel caso di prodotti alimentari preconfezionati rapidamente deperibili dal punto di vista microbiologico i quali,

quindi, dopo breve tempo, possono costituire un pericolo per la salute del consumatore.

La data di scadenza deve essere indicata utilizzando la locuzione “da consumarsi entro” seguita dalla data stessa o dall’indicazione del punto della confezione dove figura.

Il Regolamento, analogamente alle disposizioni attualmente in vigore, stabilisce che il termine minimo di conservazione è sostituito dalla data di scadenza in caso di alimenti molto deperibili dal punto di vista microbiologico, cioè potenzialmente costituenti, dopo un breve periodo, un pericolo immediato per la salute umana.

Ove necessario, il TMC è completato da una descrizione delle modalità di conservazione che devono essere garantite per il mantenimento del prodotto per il periodo specificato.

La data di scadenza, invece, è sempre seguita dalla descrizione delle condizioni di conservazione da rispettare. La data di scadenza può sostituire il lotto (Unioncamere Piemonte, 2012).

1.2.3 Etichettatura nel campo degli oli di oliva

L’etichettatura obbligatoria nel campo degli oli di oliva è stata disciplinata, a livello europeo, dal Reg. CE 1019/2002, relativo alla commercializzazione dell’olio di oliva. Il Reg. CE 1019/2002 è stato modificato più volte e a più riprese, fino ad essere abrogato e sostituito dal vigente Reg. UE 29/2012, relativo alle norme di commercializzazione degli oli di oliva. Tale regolamento conferma di fatto tutte le impostazioni precedenti e le armonizza.

Vengono stabilite norme di commercializzazione specifiche per il commercio al dettaglio delle seguenti categorie di oli di oliva (che corrispondono quindi alle denominazioni di vendita):

- olio extra vergine di oliva;
- olio di oliva vergine;
- olio di oliva composto di oli di oliva raffinati e oli di oliva vergini;
- olio di sansa di oliva.

Essi sono presentati al consumatore finale preimballati in contenitori della capacità massima di 5 litri, provvisti di un sistema di chiusura che perde la propria integrità dopo il primo utilizzo. Per gli oli destinati al consumo in ristoranti,

ospedali, mense o altre collettività simili il regolamento, in coerenza con la precedente legislazione, consente agli Stati membri di prevedere una capacità massima di imballaggi superiore a 5 litri. Così, ai sensi del DM 10.11.2009, è attualmente consentito, nelle vendite alle suddette collettività, utilizzare imballaggi di capacità fino a 25 litri (Unioncamere, 2010). Si può citare al riguardo anche la Legge 35/1968 (contenente norme per il controllo della pubblicità e del commercio dell'olio di oliva e dell'olio di semi), la quale stabilisce che gli oli di oliva commestibili e gli oli di semi commestibili, destinati al consumatore, devono essere posti in vendita esclusivamente confezionati in recipienti ermeticamente chiusi, tranne quando venga trasferito olio di oliva dal frantoio al deposito del produttore e dal deposito di questi a quello del primo destinatario.

Tornando alle disposizioni dettate dal Reg. UE 29/2012, l'etichetta delle confezioni reca in caratteri chiari e indelebili, oltre alla denominazione (ma non necessariamente in prossimità di essa), l'informazione sulla categoria di olio:

a) per l'olio extra vergine di oliva:

«olio d'oliva di categoria superiore ottenuto direttamente dalle olive e unicamente mediante procedimenti meccanici»;

b) per l'olio di oliva vergine:

«olio d'oliva ottenuto direttamente dalle olive e unicamente mediante procedimenti meccanici»;

c) per l'olio di oliva composto da oli d'oliva raffinati e da oli d'oliva vergini:

«olio contenente esclusivamente oli d'oliva che hanno subito un processo di raffinazione e oli ottenuti direttamente dalle olive»;

d) per l'olio di sansa di oliva:

«olio contenente esclusivamente oli derivati dalla lavorazione del prodotto ottenuto dopo l'estrazione dell'olio d'oliva e oli ottenuti direttamente dalle olive»;

oppure

«olio contenente esclusivamente oli provenienti dal trattamento della sansa di oliva e oli ottenuti direttamente dalle olive».

1.2.3.1. Origine

La normativa europea ha reso obbligatoria la designazione dell'origine sull'etichetta dell'olio extra vergine di oliva e dell'olio di oliva vergine, mentre essa non deve figurare per l'olio di oliva composto da oli d'oliva raffinati e da oli d'oliva vergini e per l'olio di sansa di oliva. Tutto ciò al fine di evitare rischi di distorsione del mercato degli oli di oliva commestibili. Per «designazione dell'origine» si intende l'indicazione di un nome geografico sull'imballaggio o sull'etichetta ad esso acclusa.

Le designazioni dell'origine comprendono unicamente:

- a) nel caso di oli di oliva originari di uno Stato membro o di un Paese terzo, un riferimento allo Stato membro, all'Unione europea o al Paese terzo — a seconda dei casi;
- b) nel caso di miscele di oli di oliva originari di più di uno Stato membro o Paese terzo, una delle seguenti diciture — a seconda dei casi:
 - i) «miscela di oli di oliva originari dell'Unione europea» oppure un riferimento all'Unione;
 - ii) «miscela di oli di oliva non originari dell'Unione europea» oppure un riferimento all'origine esterna all'Unione;
 - iii) «miscela di oli di oliva originari dell'Unione europea e non originari dell'Unione» oppure un riferimento all'origine interna ed esterna all'Unione;
- c) una denominazione di origine protetta o un'indicazione geografica protetta ai sensi del regolamento (CE) n. 510/2006.

Per le importazioni da Paesi terzi, la designazione dell'origine è disciplinata dalle regole del codice doganale (Reg. CEE 2913/92), in materia di origine non preferenziale (artt. 22-26).¹

La designazione dell'origine che indica uno Stato membro o l'Unione europea corrisponde alla zona geografica nella quale le olive sono state raccolte e in cui è situato il frantoio nel quale è stato estratto l'olio. Qualora le olive siano state raccolte in uno Stato membro o un Paese terzo diverso da quello in cui è situato il

¹ Si noti al riguardo che il 9 ottobre 2013 è stato pubblicato il Reg. UE 952/2013, che istituisce il codice doganale dell'Unione. Tale nuovo Regolamento sarà applicabile in tutti i suoi articoli a decorrere dal 1 giugno 2016. Riguardo all'origine non preferenziale (artt. 59-63) sono attualmente applicabili soltanto alcune norme riguardanti la delega di potere e il conferimento di competenze di esecuzione.

frantoio nel quale è stato estratto l'olio, la designazione dell'origine reca la dicitura seguente:

«Olio (extra) vergine di oliva ottenuto [nell'Unione o in (denominazione dello Stato membro interessato)] da olive raccolte (nell'Unione), in (denominazione dello Stato membro o del Paese terzo interessato)»

1.2.3.2. Indicazioni obbligatorie ed etichettatura volontaria

Le indicazioni obbligatorie che devono figurare nell'etichetta di un olio di oliva sono deducibili integrando le prescrizioni generali sull'etichettatura dei prodotti alimentari con quelle di settore. Esse possono essere così riepilogate:

- la denominazione di vendita;
- la quantità netta o, nel caso di lotti preconfezionati in quantità unitarie costanti, la quantità nominale;
- il termine minimo di conservazione;
- il nome o la ragione sociale o il marchio depositato e la sede o del fabbricante o del confezionatore o di un venditore stabilito nell'UE;
- la sede dello stabilimento di produzione o di confezionamento;
- una dicitura che consenta di identificare il lotto di appartenenza del prodotto;
- le modalità di conservazione;
- l'indicazione dell'origine per gli oli di oliva vergine ed extra vergine.

Fra tali indicazioni, la denominazione del prodotto, la quantità ed il termine minimo di conservazione devono essere presenti nello stesso campo visivo, in modo che il consumatore possa prenderne conoscenza simultaneamente.

Il Reg. UE 29/2012 è stato recentemente modificato dal Reg. UE 1335/2013 che ha introdotto, tra l'altro, disposizioni di armonizzazione con il Reg. UE 1169/2011. Si stabilisce che le condizioni di conservazione degli oli, al riparo della luce e del calore, debbano figurare sull'imballaggio o su un'etichetta ad esso apposta. Per quanto attiene a talune indicazioni obbligatorie (informazione sulla categoria di olio e origine per gli oli vergini ed extra vergini), il Reg. UE 1335/2013 prescrive che esse devono essere raggruppate nel campo visivo principale, come definito dal Reg. UE 1169/2011. Entrambi i regolamenti si applicano a decorrere dal 13 dicembre 2014.

Tra le indicazioni facoltative che possono figurare sull'etichetta di un olio, quelle citate nell'art. 5 del Reg. UE 29/2012 sono soggette rispettivamente ai seguenti obblighi:

- a) l'indicazione «prima spremitura a freddo» è riservata agli oli d'oliva extra vergini o vergini ottenuti a meno di 27 °C con la prima spremitura meccanica della pasta d'olive, mediante un sistema di estrazione di tipo tradizionale con presse idrauliche;
- b) l'indicazione «estratto a freddo» è riservata agli oli d'oliva extra vergini o vergini ottenuti a meno di 27 °C con un processo di percolazione o centrifugazione della pasta d'olive;
- c) le indicazioni delle caratteristiche organolettiche relative al gusto e/o all'odore possono figurare unicamente per gli oli di oliva extra vergini o vergini se risultanti dalla valutazione effettuata secondo l'all. XII del Reg. CEE 2568/91;
- d) l'indicazione dell'acidità o dell'acidità massima può figurare unicamente se accompagnata dalla menzione, in caratteri delle stesse dimensioni e nello stesso campo visivo, dell'indice dei perossidi, del tenore in cere e dell'assorbimento nell'ultravioletto, determinati a norma del Reg. (CEE) n. 2568/91.

Il Reg. UE 1335/2013 stabilisce infine che l'indicazione facoltativa della campagna di raccolta possa figurare sull'etichetta soltanto nel caso in cui il 100% del contenuto dell'imballaggio provenga da tale raccolta.

1.2.3.3. Le novità introdotte dalla Legge 9/2013.

La recente emanazione della c.d. “Legge Salva Olio” (legge 14 gennaio 2013, n. 9 - Norme sulla qualità e la trasparenza della filiera degli oli di oliva vergini) introduce nella filiera dell'olio rigorose e stringenti norme in materia di etichettatura, controlli e sanzioni allo scopo di potenziare la tutela del mercato degli oli di oliva in Italia contro il rischio di frodi, contraffazioni e sofisticazioni.

Il provvedimento prevede, tra i vari punti, una maggiore leggibilità delle informazioni sull'origine riportate in etichetta (la parte mediana dei caratteri è pari o superiore a 1,2 mm), a prova di indicazioni ambigue. Nel caso di miscele di oli di oliva estratti in un altro Stato membro dell'Unione europea o in un Paese Terzo, l'indicazione dell'origine è preceduta dall'indicazione del termine

“miscela”, quest’ultimo stampato con diversa e più evidente rilevanza cromatica rispetto allo sfondo.

La Legge 9/2013 intende sanzionare l’utilizzo di etichettature che non dichiarino con la dovuta trasparenza che la materia prima, o una sua parte, ha diversa provenienza rispetto al luogo di produzione dell’olio. Al riguardo viene considerata ingannevole una pratica commerciale che comporti l’uso di indicazioni che evocano una specifica zona geografica di origine degli oli vergini di oliva, non corrispondente alla effettiva origine territoriale delle olive, ovvero che ingeneri la convinzione che le olive utilizzate siano di provenienza territoriale diversa da quella effettiva, omettendo indicazioni rilevanti sull’origine.

La legge stabilisce inoltre l’illiceità dei marchi contenenti segni idonei a ingannare il pubblico sulla provenienza geografica delle materie prime degli oli di oliva vergini. Si configura quindi l’ipotesi di reato connessa alla fallace indicazione nell’uso del marchio; tale reato è punito ai sensi dell’art. 517 del codice penale (*“Vendita di prodotti industriali con segni mendaci”*). La legge introduce inoltre delle sanzioni aggiuntive per il delitto di contraffazione di indicazioni geografiche o denominazione di origine dei prodotti agroalimentari (delitto di cui all’art. 517-quater c.p.) e per i delitti di adulterazione o contraffazione.

Altra novità (peraltro tutta italiana) riguarda il termine minimo di conservazione che viene fissato a 18 mesi dalla data di imbottigliamento. La violazione di tale termine comporta l’irrogazione di una sanzione amministrativa. Viene garantito il diritto di accesso alle informazioni concernenti l’origine degli oli di oliva detenute dalle autorità pubbliche a tutti gli organi di controllo ed alle amministrazioni interessate.

Viene altresì ribadito il divieto, per i pubblici esercizi, di proporre al consumo olio in contenitori privi di un dispositivo di chiusura (in modo che il contenuto non possa essere modificato senza che la confezione sia aperta o alterata), ovvero della indicazione in etichetta dell’origine e del lotto di appartenenza.

Lo sviluppo di questa Legge è stato alquanto travagliato, in quanto per lo Stato italiano (che il 21 novembre 2012 aveva notificato il testo della norma all’Unione europea) essa è entrata in vigore il 1 febbraio 2013, mentre la Commissione Europea ne aveva rinviato l’applicabilità al 22 novembre 2013 avvalendosi

dell'articolo 9, comma 3, della direttiva 98/34/CE del 22 giugno 1998, il quale prevede che: “Gli Stati membri rinviando l'adozione di un progetto di regola tecnica di dodici mesi a decorrere dalla data in cui la Commissione ha ricevuto la comunicazione di cui all'articolo 8, paragrafo 1, se, nei tre mesi successivi a tale data, la Commissione notifica la sua intenzione di proporre o di adottare una direttiva, un regolamento o una decisione conformemente all'articolo 189 del trattato a questo riguardo”. In effetti la Commissione Europea (che comunque non ha mai aperto alcuna procedura di infrazione a carico dell'Italia) stava rivedendo alcuni aspetti del Reg. UE 29/2012 riguardanti la dimensione dei caratteri dell'origine obbligatoria, l'obbligatorietà del tappo antirimpimento e l'introduzione di una dizione facoltativa attinente all'annata di produzione (sitografia rif. [6]). Nel frattempo la Commissione ha ritirato la proposta di legge che prevedeva l'obbligo di utilizzare nei ristoranti solo bottiglie di olio etichettate, sigillate, con tappi antirabbocco e non riutilizzabili (sitografia rif. [7]). In conclusione, ogni diatriba riguardante la presunta operatività della “Legge Salva Olio” si è effettivamente sopita con lo scadere della sospensiva dell'Unione europea, il 22 novembre 2013, data che, in assenza di altri provvedimenti, ha reso questa Legge effettivamente cogente (sitografia rif. [8]).

1.2.4. Contraffazione

La contraffazione è un illecito che attiene alla violazione dei diritti di proprietà intellettuale (cd. I.P.R.: Intellectual Property Rights); per proprietà intellettuale si intende quell'area del diritto che tutela le molteplici forme di innovazione/creazione suscettibili di una utilizzazione economica. Nell'ambito della accezione generale dei “diritti di proprietà intellettuale” sono ricompresi sia i diritti di proprietà intellettuale in senso stretto (ad esempio il diritto di autore: realizzazione di opere d'ingegno di carattere creativo, quali opere letterarie, cinematografiche, musicali), sia i diritti di proprietà industriale (marchio, brevetto, disegno, modello, nuove varietà vegetali).

La commercializzazione di merci contraffatte, di merci usurpative e, in genere, di tutte le merci che violino i diritti di proprietà intellettuale produce notevoli danni, sia ai fabbricanti ed ai commercianti che rispettano la normativa in materia, nazionale e dell'Unione europea, sia ai titolari dei diritti, nonché inganna i

consumatori, facendo, talvolta, correre a questi ultimi rischi per la salute e la sicurezza. L'imitazione fraudolenta di un prodotto può anche provocare deviazioni del traffico commerciale e fenomeni di concorrenza sleale, con conseguenti gravi danni allo sviluppo della ricerca ed alla capacità di invenzione e di innovazione, minando alla base la fiducia nella capacità di espansione di un mercato interno inquinato. Il mancato sviluppo della ricerca determina un calo degli investimenti, lo spostamento delle produzioni verso mercati che danno migliore tutela, con l'inevitabile conseguenza della riduzione del numero di posti di lavoro offerti dalle imprese (Massari, 2004). La contraffazione si è diffusa oramai in quasi tutti i settori della produzione e del consumo; una lista, non esaustiva, comprende: abbigliamento, pelletteria, orologi, scarpe, profumi, occhiali, elettronica, software, sigarette, attrezzature sportive, mobili, giocattoli, pezzi di ricambio per auto ed aerei, medicinali, liquori, prodotti alimentari (in campo alimentare, alla contraffazione di marchio vera e propria si aggiunge anche il cd. "italian sounding", già descritto nel paragrafo 1.2.1.). Alcuni di tali settori incidono immediatamente e direttamente sulla salute dei consumatori, che deve essere tutelata mediante il pronto intervento, preventivo ed amministrativo, delle autorità di controllo e quello repressivo, attraverso il sequestro e la distruzione delle merci contraffatte e pericolose.

L'UE, con l'adozione di efficaci strumenti normativi, si pone l'obiettivo di rendere sempre più incisiva la risposta e la capacità d'intervento degli Stati membri rispetto ad un fenomeno criminale che ha assunto proporzioni notevoli negli ultimi anni. In tale ambito, l'Autorità doganale è chiamata a contrastare ogni devianza o abuso alle corrette regole del libero scambio, con riguardo alle ineludibili esigenze di fluidità delle transazioni commerciali, avendo l'obiettivo, pertanto, di tutelare la liceità del libero commercio senza tuttavia rallentarlo. A livello europeo, l'intervento doganale nei confronti delle merci sospettate di violare i diritti della proprietà intellettuale trova la sua base giuridica nel Reg. UE 608/2013, che abroga, con effetto dal 1° gennaio 2014, il Reg. (CE) n. 1383 del 2003.

La violazione dei diritti di proprietà intellettuale si realizza, in linea generale, mediante:

- merci contraffatte (art. 2, comma 5 del Reg. UE 608/2013), vale a dire:

a) le merci oggetto di un atto che viola un marchio nello Stato membro in cui si trovano e su cui sia stato apposto senza autorizzazione un segno che è identico a quello validamente registrato per gli stessi tipi di merci, o che non possa essere distinto nei suoi aspetti essenziali da tale marchio;

b) le merci oggetto di un atto che viola un'indicazione geografica nello Stato membro in cui si trovano e su cui sia stato apposto un nome o un termine protetto rispetto a tale indicazione geografica o che sono descritte da tale nome o termine;

c) l'imballaggio, l'etichetta, l'adesivo, il prospetto, il foglio informativo, il documento di garanzia e ogni altro elemento analogo, anche presentati in modo distinto, oggetto di un'azione che viola un marchio o un'indicazione geografica, che contiene un simbolo, un nome o un termine che è identico ad un marchio validamente registrato o a un'indicazione geografica protetta, o che non possa essere distinto nei suoi aspetti essenziali da tale marchio o indicazione geografica, e che può essere usato per gli stessi tipi di merci per cui sono stati validamente registrati il marchio o l'indicazione geografica;

- merci usurpative (art. 2, comma 5 del Reg. UE 608/2013): le merci oggetto di un'azione che viola un diritto di autore o un diritto connesso o un disegno o modello nello Stato membro in cui le merci sono state trovate e che costituiscono o contengono copie fabbricate senza il consenso del titolare del diritto d'autore o del diritto connesso o del disegno o modello, o di una persona da questi autorizzata nel Paese di produzione.

La determinazione della violazione di un diritto di proprietà intellettuale viene effettuata dalle Autorità doganali. La procedura ordinaria (art. 3) nasce ad iniziativa della parte, che presenta una "domanda" la quale può essere diretta a tutelare beni in ambito nazionale (domanda nazionale) o dell'UE (domanda unionale).

In particolare nel Regolamento (UE) 608/2013 viene estesa la protezione giuridica non solo al titolare del diritto di proprietà intellettuale ma anche agli utilizzatori, alle associazioni e ai gruppi di produttori per tenere nella dovuta considerazione le peculiarità delle Indicazioni Geografiche nell'ambito della Proprietà intellettuale e della loro protezione doganale, unionale e nazionale, assicurando così l'opportuna certezza del diritto (art. 3).

La normativa europea conferisce inoltre all'Autorità doganale il potere di sospendere lo svincolo o bloccare merci sospettate di violare un diritto di proprietà intellettuale, che non siano oggetto di una decisione di accoglimento di una domanda.

L'importanza della lotta alla contraffazione è testimoniata dagli orientamenti normativi del legislatore italiano, che, al fine di potenziare la lotta ai fenomeni fraudolenti e di tutelare la specificità dei prodotti, ha previsto, con la Legge n. 350 del 2003 (legge Finanziaria 2004), la realizzazione di una banca dati multimediale per la raccolta dei dati caratteristici idonei a contraddistinguere i beni oggetto di tutela. Con il progetto F.A.L.S.T.A.F.F. (Fully Automated Logical System To Against Forgeries & Frauds), avviato nel 2004, si è creato lo strumento pratico per individuare il titolare del diritto di proprietà intellettuale ed interagire con lo stesso; tale database dei prodotti autentici è inserito nel sistema informativo AIDA (Automazione Integrata Dogane e Accise) dell'Agenzia delle dogane e dei monopoli e viene alimentato dagli stessi titolari del diritto, mediante i dati contenuti nelle richieste di intervento, presentati in via telematica. Detto sistema consente, tra l'altro, di confrontare le caratteristiche dei prodotti sospetti di contraffazione con le caratteristiche dei prodotti originali. In pratica, ogni azienda che presenti una domanda (di intervento) genera una scheda nella banca dati F.A.L.S.T.A.F.F.; in tale scheda vengono inserite tutte le informazioni di carattere tecnico che contraddistinguono il prodotto di cui si richiede la tutela, unitamente ad immagini del prodotto ed all'itinerario doganale della merce. I funzionari doganali possono interrogare la banca dati ottenendo risposte in tempo reale e possono avvalersi dei tecnici delle associazioni di categoria e/o degli enti di certificazione della qualità dei prodotti posti a tutela per l'attestazione della qualità della merce attraverso la perizia (sitografia rif. [9]).

Nell'ambito del quadro normativo generale, in materia di repressione della contraffazione, va menzionata la Legge 99/2009 (cd. collegato energia), che mira, tra l'altro, a rafforzare la tutela penale della proprietà industriale e a contrastare più efficacemente la contraffazione, riformulando alcuni articoli del codice penale, inserendovi nuove fattispecie di reato ed apportando modifiche alla disciplina della confisca.

In particolare, il provvedimento (artt. 15, 16 e 17):

- riformula l'art. 473 c.p. (*Contraffazione, alterazione o uso di marchi o segni distintivi ovvero di brevetti, modelli e disegni*) e l'art. 474 c.p. (*Introduzione nello Stato e commercio di prodotti con segni falsi*), inasprendo le sanzioni penali e prevedendo la confisca obbligatoria dei beni inerenti alla commissione di questi delitti;
- introduce nuove circostanze aggravanti (es. per la commissione dei delitti in modo sistematico o con l'allestimento di mezzi e attività organizzate) ed attenuanti (per colui che collabora con le autorità) dei delitti di contraffazione;
- raddoppia la pena detentiva prevista per il delitto di vendita di prodotti industriali con segni mendaci (art. 517 c.p.);
- interviene sul codice penale per inserire nel capo relativo ai delitti contro l'industria e il commercio due ulteriori fattispecie, volte a sanzionare: – la fabbricazione ed il commercio di beni realizzati usurpando titoli di proprietà industriale (art. 517-ter c.p.); – la contraffazione di indicazioni geografiche o denominazioni di origine dei prodotti agroalimentari (art. 517-quater c.p.);
- estende alle indagini per i delitti di contraffazione la disciplina delle “operazioni sotto copertura”, ovvero delle attività di tipo investigativo poste in essere da ufficiali di polizia giudiziaria, infiltrati sotto falsa identità negli ambienti malavitosi al fine di reperire prove e accertare responsabilità;
- stabilisce che i beni mobili registrati sequestrati (automobili, navi, imbarcazioni, natanti e aeromobili) nel corso dei procedimenti per la repressione dei reati contro la proprietà industriale siano affidati dall'Autorità giudiziaria in custodia giudiziale agli organi di polizia ovvero ad altri organi dello Stato o enti pubblici non economici per finalità di giustizia, protezione civile o tutela ambientale;
- interviene, infine, sulla disciplina della responsabilità amministrativa delle persone giuridiche (D.Lgs. n. 231/2001) per introdurre specifiche sanzioni, pecuniarie ed interdittive, a carico dell'ente che si avvantaggia della commissione di delitti contro l'economia pubblica, l'industria e il commercio.

1.2.5. Origine e “made in”.

Le scelte di delocalizzazione produttiva operate dalle aziende hanno prodotto una frammentazione su scala globale del processo produttivo, con un conseguente aumento del numero di Paesi nei quali avvengono lavorazioni che contribuiscono

alla realizzazione del prodotto finito. Parallelamente a questo, in virtù della sempre maggiore efficienza dei mezzi di trasporto e della costante riduzione delle barriere tariffarie negli scambi internazionali, è aumentata la possibilità di approvvigionarsi di materie prime in Paesi terzi a costi ridotti. Tali fattori hanno reso più difficile l'assegnazione dell'origine ai prodotti finiti, determinando l'esigenza di regole di origine, chiare e possibilmente armonizzate, al fine di consentire agli operatori di poter individuare con certezza il Paese di origine. L'individuazione dell'esatta origine della merce è indispensabile dal punto di vista doganale, in quanto necessaria per l'applicazione delle misure di politica commerciale che colpiscono solo le merci originarie di taluni Paesi.

L'origine "geografica" va concettualmente distinta dalla "provenienza fisica" del prodotto, inteso come luogo dal quale vengono spedite le merci, che può coincidere o meno con il Paese di effettiva produzione. La nozione di origine, ai fini doganali, ha una duplice connotazione: origine preferenziale ed origine non preferenziale. In tale contesto, gli ordinamenti giuridici nazionali distinguono tra due differenti tipologie di regole di origine:

- le regole di origine preferenziali (negoziali o unilaterali);
- le regole di origine non preferenziali.

Le prime sono quelle applicabili nell'ambito di relazioni commerciali preferenziali tra due o più Stati; l'elemento preferenziale si può basare su accordi di libero scambio, oppure su base unilaterale (ad esempio le regole di origine del Sistema di Preferenze Generalizzate). Mentre le regole contenute negli accordi sono il risultato di complessi negoziati fra i Paesi membri, quelle unilaterali scaturiscono da una decisione autonoma; pertanto, le regole di origine preferenziali si applicano solo per decidere se un determinato prodotto è originario di uno Stato membro e, quindi, ammissibile al trattamento daziario privilegiato. Per tutti gli altri strumenti di politica commerciale che non sono funzionali alla concessione di un trattamento commerciale preferenziale, bensì all'applicazione di misure di difesa commerciale discriminatorie, si applicano le regole di origine non preferenziali.

Le regole di origine non preferenziale, come si è già visto nel paragrafo 1.2.3.1., sono attualmente disciplinate dal Reg. CEE 2913/1992 (codice doganale

comunitario – CDC): artt. da 22 a 26². Tale impianto distingue tra merce interamente ottenuta in un Paese e merce per la cui genesi siano stati coinvolti due o più Paesi. L'art. 23 del CDC reca la nozione di “merce originaria di un Paese” e, al comma 1, statuisce che “sono originarie di un Paese le merci interamente ottenute in tale Paese”; al comma 2 sono annoverati tutti quei prodotti (minerali, animali, vegetali, ecc.) che si intendono “interamente ottenuti”, in quanto generati nel Paese di cui acquisiscono l'origine. Diversamente, gli artt. 24 e 25 fissano i principi che sottendono l'attribuzione dell'origine a prodotti la cui genesi non è univocamente determinabile, ponendo talune condizioni perché si possa attribuire “un'origine indiretta” ad una merce che non è stata generata in tutte le sue componenti nel luogo in cui ha subito delle lavorazioni. Una merce alla cui produzione hanno contribuito due o più Paesi è originaria del Paese in cui è avvenuta l'ultima trasformazione o lavorazione sostanziale, economicamente giustificata ed effettuata in un'impresa attrezzata a tale scopo, che si sia conclusa con la fabbricazione di un prodotto nuovo od abbia rappresentato una fase importante del processo di fabbricazione. La Corte di Giustizia dell'UE ha più volte affermato che si configura una trasformazione sostanziale solo qualora il prodotto che ne risulta abbia composizione e proprietà specifiche che non possedeva prima di essere sottoposto a tale trasformazione o lavorazione.

[In via generale, il criterio dell’“ultima trasformazione sostanziale” trova applicazione per mezzo di tre distinte regole:

- cambiamento della “voce” tariffaria (cod. SA a 4 cifre);
- indicazione delle lavorazioni specifiche atte a conferire l'origine del Paese ove sono effettuate (es. “confezione completa” per i prodotti tessili);
- incremento percentuale del valore aggiunto acquisito dal prodotto per effetto delle lavorazioni effettuate, superiore a determinati limiti (comparazione tra il valore di tutti i materiali non originari e il valore del prodotto finito).]

E' altresì collegato al concetto di origine il cd. marchio di origine o “Made in” del prodotto; è evidente che tale marchio, pur non avendo nessuna rilevanza tributaria, ha un effetto sensibile nella fase di commercializzazione, poiché,

² Vedi nota 1.

agendo sulla qualità percepita del prodotto, può arrivare ad orientare le scelte di acquisto dei consumatori. La marcatura di origine è oggetto di una serie di previsioni normative volte a prevenire e sanzionare l'apposizione di marchature di origine false o ingannevoli sui prodotti. In ambito internazionale, vige l'Accordo di Madrid del 14 aprile 1891, sottoscritto da 29 Stati, ratificato dall'Italia con la legge 676/1967, che ha trovato applicazione con il DPR 656 del 1968; tale decreto, all'art. 1, ha disposto, all'atto dell'introduzione nel territorio della Repubblica, il fermo, da parte degli uffici doganali, delle merci per le quali vi sia il fondato sospetto che rechino una falsa o fallace indicazione di origine e l'immediata comunicazione all'autorità giudiziaria. Il decreto ha altresì stabilito un tempo massimo di 60 giorni, entro i quali gli interessati possono procedere alla regolarizzazione (generalmente attuata mediante l'asportazione delle etichette contenenti le false o fallaci indicazioni di origine) prevista dall'art. 2 dell'Accordo di Madrid. Va sottolineato che l'Accordo di Madrid e le norme di recepimento interno non impongono alcun obbligo di indicazione dell'origine dei prodotti, ma si limitano a vietare l'uso di indicazioni di origine false o ingannevoli, conferendo alla dogana l'autorità per disporre il sequestro. A livello nazionale, il quadro normativo di riferimento è integrato dalla disciplina recata dall'art. 4, comma 49, della legge n. 350 del 2003 (Finanziaria 2004) – come integrato dall'art. 16 del DL 135/2009, convertito nella legge 166 del 2009 – con il quale è stata attribuita rilevanza penale alle ipotesi di importazione, esportazione e commercializzazione di prodotti recanti false o fallaci indicazioni di origine. Le fattispecie di reato, sanzionabili ai sensi dell'art. 517 del codice penale, sono pertanto due:

- quella relativa alla falsa indicazione, consistente nella stampigliatura “Made in Italy” su prodotti e merci che non abbiano un'origine italiana, secondo le regole di origine non preferenziale definite negli artt. da 22 a 26 del CDC;
- quella relativa alla fallace indicazione, che si realizza nell'apposizione, su prodotti privi di indicazione di origine, di segni, figure o quant'altro, tali da indurre il consumatore a ritenere che il prodotto o la merce sia di origine italiana; ovvero, nell'apposizione, su prodotti sui quali è indicata una origine estera, di segni, figure o quant'altro, tali da indurre il consumatore a ritenere che il prodotto o la merce sia di origine italiana.

La legge n. 296 del 2006, all'art. 1, comma 941, introduce una terza ipotesi di fallace indicazione dell'origine (sanzionata penalmente ai sensi dell'art. 517 c.p.), che va ad aggiungersi a quelle già previste nell'impianto dell'art. 4, comma 49, della legge 350/2003; essa si configura nel caso in cui venga apposto sul prodotto un marchio aziendale, in violazione della disciplina sulle pratiche commerciali ingannevoli. In proposito, la direttiva 2005/29/CE, (recepita in Italia dal D.Lgs. 146/2007), stabilisce, all'art. 6 che *è ingannevole una pratica commerciale che contenga informazioni false...inganni o possa ingannare il consumatore medio,...lo induca o sia idonea a indurlo ad assumere una decisione di natura commerciale che non avrebbe altrimenti preso, quali:...l'origine geografica o commerciale...).*

Con l'art. 16, commi da 1 a 4, del DL 135/2009, convertito nella legge 166 del 2009, è stata introdotta una nuova condotta passibile di sanzione penale, consistente nell'uso (su prodotti non realizzati interamente in Italia) di un'indicazione di vendita che presenti il prodotto come interamente realizzato in Italia, quali "100% made in Italy", "100% Italia", "tutto italiano", "prodotto interamente italiano", indicazione, cioè, idonea ad ingenerare nel consumatore la convinzione della realizzazione interamente in Italia del prodotto; il primo comma del citato art. 16 definisce, come interamente realizzato in Italia, il prodotto o la merce, classificabile come made in Italy ai sensi della normativa vigente, e per il quale il disegno, la progettazione, la lavorazione ed il confezionamento sono compiuti esclusivamente sul territorio italiano. Tale condotta fraudolenta è punita con le pene previste dall'art. 517 c.p. (reclusione fino a due anni e multa fino a 20.000 euro) aumentate di un terzo.

Con l'art. 16, comma 8, del predetto DL n. 135/2009, è stato abrogato il contestato comma 4 dell'art. 17 della legge n. 99 del 2009 (cd. legge sviluppo), che aveva introdotto l'obbligo di indicare l'origine estera su tutti i prodotti realizzati all'estero e recanti marchi di aziende italiane; lo stesso DL 135 ha stabilito l'illiceità dell'uso fallace del marchio, inserendo all'art. 4, comma 49, della legge 350/2003, il comma 49-bis: *"Costituisce fallace indicazione l'uso del marchio, del titolare o del licenziatario, con modalità tali da indurre il consumatore a ritenere che il prodotto o la merce sia di origine italiana ai sensi della normativa europea sull'origine, senza che gli stessi siano accompagnati da*

indicazioni precise e evidenti sull'origine o sulla provenienza estera o comunque sufficienti ad evitare qualsiasi fraintendimento del consumatore sull'effettiva origine del prodotto, ovvero senza essere accompagnati da attestazione, resa da parte del titolare o del licenziatario del marchio, circa le informazioni che, a sua cura, verranno rese in fase di commercializzazione del prodotto(.....)". Ad esempio, l'apposizione del marchio FIAT su un'auto prodotta completamente in Romania, senza la precisazione sul prodotto della provenienza estera, integra la nuova fattispecie amministrativa di fallace indicazione di provenienza, ove per le modalità d'uso del marchio il consumatore possa ritenere il prodotto di origine italiana. Al riguardo, il Ministero dello sviluppo economico ha diramato la circolare esplicativa n. 124898 del 9 novembre 2009, con la quale sono state chiarite le modalità applicative delle cosiddette "indicazioni precise ed evidenti sull'origine o sulla provenienza estera", che possono concretizzarsi in un'appendice informativa sul prodotto, sulla confezione o sulle etichette, contenente, a titolo meramente esemplificativo, una delle seguenti diciture: "prodotto fabbricato in Paesi extra-UE", "prodotto di provenienza extra-UE", "prodotto importato da Paesi extra-UE", "prodotto non fabbricato in Italia" (Unioncamerelombardia, 2009).

Per quanto concerne i prodotti alimentari, l'art. 43 del DL 83/2012 (per la crescita del Paese), il cui comma 1-quater ha novellato l'art. 4, comma 49-bis, della legge 350/2003, ha introdotto la definizione di "effettiva origine", intesa come il luogo di coltivazione e allevamento della materia prima e il luogo in cui è avvenuta la trasformazione sostanziale.

1.3. Miscele di olio di oliva e altri oli vegetali

1.3.1 Riferimenti normativi

Sin dal 1908, con la Legge n. 136, viene introdotta in Italia una primordiale classificazione che distingueva gli "*oli di oliva genuini*" dagli "*oli di oliva miscelati*". Questi ultimi erano costituiti da una miscela di oli di oliva con oli di semi o altre sostanze oleose: si focalizzava, quindi, l'attenzione sulla tutela della genuinità degli oli di oliva senza, tuttavia, che per questi vi fosse una definizione specifica.

La legge italiana ha puntualizzato per la prima volta alcuni aspetti sulle miscele di oli di oliva ed oli di semi con il Regio Decreto Legge n. 2033 del 15 ottobre 1925, poi convertito in legge (Legge 18 marzo 1926 n. 562), e sulla repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari. In particolare, era definito come "*olio miscelato*" la miscela di olio di oliva ed altri oli vegetali quando questi ultimi non superavano il 50%, mentre la denominazione "*olio di semi*" era riservata sia agli oli diversi da quelli di oliva sia alle miscele nelle quali gli oli di oliva rappresentavano meno del 50%. Il Regio Decreto Legge, inoltre, introduceva l'obbligo per chiunque intendesse fabbricare o mettere in commercio oli vegetali commestibili diversi da quelli di oliva, di farne denuncia per iscritto al Sindaco. Il Regio Decreto Legge n. 2316 del 30 dicembre 1929, modificando l'art. 23 del Regio Decreto Legge n. 2033, vietava la preparazione e la vendita di miscele tra oli di oliva e altri oli vegetali commestibili ed obbligava all'impiego della denominazione "*olio di seme*" per la commercializzazione di tutti gli oli vegetali commestibili ad esclusione di quelli di oliva (Caponio et al. 2012).

In ambito europeo, invece, il campo delle miscele degli oli di oliva con altri oli vegetali è stato disciplinato solo a partire dal 2002, anno in cui fu emanato il Reg. CE n. 1019 (abrogato e sostituito dal Reg. UE 29/2012, come si è già visto nel paragrafo 1.2.3.), relativo alle norme di commercializzazione dell'olio di oliva. Il suddetto regolamento, più volte modificato, conteneva norme in materia di etichettatura di oli di oliva, di designazione dell'origine esclusivamente per gli oli di oliva vergini ed extra vergini rispondenti a precisi requisiti, argomenti trattati nel paragrafo 1.2.3.1. In tale regolamento veniva inoltre affrontata la problematica della etichettatura di prodotti alimentari, che, contenendo olio di oliva, potessero

ingannare “il consumatore sfruttando la reputazione dell’olio di oliva, senza indicare la composizione reale del prodotto”.

In tale regolamento veniva infatti stabilito che la denominazione di vendita delle miscele di olio di oliva e oli di semi dovesse essere la seguente: “*Miscela di oli vegetali (o nomi specifici degli oli vegetali) e di olio d’oliva*”, seguita immediatamente dall’indicazione della percentuale di olio d’oliva nella miscela. Veniva stabilita inoltre la possibilità di indicare la presenza dell’olio d’oliva in etichetta attraverso immagini o simboli grafici, unicamente se la percentuale di olio d’oliva fosse superiore al 50%.

La normativa europea si è dunque inserita in un variegato panorama di legislazioni nazionali: a fronte di alcuni Paesi in cui la produzione e la commercializzazione di miscele di oli è consentita, nella maggior parte dei Paesi produttori di olio di oliva (Italia, Spagna, Grecia e Portogallo, oltre al non produttore Belgio) si è riscontrato, viceversa, un divieto assoluto.

E' emerso inoltre, come affermato dal Consiglio di Stato nella sentenza n. 482 del 2003, che il divieto previsto in alcuni Paesi si fonda sulle difficoltà di controlli miranti all'individuazione quantitativa dell'olio di oliva presente nella miscela, in assenza di un metodo analitico che consenta di dosare la percentuale (l'unica possibilità di controllo è costituita dalla verifica indiretta della contabilità delle imprese).

Per quanto concerne l'Italia, la ratio del mantenimento del divieto di cui al citato articolo 23 del RDL 2033/1925 è altresì rinvenibile nella volontà di preservare la qualità e la tradizione della produzione locale di olio di oliva.

L'approccio seguito dal legislatore europeo è stato dunque quello di non giustificare l'introduzione a livello comunitario di un divieto assoluto delle miscele di oli diversi correlato alle obiettive difficoltà dei controlli, potendo le stesse essere commercializzate con chiara indicazione, apposta sull'etichetta, della loro composizione e natura.

E' stato quindi emanato il Reg. CE n. 182/2009 (modificativo del Reg. CE 1019/2002), che ha introdotto la disposizione secondo la quale gli Stati membri possono vietare la produzione, sul proprio territorio, delle miscele di oli di oliva e di altri oli vegetali per il consumo interno. Gli Stati membri non possono tuttavia vietare, nel proprio territorio, la commercializzazione delle suddette miscele di oli

provenienti da altri Paesi, né vietarne la produzione ai fini della commercializzazione in un altro Stato membro o dell'esportazione.

Si intuisce facilmente che la legge europea, con tali provvedimenti, abbia aperto le porte alla commercializzazione delle miscele di olio di oliva e altri oli vegetali, consentendo agli Stati membri la facoltà di impedire la produzione sul proprio territorio delle miscele solo se destinate al consumo interno. Si riscontra al riguardo che, fino all'entrata in vigore del Reg. CE n. 182/2009, in Italia non era consentita la produzione di miscele di olio di oliva ed olio di semi anche al solo fine dell'esportazione (Consiglio di Stato, 2003).

Il campo delle miscele degli oli di oliva con altri oli vegetali, analogamente a quanto visto per l'etichettatura (par. 1.2.3.), è attualmente disciplinato dal Reg. UE 29/2012 nel quale sono state integralmente trasfuse le norme contenute nei precedenti Reg. CE 1019/2012 e Reg. CE 182/2009

Permane dunque l'obbligo di indicare la percentuale di olio di oliva nella miscela e la possibilità di indicare la presenza dell'olio d'oliva in etichetta attraverso immagini o simboli grafici, unicamente se la percentuale di olio d'oliva sia superiore al 50%.

Non si può fare a meno di rilevare che, nonostante la legislazione europea abbia regolamentato da oltre dieci anni il campo delle miscele legali di oli di oliva e oli di semi, non esiste ancora un metodo analitico ufficiale che sia in grado di quantificare la percentuale di olio di oliva in una miscela e, in particolare, di stabilire se l'olio di oliva sia presente in quantità inferiore o superiore al 50%, valore che limita, ai fini legali, la possibilità di utilizzare le citate immagini o simboli grafici.

Dal punto di vista doganale le miscele di oli vegetali possono essere classificate al codice 1517 9091 (oli vegetali fissi, fluidi, miscelati).

1.3.2 Il problema analitico delle miscele: letteratura di riferimento

Da un attento esame della legislazione europea, si intuisce come siano state gettate le basi per una diffusione sul mercato delle miscele oleicole, con la conseguente necessità di disporre di un metodo analitico che quantifichi la percentuale di olio d'oliva in una miscela di oli d'oliva e altri oli vegetali, al fine di evitare frodi nella commercializzazione delle suddette miscele. In particolare

assume rilevanza discriminante, ai fini dell'etichettatura, la quantità del 50% di olio d'oliva.

In letteratura è presente, viceversa, una notevole quantità di lavori aventi come obiettivo la ricerca di adulteranti nell'olio di oliva. In molti casi vengono utilizzati metodi chemiometrici abbinati alle analisi chimiche (García-González et al. 2004; Gurdeniz et al., 2009; Kasemsumran et al., 2005; Maggio et al., 2010; Parcerisa, et al., 2000; Peña et al., 2005; Poulli, et al., 2007; Priego Capote et al, 2007; Rohman et al, 2012 ; Vigli et al., 2003). Questa problematica analitica è stata oggetto di ampia trattazione, in quanto correlata all'esigenza di rivelare un altro tipo di frode, di cui si è già discusso nel paragrafo 1.1.2., consistente nella vendita di oli di oliva adulterati con oli più economici; diversamente, la quantificazione di un olio di oliva in una miscela legale richiede, come già sottolineato da De La Mata et al. (2012), che il problema sia analizzato da un altro punto di vista. Una eventuale frode nella commercializzazione di miscele di oli potrebbe consistere infatti nella loro presentazione in imballaggi con etichette recanti immagini o raffigurazioni grafiche dell'oliva anche quando, viceversa, contengono una percentuale di olio di oliva inferiore al 50%. Si aggiunga inoltre che la ricerca di adulteranti nell'olio di oliva presuppone lo studio del comportamento di una matrice costituita esclusivamente da olio di oliva, alla quale vengono aggiunti "componenti estranei". In relazione ai dettami del legislatore europeo, lo studio delle miscele comporta invece l'analisi di matrici completamente diverse da un olio puro, avendo soltanto per il 50% la composizione, e quindi le caratteristiche merceologiche o il fingerprint dell'olio di oliva. Il problema analitico consiste dunque nell'individuare delle caratteristiche peculiari di una matrice così costituita, al fine di poter rivelare una contraffazione consistente in una diminuzione della percentuale di olio di oliva, a favore dell'utilizzo di oli più economici.

Nell'ambito di uno studio volto alla valutazione delle aggiunte di olio di soia all'olio di oliva, Fasciotti et al. (2010) hanno proposto un metodo che ha consentito la rivelazione selettiva di alcuni triacilgliceroli, di norma coeluenti, mediante analisi HPLC-APCI-MS-MS. Tra i risultati ottenuti, le relazioni lineari tra le aree dei picchi di alcuni triacilgliceroli (valutate attraverso il metodo delle

aggiunte standard) e la concentrazione di olio di oliva in una miscela suggeriscono l'applicabilità di questo metodo alla quantificazione dell'olio di oliva in una miscela commerciale.

Non sono tuttavia numerosi i lavori presenti in letteratura che affrontano direttamente la tematica delle miscele di oli: alcuni hanno comportato l'analisi dei triacilgliceroli, mediante HPLC (De la Mata-Espinosa et al., 2011) o GC-MS (Ruiz-Samblás et al., 2012). La quantificazione è stata condotta con la tecnica di calibrazione multivariata PLS (Partial Least Squares)³, la cui bontà dei risultati può essere valutata mediante il parametro root-mean-squared error of prediction (RMSEP) (Kowalski, et al., 1991; Massart et al., 1997), il quale, in tali lavori, non è inferiore al 10 %. Le miscele di oli sono state anche caratterizzate mediante ATR-FTIR e calibrazione multivariata PLS (De la Mata et al., 2012). In questo caso la bontà del modello è stata valutata attraverso l'errore di predizione sul set di calibrazione (parametro generalmente più basso del RMSEP), la cui migliore stima, ottenuta tuttavia restringendo l'applicazione del modello solo a miscele contenenti fino al 50% di olio di oliva, è pari a 8,28 %.

1.3.3 Il profilo degli acidi grassi negli oli vegetali.

Il problema della identificazione e quantificazione dell'olio di oliva in una miscela può essere utilmente affrontato individuando in via preliminare le caratteristiche dell'olio di oliva che siano peculiari di tale matrice, indipendentemente dalla classifica merceologica (extra vergine, vergine, raffinato, sansa, ecc). Individuati dunque i parametri analitici che possano fornire un fingerprint dell'olio di oliva, è necessario elaborare un metodo analitico che sia in grado di riconoscere tale fingerprint in una miscela, intesa questa come una nuova matrice contenente circa il 50% di olio di oliva.

Il Reg. CEE 2568/91 costituisce un autorevole punto di riferimento, corroborato dal suo valore legale, per l'individuazione di quei parametri analitici peculiari dell'olio di oliva, il cui contenuto viene considerato indipendente dalla classifica dell'olio in ciascuna delle otto categorie merceologiche ivi previste. L'allegato I di tale regolamento consente di rilevare che gli acidi grassi (fatta eccezione per gli

³ Tecnica descritta nel paragrafo 3.2.4. ed utilizzata nella parte sperimentale del presente lavoro di tesi.

isomeri trans e di una leggera variazione nel contenuto di acido beenico) e gli steroli (fatta eccezione per il brassicasterolo e il contenuto di steroli totali) sono dei parametri caratteristici del fingerprint dell'olio di oliva a prescindere dalla categoria merceologica di appartenenza.

In questo lavoro di tesi è stato considerato il profilo degli acidi grassi, analizzato attraverso la percentuale degli esteri metilici. Il Reg. CEE 2568/91 stabilisce i limiti per le quantità percentuali degli esteri metilici in un olio d'oliva. Il metodo analitico per la determinazione degli esteri è descritto negli All. XA e XB del citato regolamento.

Nella tabella 2 sono riportati i limiti degli esteri metilici in un olio di oliva imposti dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm.:

Esteri metilici degli acidi grassi	Limiti (%m/m)
Miristico	≤ 0,03
Palmitico	7,5-20,0
Palmitoleico	0,3-3,5
Margarico	≤ 0,3
Margaroleico	≤ 0,3
Stearico	0,5-5,0
Oleico	55,0- 83,0
Linoleico	3,5-21,0
Arachico	≤ 0,6
Linolenico	≤ 1,0
Eicosenoico	≤ 0,4
Beenico	≤ 0,2 (≤ 0,3 per gli oli di sansa)
Lignocerico	≤ 0,2

Tabella 2: limiti degli esteri metilici degli acidi grassi in un olio di oliva imposti dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm.

Dall'osservazione della tabella 2 si deduce che le percentuali di alcuni acidi grassi (palmitico, palmitoleico, stearico, oleico e linoleico) in un olio d'oliva possono mostrare delle oscillazioni piuttosto ampie, mentre per gli acidi grassi presenti in quantità meno significative il regolamento europeo impone dei limiti superiori.

Per quanto riguarda il profilo degli acidi grassi degli oli di semi, non esiste una normativa analoga a quella esaminata per gli oli di oliva; in altri termini, non vige un regolamento europeo o una legge nazionale che prescriva determinati range di variabilità degli acidi grassi o di altri parametri analitici, al fine di poter discriminare le differenti tipologie di oli di semi. Dati riguardanti il profilo acidico sono tuttavia reperibili in letteratura (Amelotti, 1990); un utile riferimento può essere inoltre rinvenuto nello Standard Codex 210-1999, relativo agli oli vegetali.

Si riportano nella **tabella 3** alcuni dati estrapolati dallo Standard Codex 210-1999 relativi ad alcune tipologie di olio vegetale di interesse per questo lavoro di tesi.

	Mais (%m/m)	Arachide (%m/m)	Vinacciolo (%m/m)	Girasole (%m/m)	Riso (%m/m)
Miristico	max 0,3	max 0,1	max 0,3	max 0,2	max 1,0
Palmitico	8,6 – 16,5	8,0 – 14,0	5,5 – 11,0	5,0 – 7,6	14 - 23
Palmitoleico	max 0,5	max 0,2	max 1,2	max 0,3	max 0,5
Margarico	max 0,1	max 0,1	max 0,2	max 0,2	
Margaroleico	max 0,1	max 0,1	max 0,1	max 0,1	
Stearico	max 3,3	1,0 – 4,5	3,0 – 6,5	2,7 – 6,5	0,9 – 4,0
Oleico	20,0 – 42,2	35,0 - 69	12,0 – 28,0	14,0 – 39,4	38 - 48
Linoleico	34,0 – 65,6	12,0 – 43,0	58,0 – 78,0	48,3 – 74,0	21 - 42
Arachico	0,3 – 1,0	1,0 – 2,0	max 1,0	0,1 - 0,5	max 0,9
Linolenico	max 2,0	max 0,3	max 1,0	max 0,3	0,1 – 2,9
Eicosenoico	0,2 – 0,6	0,7 - 1,7	max 0,3	max 0,3	max 0,8
Beenico	max 0,5	1,5 – 4,5	max 0,5	0,3 – 1,5	max 1,0
Lignocerico	max 0,5	0,5 – 2,5	max 0,4	max 0,5	max 0,9

Tabella 3: Composizione in acidi grassi di alcuni oli di semi (Standard Codex 210-1999)

Alla luce della naturale variabilità esistente nel profilo acidico di un olio di oliva (per non parlare della variabilità esistente fra le differenti tipologie di oli di semi), si deduce che la miscelazione di un olio di oliva con un olio di semi può dare luogo a miscele con dei profili acidici estremamente variabili. Ne consegue che il riconoscimento o la verifica della percentuale di un olio di oliva in una miscela di oli, mediante l'analisi della composizione acidica, costituisce un complesso problema analitico.

Un approccio alla risoluzione di questa problematica potrebbe prevedere l'utilizzo di tecniche di analisi statistica multivariata, quali l'analisi delle componenti principali (PCA), la Target Factor Analysis (TFA), il Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA) e il Partial Least Squares (PLS). Per una descrizione di queste tecniche si rimanda al capitolo 3.

PCA, SIMCA e PLS sono stati già impiegati per lo studio delle miscele di oli. La PCA è stata anche utilizzata per valutare l'evoluzione dell'olio vergine di oliva in funzione del tempo (Alonso-Salces, Holland, Guillou, 2011). PCA e SIMCA hanno trovato larga applicazione negli studi di discriminazione di oli di oliva in funzione della provenienza geografica (Alonso-Salces et al., 2010; Longobardi et al., 2012, Mannina et al., 2010; Marini et al., 2006, Papadia et al., 2011, Pizarro et al., 2011, Pouliarekou et al., 2011), o della cultivar (Bucci et al., 2002; Diaz et al., 2005). Si è fatto ricorso ai principi della TFA per testare la presenza o l'assenza di specifiche sostanze in matrici sottoposte ad analisi strumentali che davano luogo a notevole sovrapposizione di segnali (Lohnes et al., 1999; Miao et al., 2011; Shao et al., 2010).

CAPITOLO 2

SCOPO DELLA TESI E PIANO DI LAVORO

In considerazione del valore discriminante, ai fini dell'etichettatura, della presenza nelle miscele di oli di una quantità di olio di oliva superiore o uguale al 50%, questo lavoro si propone di verificare se sia possibile riconoscere, in miscele binarie olio di oliva – olio di semi, la quantità del 50% di olio di oliva, applicando un metodo di analisi già previsto a livello europeo: l'analisi degli esteri metilici degli acidi grassi, abbinata a procedure chemiometriche.

Considerata la notevole variabilità esistente nel profilo acidico degli oli di oliva, (v. tabella 2 e paragrafo 1.3.3.) si è proceduto, in via preliminare, alla selezione di un certo numero di campioni di olio di oliva (da utilizzare per la preparazione delle miscele), che avessero una composizione in acidi grassi il più possibile rappresentativa della reale variabilità esistente negli oli di oliva (v. paragrafo 4.1.1.).

E' stato dunque effettuato un primo lavoro sperimentale (descritto nel capitolo 4) volto essenzialmente allo studio della variabilità associata alla matrice olio di oliva, miscelando i campioni di olio di oliva precedentemente selezionati con un solo campione di olio di semi di girasole. E' stato studiato il comportamento delle miscele in un campo di concentrazione vicino al 50%, al fine di determinare, in tale campo, la minima differenza apprezzabile nella concentrazione di olio di oliva nella miscela.

I risultati della sperimentazione sono stati oggetto di una pubblicazione (Monfreda et al., 2012).

Per ciascun campione di olio di oliva sono state preparate 3 miscele: al 40%, al 50% e al 60%. E' stata analizzata la composizione in acidi grassi delle miscele così ottenute, secondo il metodo riportato negli allegati XA e XB del Reg. CEE 2568/91. Infine sono state applicate le tecniche di analisi statistica multivariata, al fine di:

- evidenziare una naturale variabilità esistente fra i gruppi contenenti il 40%, il 50% o il 60% di olio di oliva (PCA);
- identificare nelle miscele il fingerprint degli oli che le costituiscono (TFA);
- elaborare una regola di decisione che consenta di valutare se una miscela incognita possa essere ricondotta ad uno dei gruppi analizzati (SIMCA);

- costruire un modello quantitativo che consenta di determinare la percentuale di olio di oliva in una miscela contenente olio di oliva e olio di girasole (PLS).

Nel capitolo 3 vengono compiutamente descritte le tecniche di analisi statistica multivariata, utilizzate nel presente lavoro.

Il modello costruito con la sperimentazione preliminare è stato quindi ampliato con una sperimentazione successiva descritta nel capitolo 5, oggetto anch'essa di pubblicazione (Monfreda et al., 2014).

Con la seconda sperimentazione è stata aggiunta una ulteriore variabilità al problema analitico: la tipologia di oli di semi, al fine di poter creare delle regole di decisione più ampie per discriminare nelle miscele una quantità di olio di oliva pari al 50%. Le tipologie di olio di semi impiegate nella seconda sperimentazione sono state: mais, arachide, riso e vinacciolo.

In relazione ai risultati ottenuti, altro obiettivo della seconda sperimentazione è stato quello di verificare la possibilità di ridurre ulteriormente la minima differenza apprezzabile nella concentrazione di olio di oliva nel campo di concentrazione centrato sul 50%. Al sistema composto da miscele al 40%, 50% e 60% di olio di oliva, sono state quindi aggiunte anche miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva.

CAPITOLO 3

TECNICHE STATISTICHE IMPIEGATE

PER IL TRATTAMENTO DEI DATI

ANALITICI

3.1. Test F e analisi della varianza (ANOVA).

Il test F, sviluppato da Fisher agli inizi del 1900, consente di confrontare le varianze incognite σ_1^2 e σ_2^2 di due popolazioni normali, al fine di stabilire se esse siano statisticamente uguali (ipotesi nulla $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$) o differenti (al riguardo si possono formulare varie ipotesi alternative $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2; \sigma_1^2 > \sigma_2^2; \sigma_1^2 < \sigma_2^2$).

Disponendo di due campioni indipendenti di dimensione n_1 e n_2 , con varianze stimate s_1^2 e s_2^2 , (con $s_1^2 > s_2^2$), si calcola il rapporto fra tali varianze:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Se l'ipotesi nulla di uguaglianza fra varianze è vera, questa statistica si distribuisce secondo la funzione F di Fisher, il cui valore dipende da tre parametri: i gradi di libertà n_1-1 e n_2-1 e il livello di significatività prescelto α (definito come la probabilità di rigettare l'ipotesi nulla quando essa è vera). Convenzionalmente, quando si esegue un test F si riporta sempre al numeratore la varianza maggiore e al denominatore la varianza minore. L'ipotesi nulla è verificata se il rapporto tra le due varianze è minore o uguale del valore tabulato della distribuzione F in corrispondenza dei gradi di libertà n_1-1 e n_2-1 e del livello di significatività prescelto α .

Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato un valore di α pari a 0,05 e come ipotesi alternativa $H_1: \sigma_1^2 > \sigma_2^2$. Le varianze confrontate sono state considerate statisticamente differenti quando $F \geq F_{\alpha; n_1-1; n_2-1}$.

L'analisi della varianza (ANalysis Of VARiance) cerca di indagare quanta parte della variabilità di un campione sia dovuta ad uno o più specifici fattori. A questo scopo si analizzano medie di più gruppi di osservazioni attraverso il confronto fra le rispettive varianze.

La metodologia sviluppata per verificare la significatività delle differenze tra le medie aritmetiche di vari gruppi utilizza la distribuzione F. E' fondata sul rapporto tra varianze, effettuato attraverso il test F. In realtà quando le medie da confrontare sono solo due si può utilizzare il t di Student (dallo pseudonimo del suo inventore William Gosset). Se le medie sono più di due, si usa l'analisi della

varianza. Un tipico caso di utilizzo della tecnica ANOVA è quello in cui si debbano caratterizzare dei campioni suddivisi in più gruppi (nel presente lavoro di tesi, ad esempio, miscele binarie di olio di oliva e oli di semi aventi una differente percentuale di olio di oliva) e si voglia valutare la significatività di un parametro chimico nella differenziazione tra i gruppi. Un simile problema ha richiesto l'applicazione dell'ANOVA ad una via, essendo la percentuale di olio di oliva presente nelle miscele l'unico fattore di differenziazione fra i gruppi di campioni (la percentuale di olio di semi è correlata ad essa, in quanto ne è il completamento a 100).

L'ANOVA richiede la normalità delle distribuzioni e l'omogeneità delle varianze dei gruppi; scompone la varianza totale nella somma dei contributi dovuti alla varianza tra i gruppi e alla varianza entro i gruppi. Statisticamente la somma dei quadrati degli scarti dei dati dalla media generale di tutti i dati (devianza totale) può essere suddivisa nella somma dei quadrati degli scarti delle medie dei gruppi dalla media generale (devianza tra i gruppi) e nella somma dei quadrati degli scarti dei dati dalla media di ogni gruppo (devianza entro i gruppi o di errore).

$$\sum (X_{ij} - \bar{X})^2 = \sum (\bar{X}_j - \bar{X})^2 + \sum (X_{ij} - \bar{X}_j)^2$$

dove:

X_{ij} = risposta del campione i-esimo del gruppo j-esimo;

\bar{X}_j = media del gruppo j-esimo;

\bar{X} = media generale di tutti i dati.

L'analisi della varianza si basa, quindi, sulla scomposizione della variabilità dei dati e sul successivo confronto tra le varianze mediante il test statistico *F di Fisher*, la cui distribuzione campionaria è nota.

$$F = \frac{\text{devianza tra i gruppi} / \text{g.d.l.}}{\text{devianza entro i gruppi} / \text{g.d.l.}}$$

g.d.l. = gradi di libertà.

La scomposizione si applica anche ai gradi di libertà:

$$(N-1) = (k-1) + (N-k)$$

g.d.l. totali	g.d.l. tra i gruppi	g.d.l. entro i gruppi
------------------	------------------------	--------------------------

dove:

N = numero dei campioni;

k = numero dei gruppi.

Se l'ipotesi nulla è vera, cioè non ci sono differenze significative tra le medie, allora la variabilità tra i gruppi e quella entro i gruppi saranno statisticamente uguali. Per l'applicazione utilizzata nel presente lavoro di tesi, l'assenza di differenze significative tra le medie indica che le variabili chimiche utilizzate non sono significative per la discriminazione tra i gruppi di miscele contenenti differenti percentuali di olio di oliva.

Se l'ipotesi nulla è falsa, allora la variabilità tra i gruppi sarà maggiore della variabilità entro i gruppi, quindi le variabili in esame potranno essere utilizzate per la discriminazione fra i gruppi di campioni in funzione della quantità di olio di oliva in essi contenuta.

3.2. Analisi statistica multivariata.

I dati analitici vengono prodotti per caratterizzare gli oggetti. Tale caratterizzazione è immediata qualora ogni oggetto venga descritto da pochi dati o variabili, mentre diventa più complessa se per ciascun oggetto vengono generati molti dati. La risoluzione di questo genere di problemi richiede un approccio di tipo multivariato: i dati ottenuti devono essere trattati simultaneamente e non in maniera separata o individuale. In altri termini il valore del parametro a deve essere considerato in relazione al valore assunto dal parametro b , e così via. Punto di partenza nell'analisi statistica multivariata è la matrice dei dati:

	m variabili			
n campioni	X ₁₁	X ₁₂	...	X _{1m}
	X ₂₁	X ₂₂	...	X _{2m}

	X _{n1}	X _{n2}	...	X _{nm}

Oggetti (o campioni) caratterizzati da 2 o 3 variabili possono essere gestiti e analizzati in modo piuttosto diretto, in quanto visualizzabili direttamente in grafici semplici, ma la capacità umana di riconoscere configurazioni è limitata ad uno spazio a tre dimensioni. Ne consegue che se per ciascun oggetto o campione vengono misurate m variabili o caratteristiche, si rende necessario ridurre l'informazione, contenuta nello spazio m -dimensionale, in uno spazio a 2 o 3 dimensioni, per consentire il riconoscimento di profili o configurazioni.

Le tecniche di "pattern recognition", ovvero di riconoscimento dei profili (o delle forme), si dividono essenzialmente in tecniche di tipo "unsupervised" e tecniche di tipo "supervised".

Le tecniche "unsupervised", dette anche di analisi esplorativa, tra le quali rientrano l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) e i metodi di clustering, mirano essenzialmente a estrarre la massima informazione contenuta nei dati. Con queste tecniche si cerca la direzione di varianza massima dei dati e si ottengono

come *output* delle rappresentazioni grafiche che consentono di evidenziare eventuali raggruppamenti naturali presenti nei campioni o oggetti senza che venga fatta alcuna forzatura del sistema.

Le tecniche di tipo “supervised”, tra le quali rientrano i metodi di classificazione e di class-modeling, utilizzano invece delle informazioni aggiuntive: la suddivisione dei campioni in classi. Per classe si intende un insieme di oggetti accomunati da valori uguali di variabili discrete o da valori vicini di variabili continue (nel presente lavoro di tesi le classi sono costituite da miscele aventi la medesima percentuale di olio di oliva). Le tecniche di tipo “supervised” si rivelano particolarmente efficaci nell’evidenziare la capacità del sistema (costituito da n campioni, ciascuno descritto da m variabili) di raggruppare i campioni in base alla classe di appartenenza e quindi di poter associare un eventuale campione incognito a una delle classi studiate. Questi output vengono definiti in termini probabilistici come la capacità di classificazione e la capacità di predizione del modello.

Nell’ambito delle tecniche di tipo “supervised” rientrano anche i metodi di regressione, finalizzati all’ottenimento di relazioni quantitative tra una o più proprietà dei sistemi ed un certo numero di variabili misurate. I metodi di regressione non sono deputati al riconoscimento dei profili; non sono dunque delle tecniche di “pattern recognition” (Breerton, 2003).

3.2.1. Analisi delle componenti principali (PCA)

L’analisi delle componenti principali compare nella letteratura scientifica agli inizi del 1900, sebbene tale approccio fosse già conosciuto nel campo della fisica e della matematica. Probabilmente il primo lavoro più noto fu pubblicato da Pearson nel 1901. E’ comunque generalmente accettato che una vera e propria rivoluzione nell’utilizzo dei metodi multivariati si deve ai lavori di Hotelling, pubblicati negli anni 1930 e 1940 nell’ambito della psicometria.

La PCA estrae l’informazione prevalente e sistematica delle variabili che descrivono il sistema, mediante una rotazione dello spazio originale in uno spazio costruito in modo che ciascuna nuova variabile (componente principale, PC) sia ortogonale rispetto alle altre e che ciascuna nuova variabile spieghi la massima

frazione possibile di varianza dei dati non ancora spiegata dalle componenti principali precedenti.

Le componenti principali sono delle combinazioni lineari delle variabili originali allineate di volta in volta lungo la direzione di massima varianza. La prima componente principale è nella direzione di massima variabilità dei dati, la seconda è non correlata con la prima (i due assi sono geometricamente perpendicolari) e spiega la massima frazione di varianza residua, e così via. Si calcolano tante componenti quante sono le variabili originali del data set, fino ad esaurire la varianza (informazione) presente nei dati.

$$\begin{aligned}
 u_1 &= v_{11} x_1 + v_{12} x_2 + \dots + v_{1m} x_m \\
 u_2 &= v_{21} x_1 + v_{22} x_2 + \dots + v_{2m} x_m \\
 &\dots \\
 u_m &= v_{m1} x_1 + v_{m2} x_2 + \dots + v_{mm} x_m
 \end{aligned}$$

In notazione matriciale: $U = X * V'$

dove:

$$X = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1m} \\ x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{nm} \end{bmatrix} \quad \text{matrice dei dati}$$

$$V = \begin{bmatrix} v_{11} & v_{12} & \dots & v_{1m} \\ v_{21} & v_{22} & \dots & v_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ v_{m1} & v_{m2} & \dots & v_{mm} \end{bmatrix} \quad \text{matrice dei coefficienti di peso} \\
 \text{detti anche } \textit{loadings}$$

$$U = \begin{bmatrix} u_{11} & u_{12} & \dots & u_{1m} \\ u_{21} & u_{22} & \dots & u_{2m} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ u_{n1} & u_{n2} & \dots & u_{nm} \end{bmatrix} \quad \text{matrice delle componenti} \\
 \text{principali, dette anche } \textit{scores}$$

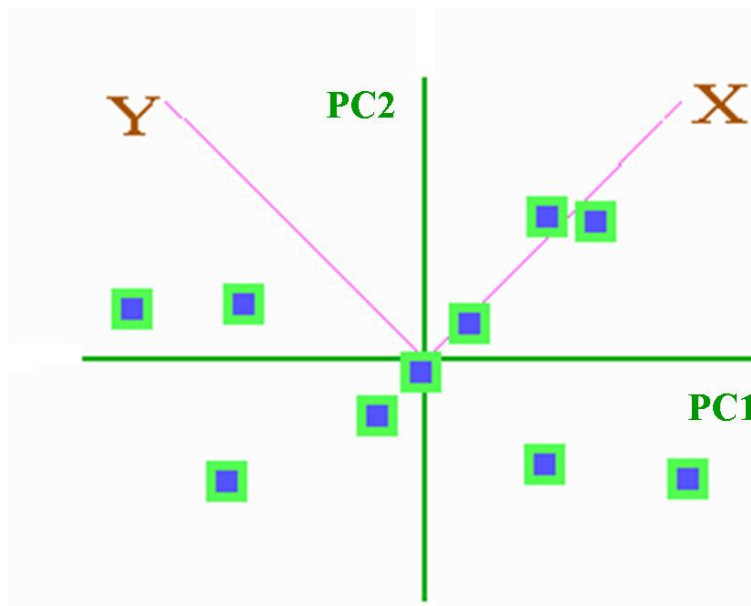


Figura 4: rappresentazione grafica di componenti principali in un sistema bidimensionale

In figura 4 sono schematicamente rappresentate le componenti principali ottenute per un insieme di oggetti rappresentati in un sistema bidimensionale descritto dagli assi x e y , dal quale sono state ottenute pertanto 2 componenti principali. La PC1 è orientata nella direzione di massima variabilità (o dispersione dei punti) e la PC2 è ortogonale alla PC1. Si nota come la PC1 e la PC2 siano ottenute per semplice rotazione degli assi x e y .

Ciascuna componente principale identifica quindi una direzione nello spazio delle variabili originali ed è definita mediante i *loadings*, ovvero dei coefficienti che indicano il peso di ciascuna variabile originale su una determinata PC. Quando il *loading* della variabile j -esima nella componente principale k -esima è molto elevato, significa che la variabile j -esima è molto rilevante nella definizione della componente k -esima. Quando invece si verifica la situazione opposta, la variabile j -esima non contribuisce in modo significativo a definire la componente principale k -esima.

I loadings o autovettori sono pertanto i coefficienti moltiplicativi delle variabili nelle combinazioni lineari che definiscono le componenti principali.

In molte tecniche di analisi chemiometrica è fondamentale effettuare un pretrattamento delle variabili. Spesso esse hanno unità di misura diverse; bisogna inoltre considerare che, in assenza di idoneo pretrattamento, il contributo legato a

variabili che variano in un intervallo maggiore potrebbe risultare predominante, tanto da rendere trascurabile l'informazione portata dalle variabili il cui intervallo di variazione è minore. La scalatura consiste nel rendere omogenee variabili che in partenza non lo sono. Le principali tecniche di scalatura dei dati sono:

- il *centraggio di colonna* che consiste nel sottrarre ad ogni variabile il suo valore medio: $y_{iv} = x_{iv} - x_{im}$. I dati centrati hanno media zero e varianza uguale a quella dei dato originali. La nuova origine della scala di ciascuna variabile coincide con la media della variabile prima del centraggio.
- l'*autoscaling*: sottrazione del valore medio della variabile e divisione per la relativa deviazione standard: $y_{iv} = (x_{iv} - x_{im}) / s_v$. I dati autoscalati hanno media zero e varianza unitaria. Questo tipo di scalatura rende omogenee le variabili nei confronti della quantità di informazioni che contengono, mentre con il centraggio le variabili che variano in un intervallo più ampio avranno un peso maggiore rispetto a quelle i cui valori sono compresi in un intervallo più ristretto.

Per la determinazione delle componenti principali è necessario innanzitutto il calcolo della matrice di correlazione dei dati (nel caso di variabili sottoposte ad autoscaling; in assenza di questo tipo di standardizzazione si calcola la matrice di varianze-covarianze):

$$R = \begin{bmatrix} 1 & s_{12}/(s_1*s_2) & \dots & s_{1m}/(s_1*s_m) \\ s_{21}/(s_1*s_2) & 1 & \dots & s_{2m}/(s_2*s_m) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ s_{n1}/(s_1*s_n) & s_{1n}/(s_1*s_n) & \dots & 1 \end{bmatrix}$$

dove s_{ij} = covarianza tra le variabili i e j ; s_i = deviazione standard associata alla variabile i .

Vengono quindi calcolati gli autovalori (λ) della matrice R che soddisfano l'equazione $|R - \lambda I| = 0$. In corrispondenza di ciascun valore di λ verrà quindi calcolato il relativo autovettore. Gli autovettori individuano i loadings di una

componente principale, mentre ciascun autovalore ne misura la varianza. Ne consegue che il rapporto tra ciascun autovalore e la somma degli autovalori rappresenta la frazione di variabilità totale spiegata da una determinata componente principale.

La PCA è una tecnica di analisi statistica multivariata molto potente, in quanto il procedimento di calcolo – basato sul principio secondo cui ciascuna componente principale successiva deve essere ortogonale alle precedenti e spiegare al tempo stesso la massima varianza possibile – fa sì che ciascuna componente principale raggruppi al suo interno tutta l'informazione comune a variabili diverse. Ad esempio, se x_1 e x_3 descrivono lo stesso aspetto di un set di dati, la loro informazione finirà nella stessa componente principale che spiegherà la varianza di due variabili (x_1 e x_3) anziché di una variabile sola. Lo stesso accade se soltanto una parte di x_1 e x_3 descrivono lo stesso aspetto di dati: questa parte comune viene estratta e compressa in un'unica componente principale.

Questa operazione di eliminazione dell'informazione ridondante, ossia dell'informazione supportata da più variabili, spesso permette di associare ciascuna componente principale ad una macroproprietà del sistema studiato. In altri termini tutte le informazioni dello stesso tipo vengono raggruppate nella stessa variabile.

La riduzione della ridondanza dei dati porta automaticamente ad una riduzione della dimensionalità del problema. In tal modo è possibile analizzare visivamente una larga porzione della varianza, originariamente distribuita nelle variabili di partenza, mediante diagrammi di dispersione che riportano, per i campioni, i valori delle componenti principali, detti anche *scores*, anziché le variabili originali. Le PC costituiscono pertanto delle nuove proprietà, molto sintetiche e rappresentative, che possono essere utilizzate in luogo di quelle originali per descrivere i campioni. I grafici in cui vengono rappresentati i campioni (o gli oggetti) nel piano o nello spazio definiti da 2 o 3 componenti principali sono detti *scores plots*. L'informazione contenuta negli *scores plots* è sicuramente molto più ricca rispetto a quella contenuta in grafici bidimensionali o tridimensionali definiti da 2 o 3 variabili originali, poiché le componenti principali contengono i contributi dell'informazione presente in tutte le variabili misurate.

Nell'applicazione della PCA ad un caso reale è necessario scegliere un numero di componenti principali significative per la descrizione del sistema. Nella pratica, la significatività statistica deve accompagnarsi alla significatività ai fini del problema specifico che si deve risolvere. I metodi di riduzione o selezione delle componenti significative considerano che la variabilità associata all'informazione "utile" sia significativamente maggiore della variabilità associata al rumore sperimentale o a informazioni secondarie. Il numero di componenti significative può essere determinato in base al numero dei fattori la cui varianza cumulata è uguale ad una percentuale prestabilita (sono accettabili valori intorno al 70 - 80%); oppure si possono considerare significativi tutti quei fattori i cui autovalori sono maggiori del valore medio degli autovalori (che sarà uguale ad 1 nel caso di variabili autoscalate). Il numero di componenti significative può essere determinato anche graficamente, rappresentando il valore associato agli autovalori corrispondenti a ciascuna componente principale (figura 5). Si sceglieranno le prime p componenti per le quali si osserva una drastica variazione nella pendenza della curva.

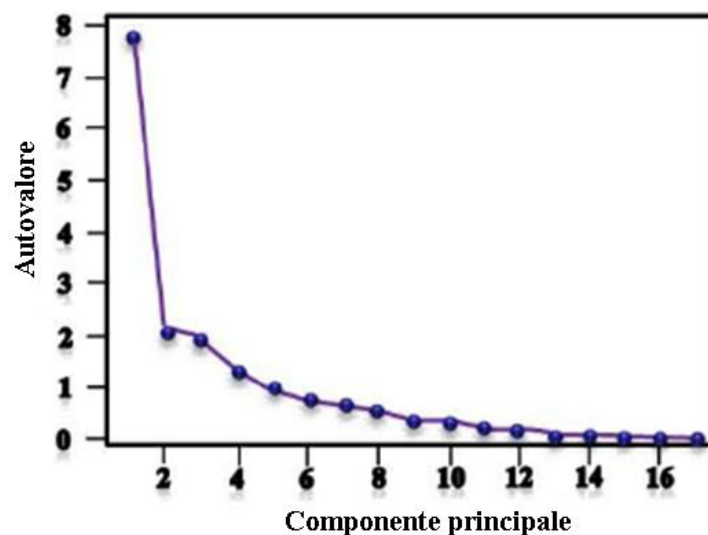


Figura 5: rappresentazione grafica degli autovalori associati a ciascuna componente principale

E' possibile inoltre analizzare graficamente il ruolo di ciascuna variabile nelle diverse componenti e le correlazioni tra le variabili stesse (figura 6): nel piano definito da 2 componenti principali ciascuna variabile è rappresentata attraverso la coppia di valori dei *loadings* che essa ha rispetto a tali componenti.

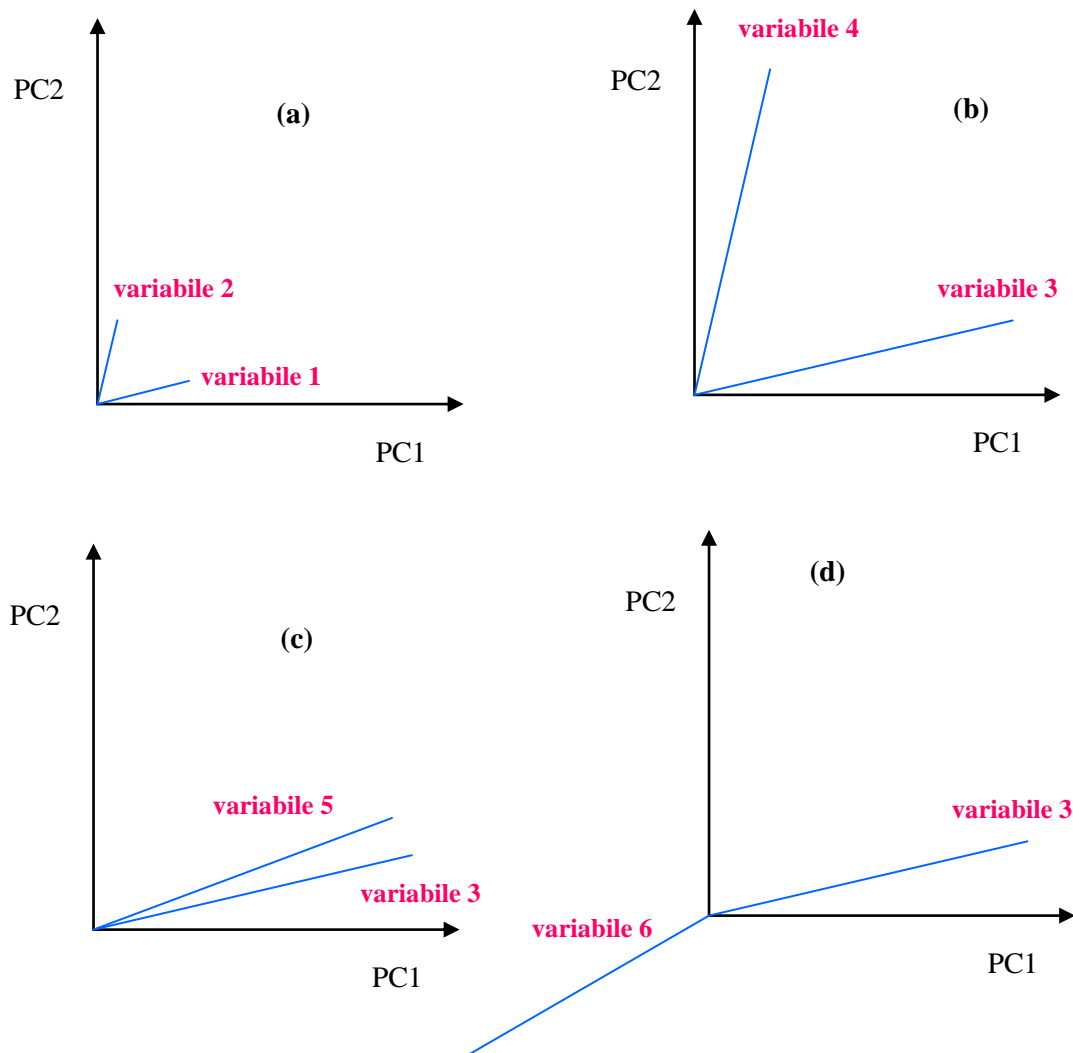


Figura 6: esempi di loading plots

Variabili la cui proiezione sugli assi è molto vicina all'origine non hanno un peso significativo sulle due componenti principali scelte (v. figura 6(a)); l'informazione portata da tali variabili è sicuramente presente in qualche altra componente principale. Variabili la cui rappresentazione grafica ha una proiezione significativa su una delle due componenti sono molto determinanti nella definizione di quella componente (nella figura 6(b) la variabile 3 ha un peso rilevante per la PC1 e la variabile 4 ha un peso rilevante per la PC2). Gruppi di variabili che compaiono vicine nel grafico indicano variabili tra loro correlate positivamente e che portano di conseguenza lo stesso tipo di informazione (v. figura 6(c)). Analogamente, le variabili che compaiono in posizione opposta rispetto al centro degli assi di riferimento sono correlate negativamente (v. figura

6(d)). I grafici che rappresentano i loadings delle variabili rispetto alle componenti principali sono detti *loadings plot*, mentre i grafici che riportano sia i loadings che gli scores sono detti *biplot*.

3.2.2. Target factor analysis (TFA)

L'analisi fattoriale o Target Factor Analysis (TFA) consiste in una serie di tecniche statistiche che consentono di ottenere una riduzione della complessità del numero dei fattori che spiegano un fenomeno. E' un'estensione dell'analisi delle componenti principali che si pone come obiettivo di descrivere, se possibile, le molte variabili osservate in funzione di poche variabili sottostanti non osservabili (latenti) cui si dà il nome di "fattori".

Affonda le sue radici nei tentativi di inizio XX secolo, ad opera di Karl Pearson e Charles Spearman, volti a definire e misurare l'intelligenza.

Come si è visto, uno dei problemi principali dell'analisi delle componenti principali è legato alla determinazione del numero di componenti significative in un sistema (fattori): nel presente lavoro di tesi, ad esempio, ci si è interrogati sul numero e sulla natura dei componenti puri costituenti una miscela. Mentre le componenti principali sono degli oggetti astratti, ai fattori è associato un significato fisico. Si tratta tuttavia di variabili "latenti" in quanto non sono direttamente misurabili nella realtà e costituiscono un insieme più ristretto e riassuntivo rispetto al numero di variabili di partenza.

La TFA è dunque una tecnica di analisi statistica multivariata particolarmente utile allo studio di miscele di campioni "puri", in quanto consente di estrarre il numero p di fattori significativi che corrisponderanno al numero di campioni puri utilizzati per produrre le miscele.

La PCA consente di esprimere la matrice dei dati X_{nm} , costituita da n oggetti ed m variabili, come il prodotto delle matrici degli scores e loadings relativi a p fattori astratti (statisticamente significativi), addizionata di una matrice di errore E_{nm} .

$$X_{nm} = S_{np} L_{pm} + E_{nm}$$

Il numero di componenti significative p , ottenute dalla PCA, indica che p fattori reali, detti anche oggetti puri, sono stati mescolati per produrre gli n oggetti.

Ciascun oggetto puro può essere descritto mediante un vettore riga costituito da m variabili; si può quindi indicare con A_{pm} la matrice dei fattori reali (che è ovviamente differente dalla matrice dei fattori astratti L_{pm}). La matrice dei dati (X_{nm}) può pertanto essere espressa altresì in funzione della matrice dei fattori reali, considerando anche in questo caso un errore sperimentale, rappresentato dalla matrice: E_{nm}^* .

$$X_{nm} = C_{np} A_{pm} + E_{nm}^*$$

E' possibile dunque individuare un iperpiano, m -dimensionale, definito dalle p componenti significative, che deve contenere sia gli n oggetti, sia gli oggetti puri, a meno dell'errore sperimentale.

Viene stimata la varianza media associata agli n oggetti utilizzati per calcolare il modello: tale varianza è una misura della distanza dall'iperpiano (definito dalle p componenti significative) ascrivibile alle componenti non significative (dalla componente $p+1$ alla componente m). La TFA stima inoltre la distanza dal data base di ciascuno degli "oggetti puri potenziali" come varianza residua dal piano delle componenti significative. In figura 7 è riportata una rappresentazione grafica delle distanze degli oggetti dal piano definito dalle componenti significative.

Le varianze residue associate agli "oggetti puri potenziali" vengono confrontate, attraverso un *test F* (descritto nel paragrafo 3.1), con la varianza media (rispetto all'iperpiano) degli oggetti utilizzati per calcolare il modello. La distanza critica d_{crit} è la varianza residua corrispondente al valore critico F per un determinato livello di confidenza e può essere utilizzata come criterio per selezionare gli oggetti puri.

Conoscendo esattamente la composizione dei campioni puri da cui potrebbero essere state ottenute le miscele, la TFA consente così di individuare se un particolare campione puro sia stato utilizzato per produrre la miscela, mediante una valutazione della varianza residua dall'iperpiano definito dalle p componenti significative. Agli oggetti puri è associato il valore minimo di tale varianza residua (oggetti B, C e D in figura 7).

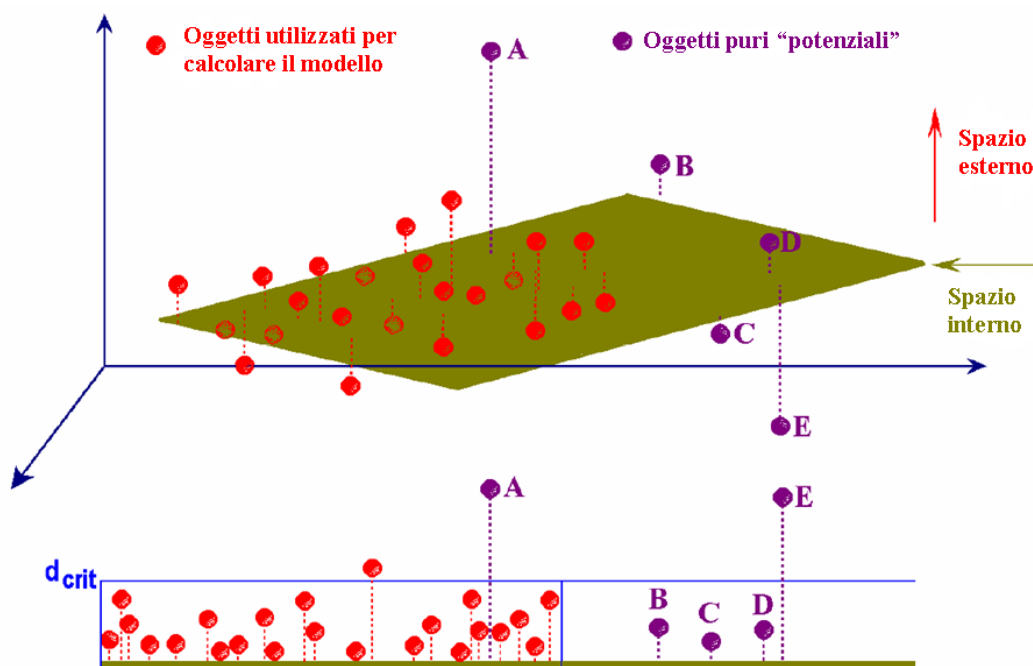


Figura 7: rappresentazione grafica delle distanze degli oggetti dal piano definito dalle componenti significative

3.2.3. Soft independent modelling of class analogy (SIMCA)

Le tecniche “supervised pattern recognition” hanno come obiettivo la classificazione dei campioni, fondamentale per l’analisi statistica multivariata; tale obiettivo è essenziale per identificare differenti raggruppamenti di campioni, stabilire a quale raggruppamento possa appartenere un campione incognito, ovvero se un campione è paragonabile a degli standard di riferimento.

Un *training set* di campioni appartenenti a delle classi note viene usato per costruire un modello matematico che classifichi correttamente i campioni stessi. Rispetto all’Analisi delle Componenti Principali la suddivisione dei campioni in classi di appartenenza viene imposta a priori. Una volta ottenute le funzioni matematiche, si verifica la capacità del modello di predire le classi di appartenenza dei campioni. In buona sostanza si valuta la *capacità di classificazione* del modello attraverso la percentuale di campioni del *training set* classificata correttamente. L’utilizzo del *training set* per valutare la capacità predittiva del modello fornisce inevitabilmente dei risultati ottimistici, in quanto il modello stesso è stato costruito utilizzando i dati del *training set*. Per tale ragione i metodi *supervised* necessitano di uno step di *validazione*, consistente nella

verifica della *capacità di predizione* mediante l'uso di un diverso set di dati (*test set*). Il *test set* è normalmente costituito da campioni che non sono stati inseriti nel *training set* e vengono quindi trattati come campioni appartenenti ad una classe incognita, al fine di confrontare la classe assegnata dal modello con quella di appartenenza, nota a priori. La capacità di predizione può anche essere stimata in *cross validation*: si costruisce un certo numero di modelli parziali sottraendo un gruppo di campioni per volta dal *training set*. Il gruppo di campioni eliminati, detto anche *gruppo di cancellazione*, costituirà il *test set* del modello parziale costruito di volta in volta. In questo modo le capacità predittive del modello saranno testate su tutti i campioni, man mano che essi vengono sottratti dal *training set*, mentre il modello finale risulterà costruito con tutti i campioni. Una estremizzazione della *cross validation* è il metodo *leave-one-out*: i campioni del training set vengono uno alla volta sottratti da questo, e il modello parziale è ottenuto da un data set costituito da tutti i campioni del training set ad eccezione di quello cancellato. E' importante tuttavia considerare che il *leave-one-out* produce delle capacità predittive molto ottimistiche in quanto i modelli parziali vengono calcolati con un numero elevato di dati, a fronte dei quali viene richiesta la predizione di un solo campione. Ne consegue che possono essere ottenute predizioni più realistiche con gruppi di cancellazione con una numerosità diversa da uno.

Come si è visto nel paragrafo 3.2., i metodi di classificazione e le tecniche di class-modelling rientrano tra le tecniche "*supervised pattern recognition*".

I metodi di classificazione nascono nel 1936 con una pubblicazione di Fisher nella quale era applicata l'analisi discriminante lineare (LDA). Le basi del Soft independent modelling of class analogy (SIMCA), tecnica di class-modelling utilizzata nel presente lavoro di tesi, furono gettate da Wold nel 1976.

Il SIMCA (e in generale le tecniche di class-modelling) presenta alcuni vantaggi rispetto alle tecniche di classificazione, quali la LDA. Innanzitutto vengono costruiti dei veri e propri modelli per ciascuna classe studiata; il modello riesce quindi a discriminare la classe studiata da tutto quello che non vi appartiene. Nei metodi di classificazione vengono invece costruite delle funzioni matematiche che fungono da delimitatori delle classi studiate; si tratta di funzioni che mirano a "tracciare la linea di confine" tra le classi studiate. In figura 8 è possibile

visualizzare graficamente la principale differenza esistente fra tecniche di classificazione (figura 8(a)) e tecniche di regressione (figura 8(b)).

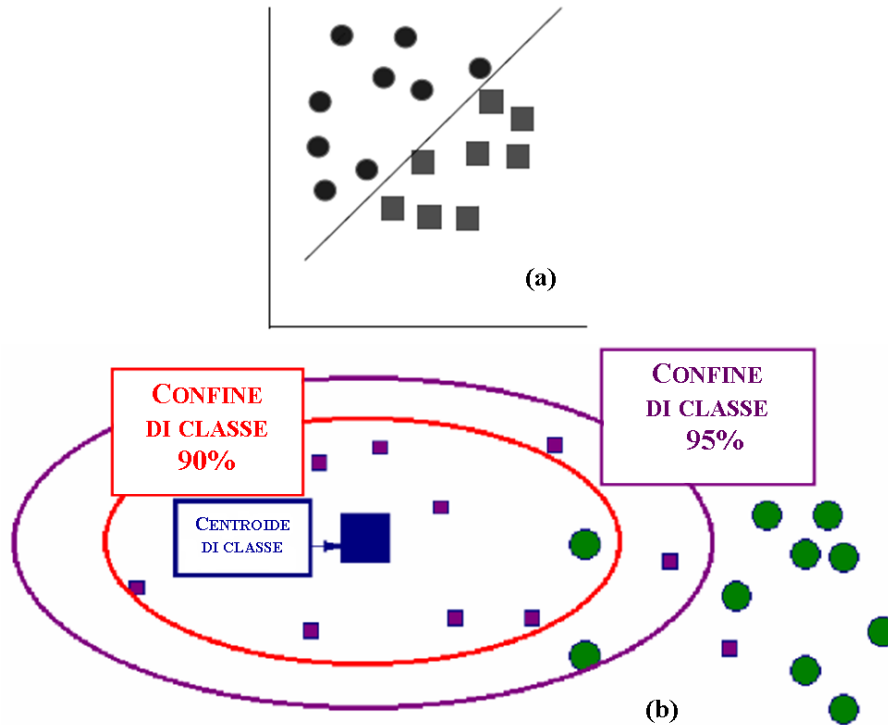


Figura 8: visualizzazione grafica della discriminazione fra due classi con metodo di classificazione (a) e costruzione di un modello di classe con tecnica di class-modelling (b)

Ne consegue che il SIMCA, delimitando i confini di ogni classe, è in grado di riconoscere campioni appartenenti sia alle classi modellate, che alle classi non analizzate; in altri termini è in grado di riconoscere *outlier*. L'analisi discriminante, o più in generale i metodi di classificazione, tendono invece a classificare qualunque campione incognito in una delle classi studiate; tale proprietà nei casi reali può rivelarsi discutibile. Si pensi ai problemi di discriminazione geografica, quando si analizza un campione che abbia una origine diversa da quelle studiate: il modello discriminante tende comunque a classificarlo in una delle classi analizzate.

Il SIMCA individua inoltre delle zone di sovrapposizione fra i modelli delle classi, mentre l'analisi discriminante classifica i campioni alternativamente in una classe o in un'altra. Rispetto ai metodi di classificazione, il SIMCA può fornire

come output la classificazione di un oggetto in più di una classe (se cade nella zona di sovrapposizione), oppure in nessuna delle classi modellate.

Il primo step del SIMCA consiste nel modellare, attraverso la PCA, ciascuna classe o categoria indipendentemente dalle altre. Il modello matematico di ciascuna classe si basa quindi sulle proprie componenti principali significative, il cui numero può essere differente per ciascuna categoria. In figura 9 sono rappresentati, ad esempio, due gruppi di oggetti, uno descritto da una retta (quindi soltanto dalla prima componente principale) mentre l'altro è individuato da un piano (quindi descritto dalle prime due componenti principali). E' necessario rimuovere eventuali *outliers*, soprattutto se si ritiene che esista un numero maggiore di classi rispetto a quanto sia noto a priori.

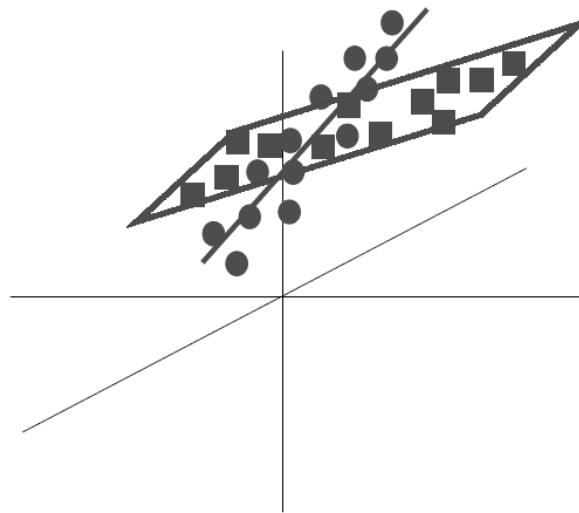


Figura 9: rappresentazione di due gruppi di oggetti descritti dalle rispettive componenti principali significative

Il numero di componenti principali significative definisce lo spazio interno di una classe che viene delimitato dal range di variazione degli scores (*normal range* se tal quale, oppure *expanded range* se si amplia il *normal range* di una quantità pari alla deviazione standard degli scores, utile nel caso le classi siano costituite da pochi campioni) e dalla *deviazione standard residua della classe* (che misura la dispersione degli oggetti del *training set* rispetto al modello matematico della classe).

Ottenuti i modelli di ciascuna classe, il SIMCA calcola la *distanza di classe* di un oggetto, definita come la distanza geometrica dal modello delle componenti principali (figura 10). Un campione incognito avrà maggiore compatibilità con la classe situata a minore distanza dallo stesso.

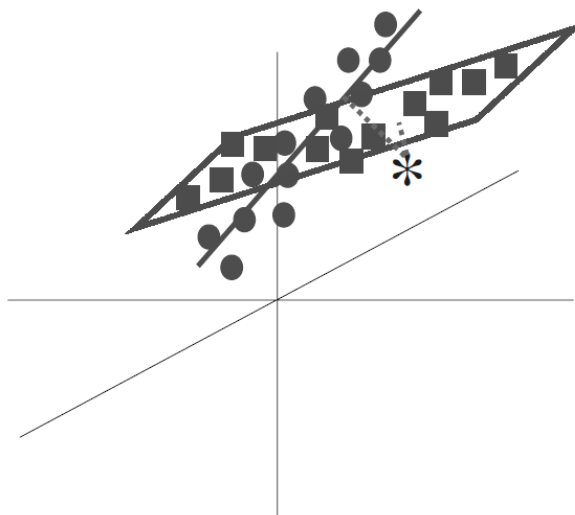


Figura 10: rappresentazione grafica della distanza di un oggetto incognito (rappresentato con asterisco) da due classi rappresentate in figura 9.

Nella realtà viene effettuata una valutazione statistica, in ordine alla quale un campione rientra in una specifica classe se la distanza dal modello non è significativamente diversa dalla deviazione standard residua della classe ad un determinato livello di fiducia prescelto.

La qualità dell'output ottenuto dalle tecniche di class-modelling può essere valutata attraverso i seguenti parametri:

- *Sensibilità*: è la percentuale di oggetti di una classe correttamente accettata dal modello.
- *Specificità*: è la percentuale di oggetti di categorie differenti correttamente rifiutati dal modello della classe.

I risultati ottenuti dall'applicazione del SIMCA possono infine essere visualizzati attraverso i Cooman's plot (Coomans et al., 1984), che rappresentano la distanza degli oggetti rispetto a due classi. L'area del grafico è suddivisa in quattro porzioni da due linee perpendicolari tracciate al livello di significatività prescelto (figura 11).

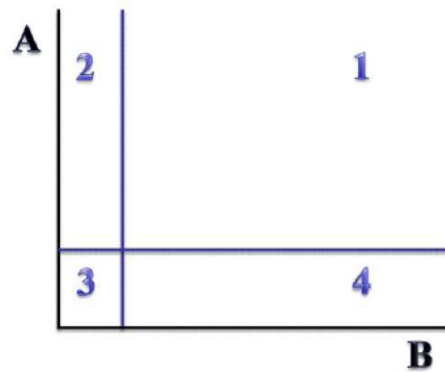


Figura 11: Cooman's plot

Come è possibile vedere dalla figura 11, la porzione indicata con il numero 1 rappresenta la regione in cui gli oggetti non vengono assegnati a nessuna delle due classi. La regione 2 conterrà gli oggetti assegnati alla classe B, nella regione 3 saranno ricompresi gli oggetti assegnati ad entrambe le classi, mentre la regione 4 comprenderà gli oggetti attribuiti alla classe A.

3.2.4. Partial least squares (PLS)

In un modello di regressione lineare univariato: $Y = aX + b$, si assume l'esistenza di una relazione lineare tra un parametro osservato Y (ad esempio assorbanza, area di un picco) e il parametro X (ad esempio la concentrazione). L'obiettivo di una regressione è quello di determinare una funzione che computi la grandezza X a partire dalla proprietà del sistema misurata Y , mediante la determinazione dei parametri a e b .

Nei modelli di regressione lineare multipla si dispone di misure condotte su m variabili indipendenti (X_1, X_2, \dots, X_m) per ciascuna variabile dipendente Y_i :

$$Y_i = a_0 + a_1 X_1 + a_2 X_2 + \dots + a_m X_m \quad i = 1, 2, \dots, n$$

Nella calibrazione multivariata si cerca normalmente di predire una (o più) proprietà chimica (Y_i), ad esempio la concentrazione di un componente nello spettro di una miscela, attraverso la valutazione di un certo numero di proprietà strutturali del sistema (X_1, X_2, \dots, X_m , ad esempio le assorbanze della miscela in un determinato intervallo spettrale). Nel presente lavoro di tesi si è mirato a predire la quantità di olio di oliva in una miscela con altri oli vegetali, attraverso la valutazione della composizione in acidi grassi delle miscele analizzate. Le tecniche di calibrazione multivariata sono dunque delle tecniche di calibrazione

inversa, nella quale, a differenza delle tecniche di calibrazione classiche, la variabile Y è costituita dalla grandezza che si intende stimare attraverso la misura delle proprietà X del sistema.

La regressione ai minimi quadrati (*Ordinary Least Squares*, OLS) risolve un sistema di n equazioni lineari, in cui sono incogniti gli $m + 1$ coefficienti di regressione $a_0, a_1, a_2, \dots, a_m$ corrispondenti ad ogni variabile predittiva più l'intercetta, minimizzando la varianza dell'errore.

La regressione ai minimi quadrati è possibile solo se il numero di campioni disponibili è superiore al numero di variabili predittive; infatti se $n < m$ il sistema non è risolvibile in modo univoco, ma si hanno infinite soluzioni. Altro limite del metodo OLS è l'impossibilità della gestione di variabili tra esse fortemente correlate e affette da rumore.

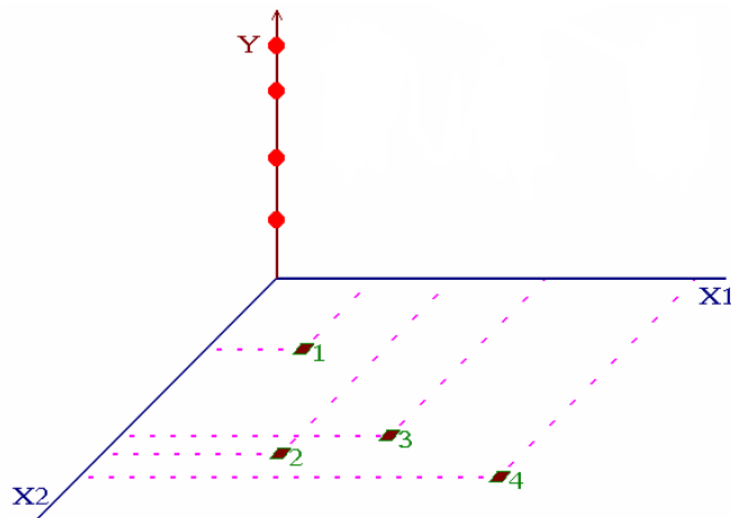


Figura 12: rappresentazione grafica di un sistema formato da 4 campioni, due predittori (variabili indipendenti X_1 e X_2) e una variabile risposta Y .

La regressione Partial Least Squares consente di superare i limiti del metodo OLS. Il PLS determina la dimensione effettiva del sistema e coglie la struttura delle correlazioni tra le variabili; questo avviene mediante la definizione delle variabili latenti (LV), tra esse ortogonali; le variabili latenti, in numero inferiore alle variabili originali, costituiscono le direzioni del nuovo iperpiano, di dimensioni ridotte rispetto alle dimensioni del processo, ma comunque in grado di descrivere i dati. Le variabili latenti sono dunque una combinazione lineare delle variabili originali. Esse vengono costruite utilizzando il criterio della massima covarianza

tra la variabile risposta e le variabili originali (massima variabilità tra le variabili, che sia correlata con la risposta). Le variabili latenti consentono, analogamente alle componenti principali significative, di utilizzare un numero inferiore di variabili le quali sono legate a caratteristiche intrinseche del sistema, difficilmente misurabili e talvolta anche di incerta individuazione.

Supponendo di avere un sistema composto da due predittori (variabili indipendenti x_1 e x_2) e una variabile risposta y (figura 12), la strategia PLS può essere rappresentata come segue:

- 1) Regressione dei due predittori rispetto alla variabile risposta: $x_1 = c_1 + d_1 y$ e $x_2 = c_2 + d_2 y$.
- 2) Normalizzazione delle pendenze: $w_1 = \frac{1}{d_1}$; $w_2 = \frac{1}{d_2}$.
- 3) Definizione della variabile latente t come combinazione lineare dei due predittori, mediante i coefficienti pesati: $t = w_1 x_1 + w_2 x_2$ (figura 13).
- 4) Elaborazione del modello di regressione della risposta in funzione della variabile latente: $y = e + f t$. I residui vengono utilizzati per calcolare le altre variabili latenti.

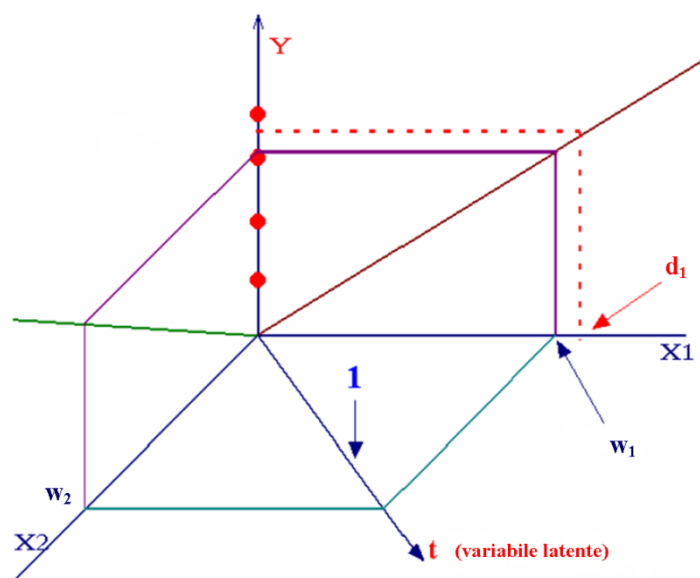


Figura 13: rappresentazione grafica della costruzione di una variabile latente.

Si ottiene la *forma chiusa* del modello quando la risposta y (calcolata in funzione delle variabili latenti) viene espressa in funzione delle variabili originarie x_1 e x_2 .

Nella costruzione di un modello PLS è necessario valutare il numero ottimale di variabili latenti da utilizzare; ciò può essere fatto attraverso la *cross-validation*. È possibile quindi osservare l'andamento dell'errore in predizione del modello in funzione del numero di variabili latenti utilizzate per la sua costruzione. In effetti anche i metodi di regressione multivariata, analogamente ai metodi di classificazione e class-modelling, necessitano di uno step di *validazione* per verificarne l'abilità predittiva. In questo lavoro di tesi le regressioni mediante PLS sono state valutate utilizzando i seguenti parametri:

- *SDEP* (standard error of prediction): è l'errore commesso in cross-validation derivante dalla predizione della variabile risposta nei campioni facenti parte del gruppo di cancellazione e quindi non utilizzati nella costruzione del modello parziale. In pratica il parametro SDEP viene calcolato per un numero di volte pari a quello dei gruppi di cancellazione, quindi il modello è stato valutato mediante il *valore medio di SDEP*. Tale parametro, essendo di fatto uno scarto tipo, ha le stesse dimensioni della variabile risposta.
- *Deviazione standard di SDEP e deviazione standard della media di SDEP*: due parametri di dispersione che indicano la stabilità del modello; valori bassi indicano una variazione poco significativa tra i modelli parziali ottenuti con i differenti gruppi di cancellazione.
- *RMSEP* (*root mean square error of prediction*) (Kowalski et al., 1991; Massart et al., 1997): esprime l'errore che il modello commette nel predire i valori del set di calibrazione esterno (si tratta di un terzo set non usato per calcolare il modello). Anche tale parametro è uno scarto tipo, quindi ha le stesse dimensioni della variabile risposta.

CAPITOLO 4

SPERIMENTAZIONE PRELIMINARE:
STUDIO DI MISCELE DI OLI DI OLIVA
E OLIO DI GIRASOLE

4.1. Materiali e metodi

4.1.1. Selezione dei campioni

La selezione dei campioni utilizzati per il presente lavoro di tesi è stata preceduta dallo studio dei profili acidici di 241 campioni di oli di oliva.

In tabella 4 è riportata la sintesi dei dati relativi al profilo acidico di tali campioni: in particolare, per ciascun acido grasso, sono riportati il valore medio riscontrato sui 241 campioni, lo scarto tipo, il valore minimo e massimo nonché il range di variabilità, espresso come differenza tra il valore massimo e il valore minimo della percentuale di ciascun acido grasso.

	Media	Dev.st	Min	Max	Range
Miristico	0,010	0,004	0,000	0,038	0,04
Palmitico	12,09	2,12	9,49	18,98	9,50
Palmitoleico	1,15	0,44	0,58	2,54	1,96
Margarico	0,05	0,02	0,00	0,12	0,12
Margaroleico	0,10	0,03	0,06	0,21	0,15
Stearico	3,01	0,53	1,61	4,15	2,54
Oleico	72,77	5,94	55,30	79,88	24,58
Linoleico	9,47	3,90	4,38	19,97	15,59
Arachico	0,36	0,03	0,23	0,45	0,22
Linolenico	0,60	0,05	0,24	0,71	0,47
Eicosenoico	0,23	0,04	0,09	0,42	0,33
Beenico	0,11	0,02	0,03	0,22	0,19
Lignocericico	0,05	0,02	0,00	0,16	0,16

Tabella 4: Sintesi della composizione in acidi grassi di 241 campioni di oli di oliva. Per ciascun acido sono indicati il valore medio (%m/m), la deviazione standard, il valore minimo, il valore massimo e il range di variabilità (differenza tra i valori massimo e minimo).

Analizzando i dati riportati in tabella 4, si nota, ad esempio, per l'acido oleico una percentuale compresa fra il 55,30% e il 79,88% e un range di variabilità pari al 24,58%, mentre per l'acido linoleico una percentuale compresa fra il 4,38% e il 19,97% e un range di variabilità pari al 15,59%. Detti range risultano abbastanza

sovrapponibili e coerenti con i limiti stabiliti dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm., riportati in tabella 2.

Per il presente lavoro sperimentale sono stati quindi selezionati 12 campioni di oli di oliva aventi una composizione in acidi grassi che rappresentasse il più possibile la variabilità esistente tra i 241 campioni analizzati, variabilità piuttosto coerente, come già visto, con quanto previsto dal legislatore europeo.

Per la preparazione delle miscele è stato impiegato un campione per ciascuno dei seguenti tipi di olio: girasole, arachide, mais, riso, e vinacciolo, le cui composizioni acidiche sono riportate in tabella 5. In tabella 6 è rappresentata la composizione in acidi grassi dei 12 campioni di oli di oliva selezionati per il presente studio.

	Girasole	Mais	Arachide	Riso	Vinacciolo
Miristico	0,07	0,03	0,04	0,36	0,04
Palmitico	6,55	9,97	11,82	19,5	6,58
Palmitoleico	0,11	0,11	0,07	0,24	0,10
Margarico	0,04	0,06	0,06	0,03	0,05
Margaroleico	0,03	0,03	0,03	0,00	0,03
Stearico	3,67	2,02	3,38	1,97	3,84
Oleico	32,00	28,02	39,97	42,19	19,11
Linoleico	56,04	57,98	37,75	32,55	69,65
Arachico	0,23	0,32	1,45	0,99	0,15
Linolenico	0,04	0,9	0,10	0,92	0,23
Eicosenoico	0,13	0,17	0,90	0,46	0,15
Beenico	0,72	0,19	2,85	0,29	0,02
Lignocerico	0,38	0,2	1,46	0,47	0,05
Altri	0,00	0,00	0,12	0,03	0,00

Tabella 5: composizione in acidi grassi dei campioni di oli di semi utilizzati per la preparazione delle miscele.

	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4	Campione 5	Campione 6	Campione 7	Campione 8	Campione 9	Campione 10	Campione 11	Campione 12
Miristico	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00
Palmitico	11,85	13,22	13,32	13,41	17,33	10,35	18,06	10,36	10,40	13,79	9,51	16,79
Palmitoleico	1,04	0,74	1,38	1,37	2,08	0,86	2,42	0,87	0,85	1,40	0,75	2,16
Margarico	0,05	0,06	0,04	0,04	0,03	0,06	0,03	0,04	0,04	0,07	0,09	0,03
Margaroleico	0,11	0,09	0,09	0,09	0,07	0,10	0,08	0,08	0,08	0,15	0,15	0,08
Stearico	2,97	2,86	2,62	2,63	2,42	3,57	2,26	3,81	3,74	2,19	3,54	2,20
Oleico	74,49	66,72	67,70	67,30	58,43	76,65	57,16	77,72	77,62	70,19	77,28	59,53
Linoleico	8,13	14,67	13,55	13,83	18,21	7,04	18,59	5,78	5,92	10,80	7,16	17,76
Arachico	0,34	0,42	0,36	0,36	0,37	0,36	0,37	0,36	0,36	0,36	0,37	0,36
Linolenico	0,58	0,71	0,59	0,58	0,67	0,61	0,67	0,60	0,61	0,60	0,66	0,64
Eicosenoico	0,24	0,33	0,25	0,22	0,19	0,22	0,17	0,21	0,21	0,25	0,24	0,17
Beenico	0,13	0,11	0,03	0,11	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,12	0,11	0,11
Erucico	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Lignocerico	0,04	0,05	0,07	0,06	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05	0,08	0,13	0,16
Altri	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabella 6: composizione in acidi grassi dei campioni di oli di oliva utilizzati per la preparazione delle miscele.

4.1.2. Preparazione del campione e analisi GC-FID

Per ciascuno dei 12 campioni di oli di oliva (le cui composizioni sono riportate in tabella 6) sono state preparate 3 miscele rispettivamente al 40%, 50% e 60% con il campione di olio di girasole (esposto in tabella 5), per un volume totale di 10 ml. Tutti i volumi sono stati prelevati con una micropipetta da 10 ml e le miscele ottenute sono state agitate vigorosamente.

La determinazione degli esteri metilici è stata effettuata secondo quanto previsto dal Reg. CEE 2568/91 e ss.mm. All. XA e XB: 0,1 grammi di campione sono stati disciolti in 2 ml di eptano. Il campione è stato quindi transesterificato con 200 μ l di una soluzione di KOH in metanolo 2 N e analizzato in gascromatografia con rivelatore FID.

Le analisi sono state eseguite su un gascromatografo (GC) equipaggiato con detector a ionizzazione di fiamma (FID). E' stata utilizzata una colonna capillare HP-88 (60 m \cdot 0,2 mm i.d. \cdot 0,25 μ m film). Sono state impiegate le seguenti condizioni cromatografiche: volume di iniezione pari a 1 μ l, rapporto di split 50,0:1 a 240°C; temperatura tenuta costante a 170 °C per 30 min, portata a 230°C con una velocità di 5°C/min (mantenuta costante per 3 min), per una durata complessiva di 45 min. E' stato utilizzato elio come gas carrier, con una velocità di flusso costante di 1 ml/min, mentre la temperatura del detector è stata impostata a 300°C.

Si riporta in figura 14 un cromatogramma tipo di una miscela contenente il 50% di olio di oliva.

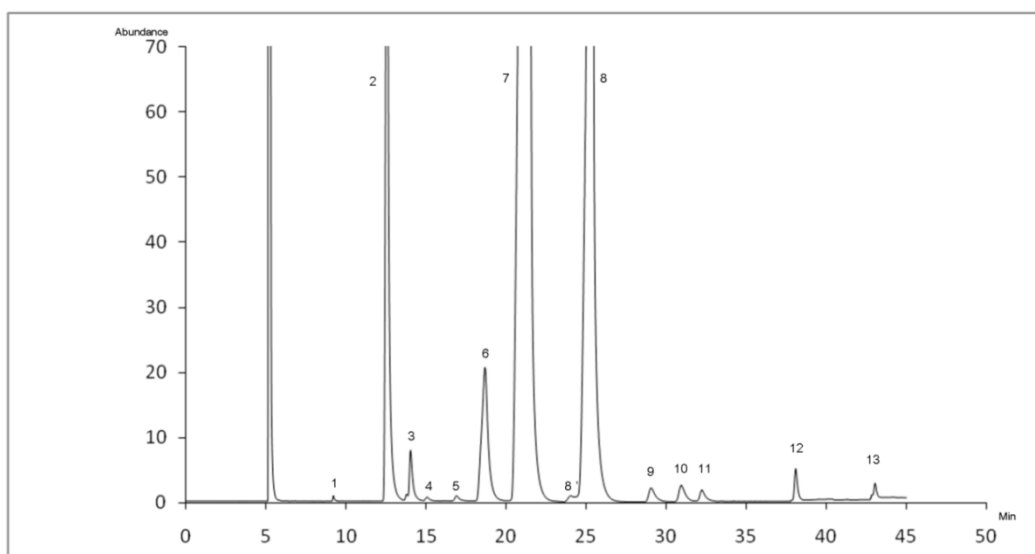


Figura 14: Cromatogramma di una miscela contenente il 50% di olio di oliva: a. miristico (1), a. palmitico (2), a. palmitoleico (3), a. margarico (4), a. margaroleico (5), a. stearico (6), a. oleico (7), a. trans-linoleico (8'), a. linoleico (8), a. arachico (9), a. linolenico (10), a. eicosenoico (11), a. beenicico (12) e a. lignocericico (13).

Sono stati ottenuti e analizzati complessivamente 36 campioni.

4.1.3. Test statistici preliminari: verifica della ripetibilità analitica e analisi della varianza (ANOVA)

In via preliminare è stato effettuato un test statistico per verificare se l'acquisizione di una singola analisi per miscela possa essere considerata sufficiente per gli scopi di questo lavoro, in altri termini se la variabilità analitica associata alla ripetibilità dell'analisi di un singolo campione sia significativamente trascurabile rispetto alla variabilità analitica riscontrabile all'interno della categoria di appartenenza, costituita da miscele di un olio di semi con campioni di oli di oliva sensibilmente differenti fra loro.

Sono stati preparati pertanto 10 campioni contenenti il 50% dello stesso olio di oliva ed è stata confrontata la varianza associata a ciascuna variabile con la varianza stimata sulle 12 miscele al 50%, mediante test F a una coda con un livello di significatività pari a 0,05. Per una descrizione del test F si rimanda al paragrafo 3.1.

E' stata effettuata inoltre un'ANOVA ad una via (tecnica descritta al par. 3.1) sull'intero data set confrontando, per ciascuna variabile, la varianza all'interno di

una categoria con la varianza fra le categorie, al fine di selezionare, per i successivi trattamenti statistici, gli acidi grassi più significativi per la discriminazione fra le 3 categorie esaminate.

4.1.4. Analisi statistica multivariata

Il data set relativo alle 36 miscele di oli e alle variabili selezionate mediante il test Anova è stato sottoposto ad analisi statistica multivariata.

E' stata applicata innanzitutto una tecnica di tipo "unsupervised", ovvero l'Analisi delle Componenti Principali (PCA, descritta nel paragrafo 3.2.1.) per una prima visualizzazione dei dati; ciò allo scopo sia di evidenziare l'esistenza di un naturale raggruppamento dei campioni in funzione della percentuale di olio di oliva in essi presente, sia di ottenere informazioni sulle variabili che hanno un maggior peso nel creare la separazione naturale fra i vari gruppi, ove presente.

La Target Factor Analysis (TFA, descritta nel paragrafo 3.2.2.) è stata applicata al data set per verificare se nelle miscele possa essere riconosciuta la presenza di olio di oliva e olio di girasole. A tal fine sono stati inseriti nel trattamento statistico 6 "oggetti puri" corrispondenti alla composizione di diverse tipologie di oli: olio di oliva (avente composizione pari alla media dei 241 campioni di olio di oliva analizzati nel biennio 2010-2011), olio di girasole (differente dall'olio utilizzato per la preparazione delle miscele), olio di mais, olio di arachide, olio di riso e olio di vinacciolo (le composizioni in acidi grassi di tali campioni sono riportati in tabella 7). Il numero di fattori significativi è stato scelto utilizzando il criterio degli autovalori >1 .

	Oliva	Mais	Arachide	Vinacciolo	Girasole	Riso
Miristico	0,010	0,03	0,04	0,04	0,10	0,36
Palmitico	12,09	9,97	11,82	6,58	8,01	19,50
Palmitoleico	1,15	0,11	0,07	0,10	0,12	0,24
Margarico	0,05	0,06	0,06	0,05	0,00	0,03
Margaroleico	0,10	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00
Stearico	3,01	2,02	3,38	3,84	3,21	1,97
Oleico	72,77	28,02	39,96	19,11	27,52	42,18
Linoleico	9,47	57,99	37,75	69,66	60,10	32,55
Arachico	0,36	0,32	1,45	0,15	0,18	0,99
Linolenico	0,60	0,90	0,10	0,23	0,05	0,92
Eicosenoico	0,23	0,17	0,90	0,15	0,11	0,46
Beenico	0,11	0,19	2,85	0,02	0,45	0,29
Lignocerico	0,05	0,20	1,46	0,05	0,14	0,47

Tabella 7: Composizione in acidi grassi (%m/m) dei 6 campioni di oli vegetali utilizzati come “oggetti puri” nella TFA

Al data set in esame è stata applicata la tecnica di class modelling Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA, descritta nel paragrafo 3.2.3.), al fine di elaborare una regola di decisione che consenta di valutare se una miscela incognita possa essere ricondotta ad uno dei gruppi analizzati. Per la definizione dei confini delle classi è stato scelto un livello di fiducia del 95% ed è stata utilizzata la Unweighted augmented distance (Wold et al., 1977).

I dati sono stati infine sottoposti a regressione multivariata, mediante l’algoritmo Partial Least Squares (PLS, descritto al par. 3.2.4.), al fine di costruire un modello quantitativo che permetta di determinare la percentuale di olio di oliva in una miscela. L’algoritmo PLS è stato applicato al data set, escludendo 12 campioni per costruire il set di calibrazione esterno. Le variabili sono state sottoposte a centraggio e per la validazione del modello sono stati impiegati 8 gruppi di cancellazione, ottenendo una capacità predittiva del modello meno ottimistica e pertanto più realistica rispetto a quella che si sarebbe potuta ottenere applicando il leave-one-out. Il numero di variabili latenti da utilizzare per costruire la forma chiusa del modello è stato ottenuto dall’andamento dell’errore standard di predizione in funzione del numero dei variabili latenti. La capacità predittiva del

modello è stata testata attraverso la media della deviazione dell'errore di predizione, rispetto agli 8 gruppi di cancellazione, mentre la stabilità del modello è stata esaminata attraverso la deviazione standard e la deviazione standard della media del parametro appena citato. Infine è stato valutato l'errore che il modello commette nel predire i valori del set di calibrazione esterno (RMSEP) (Kowalski et al., 1991; Massart et al., 1997).

I trattamenti statistici sono stati effettuati utilizzando i software V-PARVUS 2010 (Forina et al., 2010) e SPSS (IBM SPSS Statistics computer program, Version 19, 2010).

4.2. Risultati e discussione

4.2.1. Ripetibilità analitica

Il confronto tra la variabilità analitica associata alla ripetibilità dell'analisi di un singolo campione e la variabilità analitica riscontrabile all'interno della categoria di appartenenza ha dimostrato che, per tutti gli acidi grassi, la varianza all'interno della categoria (varianza di categoria) è significativamente maggiore della varianza sullo stesso campione (varianza di ripetibilità), ad eccezione dell'acido miristico: per esso infatti le 2 varianze non mostrano una differenza significativa. E' stato utilizzato un valore critico di F corrispondente ad α pari a 0,05 e gradi di libertà $n_1-1 = 11$ per la varianza di categoria (varianza stimata su 12 campioni) ed $n_2-1 = 9$ per la varianza di ripetibilità (varianza stimata su 10 campioni). Essendo quindi la variabilità all'interno della categoria significativamente maggiore rispetto alla ripetibilità analitica (e solo nel caso dell'acido miristico non significativamente diversa), si può considerare sufficiente, ai fini di questo lavoro, l'acquisizione di una sola analisi per ciascun campione, avendo avuto cura di omogeneizzare vigorosamente ogni singola miscela prima di effettuare l'analisi, al fine di garantire l'omogeneità del campione.

4.2.1. Analisi della varianza

L'applicazione dell'ANOVA a una via sull'intero data set mostra invece che gli acidi grassi caratterizzati da una variabilità fra le categorie significativamente maggiore rispetto alla variabilità all'interno delle categorie sono: miristico, margaroleico, oleico, linoleico, arachico, linolenico, beenico e lignocerico (per quest'ultima variabile è stato possibile valutare il potere discriminante soltanto fra le categorie relative alle miscele contenenti il 50% e il 60% di olio di oliva; ciò in quanto il criterio di omogeneità della varianza, preliminare all'applicazione del test Anova, è stato verificato soltanto fra queste 2 categorie). Gli acidi palmitico, palmitoleico, margarico, stearico ed eicosenoico, avendo una variabilità all'interno di ciascuna categoria paragonabile alla variabilità fra le categorie, non hanno, invece, un forte potere discriminante. I successivi trattamenti di analisi statistica multivariata sono stati eseguiti sul data set relativo a 36 campioni e 8 variabili (corrispondenti alle % m/m degli acidi miristico, margaroleico, oleico, linoleico, arachico, linolenico, beenico e lignocerico).

4.2.2. Analisi delle componenti principali (PCA)

Le variabili sono state sottoposte al column autoscaling: $y_{iv} = (x_{iv} - x_{im})/s_v$.

Sono state estratte le PC aventi autovalori >1, riportate in tabella 8.

PC	Varianza %	Varianza cumulativa %
1	66,37	66,37
2	13,37	79,74

Tabella 8: PCA applicata al data set oliva-girasole: varianza associata alle componenti principali aventi autovalore > 1

Si osserva che le prime due componenti principali spiegano il 79,7% della varianza totale; esse contengono, in altri termini, il 79,7% dell'informazione presente nei dati originali.

Nel biplot della PC1 vs PC2 (figura 15) si può notare una separazione molto ben definita dei campioni, rispetto alla percentuale di olio di oliva in essi contenuta. La separazione è realizzata, in modo particolare, sull'asse della PC1: il gruppo caratterizzato da valori negativi della PC1 (indicato con il numero 1) corrisponde alle miscele contenenti il 40% di olio di oliva; il gruppo contenente l'origine degli assi (indicato con il numero 2) è costituito dalle miscele contenenti il 50% di olio

di oliva, mentre il gruppo caratterizzato da valori positivi della PC1 (indicato con il numero 3) racchiude le miscele contenenti il 60% di olio di oliva.

Dal biplot si osserva inoltre che le variabili con un loading positivo sulla PC1 (dove cadono le miscele al 60% di olio di oliva) sono gli acidi linolenico, oleico, arachico e margaroleico, mentre le variabili con un loading negativo sulla PC1 (dove rientrano le miscele al 60% di olio di girasole) sono gli acidi beenico, linoleico, miristico e lignoceric. Tale distribuzione dei loadings si rivela molto coerente con i dati relativi agli acidi grassi presenti negli oli puri. Gli oli di oliva sono infatti caratterizzati da una maggiore quantità di acidi oleico, linolenico, arachico e margaroleico rispetto all'olio di girasole; viceversa l'olio di girasole è caratterizzato da una maggiore quantità di acidi beenico, linoleico, miristico e lignoceric rispetto all'olio di oliva (cfr. tabelle 2 e 3).

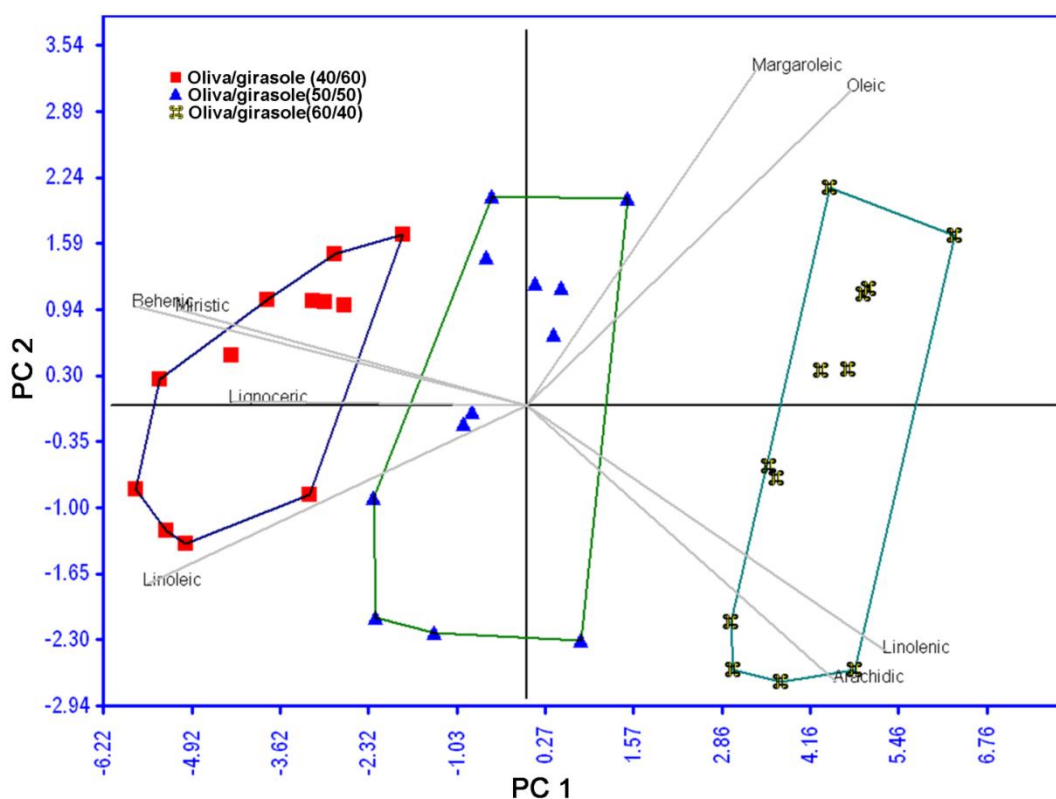


Figura 15: Biplot ottenuto applicando la PCA al data set oliva - girasole

Ne consegue che nella parte dello scatter plot caratterizzata da valori positivi della PC1 vengono raggruppate le miscele con un maggiore grado di similarità verso gli oli di oliva e un minore grado di similarità verso gli oli di girasole (miscele al 60% in olio di oliva), mentre nella parte dello scatter plot caratterizzata da valori

negativi della PC1 sono raccolte le miscele con un maggiore grado di similarità verso gli oli di girasole e un minore grado di similarità verso gli oli di oliva (miscele al 40% in olio di oliva). Infine, in posizione centrale sono concentrate le miscele al 50%.

4.2.3. Target factor analysis

La TFA è stata applicata al data set costituito da 36 campioni, 6 oggetti puri e 8 variabili (le stesse selezionate per la PCA e per il SIMCA, sottoposte al column autoscaling: $y_{iv} = (x_{iv} - x_{im})/s_i$). Poiché la PCA ha portato ad individuare soltanto 2 fattori significativi, ovvero con autovalori >1 , la TFA dovrà identificare lo stesso numero di fattori reali, ovvero 2 tipologie di oli utilizzati per produrre le miscele. I 6 fattori inseriti nel data set, ordinati rispetto alla varianza residua, hanno dato come primo e secondo fattore target, rispettivamente, il profilo cromatografico dell'olio di oliva e dell'olio di girasole. Si dimostra pertanto come sia comunque possibile riconoscere i fingerprint delle 2 tipologie di oli utilizzate per produrre le miscele, nonostante la variabilità presente nel profilo acidico degli oli componenti, nonché l'impiego di un olio di girasole target avente composizione diversa da quello utilizzato nelle miscele.

4.2.4. Tecniche di modellamento di classe: Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA)

La tecnica del SIMCA è stata applicata allo stesso data set utilizzato per la PCA, effettuando una cross-validazione con 6 gruppi di cancellazione e utilizzando 7 componenti per la costruzione di ciascun modello di classe. Le capacità di classificazione (modeling rate) e di predizione (prediction rate) risultano essere del 100% (tabella 9). La sensibilità, corrispondente alla percentuale di campioni della classe modellata (correttamente) accettati dal modello, e la specificità, definita come la percentuale di campioni di altre classi (correttamente) rifiutati dal modello (riferite alle stime della cross-validation) sono anch'esse pari al 100% (tabelle 10 e 11).

Dai Cooman's plot (Coomans et al., 1984) relativi alla classificazione dei campioni rispettivamente nelle classi 1 e 2 e nelle classi 2 e 3 (figure 16 e 17), si nota che ciascun campione viene classificato nella sua classe di appartenenza, non

vi sono outlier e non vi sono campioni che potrebbero essere classificati in entrambe le classi.

		Gruppo di appartenenza previsto			Capacità di classificazione (%)
Gruppo di appartenenza		1	2	3	
Originale	1	12	0	0	100
	2	0	12	0	100
	3	0	0	12	100
					Capacità di predizione (%)
Cross-validato	1	12	0	0	100
	2	0	12	0	100
	3	0	0	12	100

Tabella 9: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: capacità di classificazione e di predizione

Classe	Sensibilità
1	100%
2	100%
3	100%

Tabella 10: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: sensibilità dei modelli di classe

Classe		Specificità
1	verso la classe 2	100%
	verso la classe 3	100%
2	verso la classe 1	100%
	verso la classe 3	100%
3	verso la classe 1	100%
	verso la classe 2	100%

Tabella 11: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: specificità dei modelli di classe

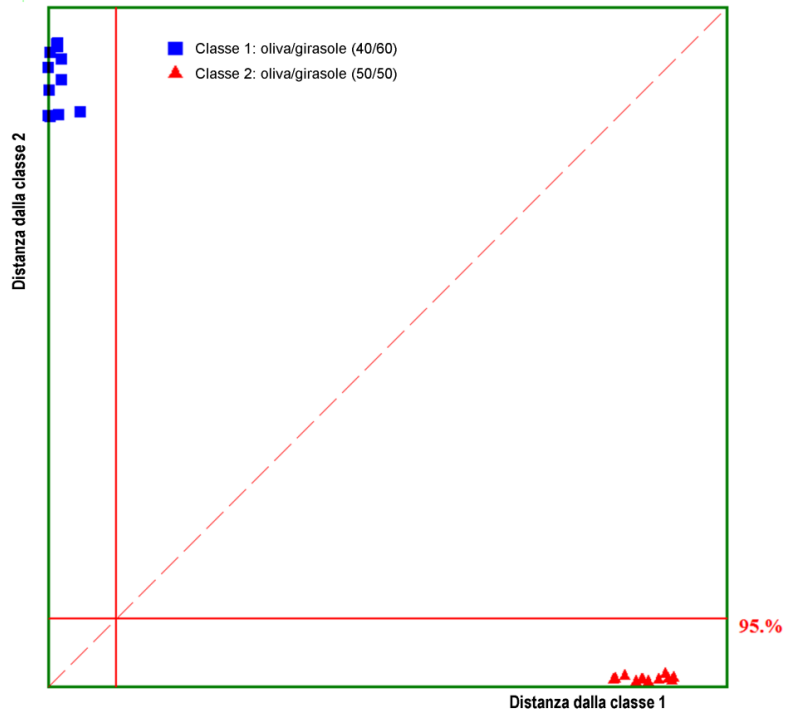


Figura 16: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

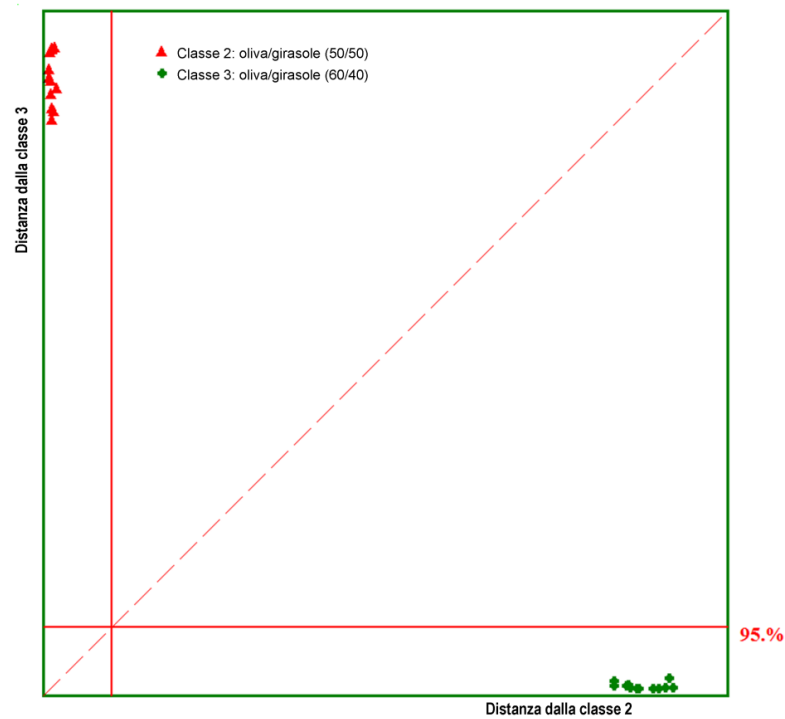


Figura 17: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

4.2.5. Tecniche di calibrazione multivariata: Partial Least Square (PLS)

La migliore capacità predittiva è stata ottenuta con 5 variabili latenti; ne consegue che la forma chiusa è stata calcolata con una complessità pari a 5. In tabella 12 sono riportati i parametri con cui è stata valutata la performance del modello (il significato dei parametri è trattato nel paragrafo 3.2.4.).

Valore medio di SDEP nei gruppi di cancellazione	1,51
Dev. St. di SDEP	0,68
Dev. St. del valore medio di SDEP	0,24
RMSEP	2,10

Tabella 12: PLS applicato al data set oliva – girasole: parametri di valutazione della performance del modello

La capacità predittiva del modello, valutata attraverso il valore medio di SDEP rispetto ai gruppi di cancellazione (1,51), è più che soddisfacente, considerando che essa è espressa in unità di percentuale di olio di oliva nelle miscele. E' stata ottenuta anche una buona stabilità del modello (ovvero una minima variabilità nella prestazione tra un gruppo di cancellazione e l'altro) tenuto conto dei valori relativamente bassi della deviazione standard del parametro SDEP nei gruppi di cancellazione (0,68) e della deviazione standard della media (0,24). Risulta infine più che accettabile anche l'errore sulla predizione del test set esterno, pari a 2,10.

In figura 18 sono riportate le concentrazioni di olio di oliva predetta (fig. 18 (a)) e computata (fig. 18(b)) in funzione della concentrazione reale.

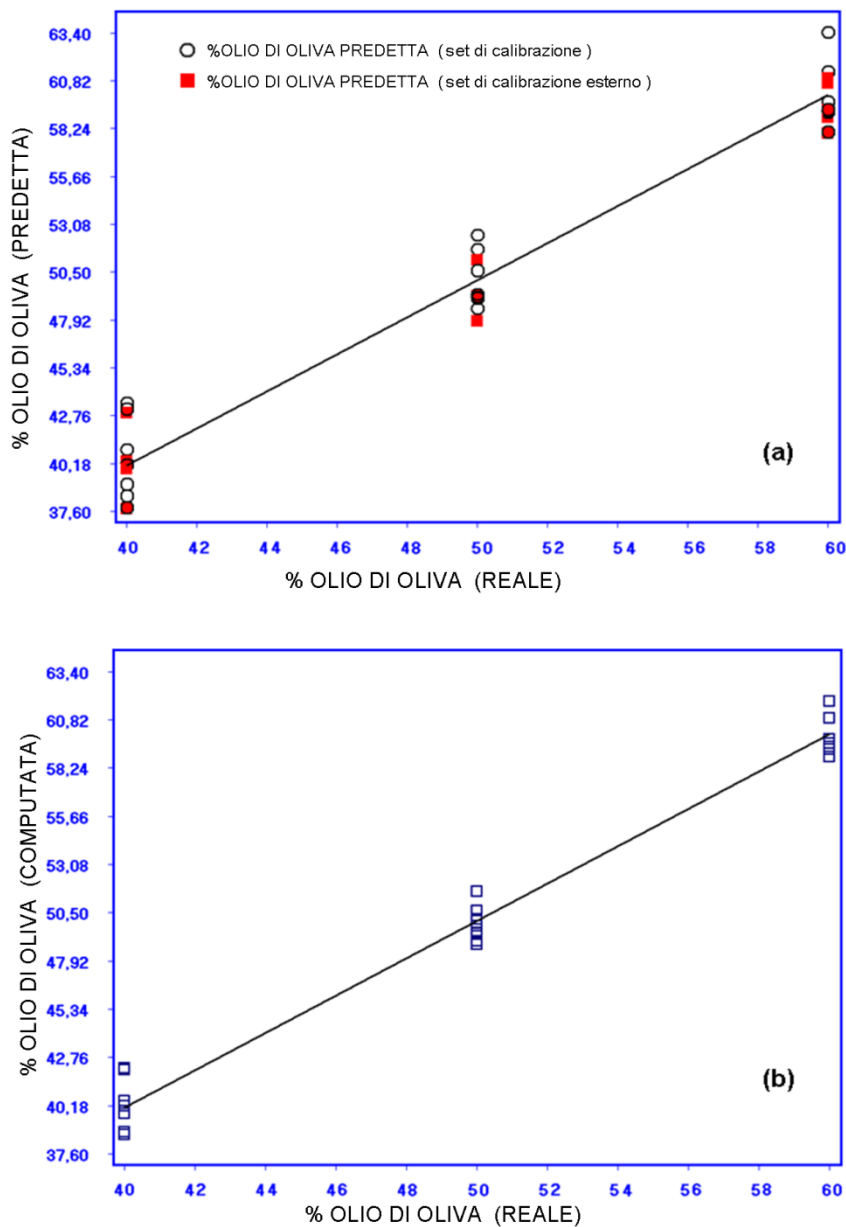


Figura 18: PLS applicato al data set oliva – girasole: concentrazioni di olio di oliva predetta (fig. 18 (a)) e computata (fig. 18(b)) in funzione della concentrazione reale

4.3. Conclusioni della sperimentazione preliminare condotta sul data set oliva - girasole.

Le tecniche di analisi statistica multivariata applicate allo studio delle miscele costituite da 12 oli di oliva con un olio di girasole hanno prodotto risultati estremamente significativi. La PCA ha consentito di evidenziare la naturale variabilità esistente fra i gruppi contenenti il 40%, il 50% o il 60% di olio di oliva. Tali gruppi appaiono infatti nettamente separati rispetto alla prima componente

principale, nonostante il data set sia stato studiato per rappresentare, nella maniera più ampia possibile, la variabilità esistente nel profilo acidico degli oli di oliva. La TFA ha consentito di individuare perfettamente il fingerprint degli oli che costituiscono le miscele (oliva e girasole), pur avendo inserito, come target per l'olio di girasole, il profilo acidico di un olio differente da quello utilizzato per la preparazione delle miscele. Tale procedura riproduce esattamente quella che potrebbe utilizzarsi per verificare, nei casi reali, la presenza effettiva di una tipologia di olio dichiarata sull'etichetta di una miscela, la quale attualmente riporta soltanto il tipo di olio di semi utilizzato ma non la sua esatta composizione acidica.

Il SIMCA ha permesso di costruire dei modelli di classe che non presentano outlier, né tantomeno zone di sovrapposizione fra le tre classi (sensibilità e specificità pari a 100%). Si deduce quindi che le miscele contenenti il 50% di olio di oliva sono nettamente distinguibili dalle altre, pur in presenza di variabilità degli oli di oliva utilizzati per prepararle.

L'algoritmo PLS ha consentito la realizzazione di un efficace modello quantitativo con un errore in predizione sul test set esterno pari al 2,10%.

La prima sperimentazione offre dunque una preliminare valutazione dell'influenza della naturale variabilità del profilo degli acidi grassi degli oli di oliva sulla composizione acidica delle miscele con uno specifico olio di semi (girasole); viene proposto un approccio metodologico, sia qualitativo che quantitativo, per verificare la composizione di una miscela binaria olio di oliva - olio di girasole in conformità ai dettami previsti dal Reg. UE 29/2012. I vantaggi nella applicazione di questa metodica consistono nell'utilizzo di un solo metodo di analisi, piuttosto rapido, già presente tra i metodi ufficiali per l'analisi degli oli di oliva, affiancato da una taratura con miscele a composizione nota. Tale metodo inoltre si rivela sicuramente più spedito rispetto alla esecuzione di tutti i controlli che devono essere fatti sugli oli di oliva puri, ai sensi del Reg. CEE 2568/91 e s.m.

CAPITOLO 5

CARATTERIZZAZIONE

SPERIMENTALE DI MISCELE DI OLI

DI OLIVA CON ALTRI OLI VEGETALI

Con la sperimentazione preliminare descritta nel capitolo 4 è stato proposto un metodo per riconoscere e verificare la percentuale di olio di oliva in una miscela con olio di girasole. Detto metodo, testato inizialmente rispetto alla marcata variabilità naturale del profilo di acidi grassi esistente negli oli di oliva, si è dimostrato robusto in ordine a tale parametro.

A fronte dei promettenti risultati conseguiti, con la successiva sperimentazione, descritta nel presente capitolo, è stata verificata la performance del metodo in funzione della composizione acidica degli oli di semi utilizzati per preparare le miscele.

E' stata aggiunta quindi un'ulteriore variabilità al problema analitico, con l'obiettivo di studiare la possibilità di costruire un unico data set per mezzo del quale continui a potersi differenziare la classe di campioni contenenti il 50% di oli di oliva dalle classi contenenti il 40% e il 60%, a prescindere dalla natura degli altri costituenti della miscela, oppure in alternativa valutare la possibilità di avere dei data set separati riferiti a miscele binarie di oli di oliva con le differenti tipologie di oli di semi.

Ulteriore obiettivo di questa sperimentazione è stato quello di testare la capacità del presente metodo di discriminare fra miscele che presentino una differenza nel contenuto di olio di oliva pari al 5%. Le miscele in esame sono state quindi confrontate con miscele che hanno un contenuto di olio di oliva pari al 45% e al 55%. Analogamente alla precedente sperimentazione, gli esteri metilici degli acidi grassi sono stati analizzati mediante GC-FID e analisi statistica multivariata.

5.1. Materiali e metodi

La preparazione dei campioni utilizzati per la presente sperimentazione e le relative analisi cromatografiche sono state acquisite utilizzando le medesime modalità operative e strumentazione di cui alla precedente sperimentazione (capitolo 4).

Per ciascuno dei 12 campioni di oli di oliva (la cui composizione è riportata in tabella 6) sono state preparate miscele binarie con ciascun campione di olio di arachide, mais, riso e vinacciolo, (la cui composizione è riportata in tabella 5), contenenti il 40%, 45%, 50%, 55% e 60% in volume di olio di oliva. Sono stati pertanto ottenuti quattro gruppi di miscele binarie: oliva-mais, oliva-arachide, oliva-riso e oliva-vinacciolo. Ciascun gruppo di miscele (o data set) è costituito da 60 campioni, suddivisi in 5 categorie, in funzione della concentrazione di olio di oliva.

Sono state inoltre preparate ed analizzate miscele al 45% e 55% in olio di oliva con l'olio di girasole (la cui composizione è indicata in tabella 4), utilizzato nella sperimentazione preliminare.

Per ciascun campione è stata acquisita una sola analisi, estendendo i risultati dello studio sulla ripetibilità analitica, di cui al paragrafo 4.2.1, anche alla presente sperimentazione. Tale scelta è motivata dalle seguenti osservazioni:

- la variabilità all'interno della categoria di appartenenza è influenzata soprattutto dalla variabilità del profilo degli acidi grassi degli oli di oliva in quanto essi sono miscelati con un solo tipo di olio di semi. Poiché ciascun data set è costituito da miscele formate con gli stessi campioni di olio di oliva, si può assumere che la variabilità all'interno della categoria di appartenenza non vari significativamente modificando soltanto la composizione dell'olio di semi, presente nelle stesse quantità in ciascuna categoria.
- la ripetibilità dell'analisi di un singolo campione dipende da fattori quali l'operatore, la strumentazione utilizzata, le modalità operative, ecc.; nessuno di essi è mutato rispetto alla sperimentazione preliminare.

Su ciascuno dei quattro data set è stata effettuata un'ANOVA ad una via confrontando, per ogni variabile, la varianza all'interno di una categoria con la varianza fra le categorie, al fine di selezionare le variabili ritenute statisticamente significative per i successivi trattamenti statistici multivariati. I seguenti acidi grassi sono stati utilizzati come variabili: miristico, palmitico, palmitoleico, margarico, margaroleico, stearico, oleico, linoleico, arachico, linolenico, eicosenoico, beenico e lignocerico.

Si è fatto ricorso alle tecniche di analisi statistica multivariata: PCA, TFA, SIMCA e PLS secondo il seguente schema:

- PCA, TFA, SIMCA e PLS sono stati applicati ai quattro data set (oliva-mais, oliva-arachide, oliva-riso e oliva-vinacciolo), escludendo inizialmente le miscele al 45% e al 55% in olio di oliva. Ciascun data set è costituito dunque da 36 campioni suddivisi in 3 classi (contenenti il 40%, 50% e 60% di olio di oliva).
- PCA, TFA, SIMCA e PLS sono stati impiegati per il trattamento del data set di 180 campioni ottenuto riunendo i quattro data set con quello analizzato nella sperimentazione preliminare.
- SIMCA e PLS sono stati applicati ai cinque data set (oliva-girasole, oliva-mais, oliva-arachide, oliva-riso e oliva-vinacciolo) includendo le miscele al 45% e al 55% in olio di oliva: ogni data set è costituito da 60 campioni.
- SIMCA e PLS sono stati infine utilizzati per trattare il data set globale, costituito da 300 campioni.

I trattamenti statistici sono stati effettuati utilizzando i software V-PARVUS 2010 (Forina et al., 2010) e SPSS (IBM SPSS Statistics computer program, Version 19, 2010).

5.2. Risultati e discussione.

5.2.1 Analisi della varianza

Analogamente a quanto effettuato nella sperimentazione preliminare, è stata realizzata un'ANOVA ad una via sui quattro data set relativi alle miscele binarie oliva – arachide, oliva – mais, oliva – riso, oliva – vinacciolo, confrontando, per ciascuna variabile, la varianza all'interno di un categoria con la varianza fra le categorie, al fine di selezionare, per i successivi trattamenti statistici, gli acidi grassi più significativi per la discriminazione fra le categorie esaminate.

Ciascun data set è costituito da 60 campioni, suddivisi in 5 classi, contenenti il 40%, 45%, 50%, 55% e 60% di olio di oliva. L'applicazione dell'ANOVA a questi data set ha tuttavia consentito l'identificazione solamente di una o due variabili significative. Il risultato ottenuto è probabilmente ascrivibile al fatto che la variabilità tra le categorie tende a ridursi al diminuire della differenza nella concentrazione di olio di oliva fra le categorie stesse, tanto da diventare, per un notevole numero di variabili, paragonabile alla variabilità esistente all'interno delle categorie. L'impiego di tale risultato (una o due variabili significative) avrebbe compromesso il successivo trattamento statistico multivariato, che necessita invece di un maggior numero di variabili dalle quali estrarre l'informazione chimica di interesse.

Si è ritenuto pertanto di escludere, in via preliminare, i dati analitici delle miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva, utilizzando quattro data set costituiti da 36 campioni, in analogia a quanto fatto nella sperimentazione preliminare.

L'applicazione dell'ANOVA a una via ai quattro data set così ridotti indica che gli acidi palmitico, palmitoleico, margarico, margaroleico e stearico non hanno un forte potere discriminante, avendo una variabilità all'interno di ciascuna categoria paragonabile alla variabilità fra le categorie.

I risultati sono riportati in tabella 13: si evidenziano le variabili per le quali la variabilità fra le categorie non è significativamente differente dalla variabilità all'interno delle categorie; si evince inoltre che gli acidi eicosenoico, oleico e lignocerico risultano poco discriminanti rispettivamente nelle miscele con olio di

mais, riso e vinacciolo. Nella tabella sono esposti per completezza anche i risultati relativi al data set oliva-girasole, di cui alla precedente sperimentazione.

I successivi trattamenti di analisi statistica multivariata sono stati pertanto eseguiti su ciascun data set escludendo le variabili secondo lo schema riprodotto in tabella 13.

Variabili	Girasole	Arachide	Mais	Riso	Vinacciolo
Miristico					
Palmitico	*	*	*	*	*
Palmitoleico	*	*	*	*	*
Margarico	*	*	*	*	*
Margaroleico		*	*	*	*
Stearico	*	*	*	*	*
Oleico				*	
Linoleico					
Arachico					
Linolenico					
Eicosenoico	*		*		
Beenico					
Lignocerico					*

Tabella 13: variabili non significative (indicate con *) per la discriminazione fra categorie (ottenute dall'applicazione del test ANOVA). I data set sono brevemente indicati con il nome dell'olio di semi costituente la miscela. Sono indicate in grassetto le variabili selezionate per il trattamento statistico descritto nel paragrafo 5.2.2.5.

5.2.2 Analisi delle componenti principali (PCA)

5.2.2.1 Miscele olio di oliva – olio di arachide

Il data set è costituito da 36 campioni e 8 variabili (ottenute escludendo le variabili evidenziate in tabella 13). Si osserva che le prime due componenti principali spiegano il 93,36% della varianza totale; esse contengono, in altri termini, il 93,36% dell'informazione presente nei dati originali.

Nel biplot della PC1 vs PC2 (figura 19) si può notare una separazione molto ben definita dei campioni sull'asse della PC1 rispetto alla percentuale di olio di oliva in essi contenuta.

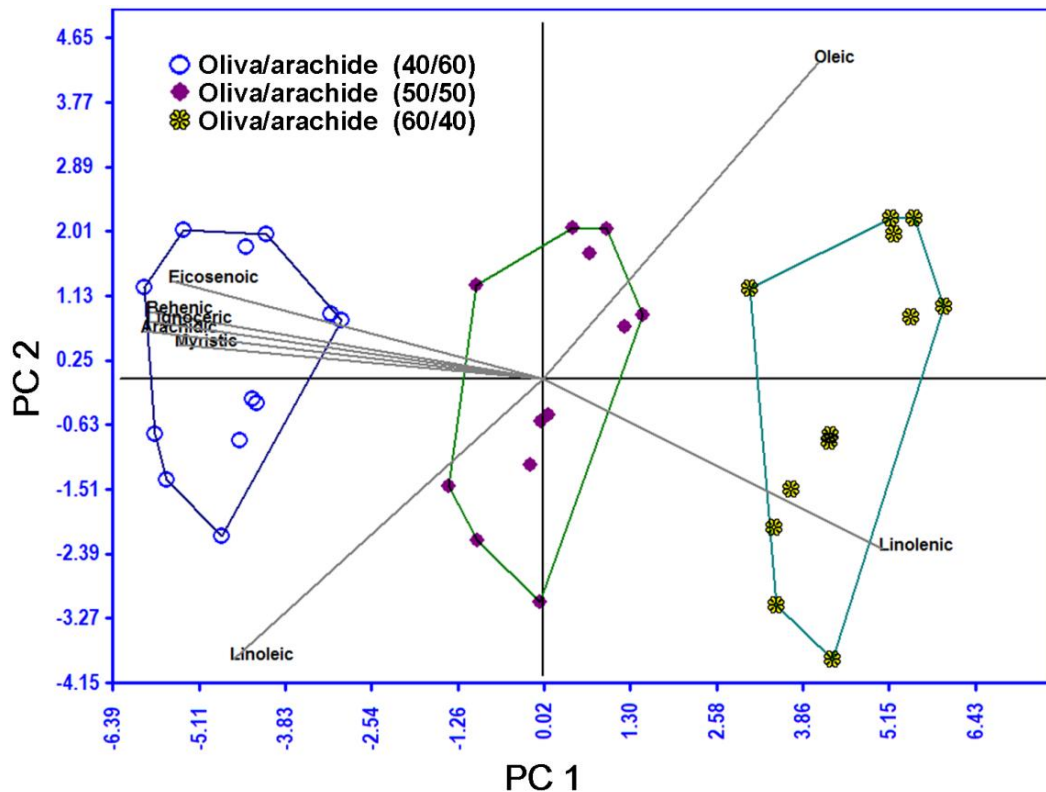


Figura 19: Biplot ottenuto applicando la PCA al data set oliva – arachide.

Dal biplot si osserva inoltre che le variabili con un loading positivo sulla PC1 (dove cadono le miscele al 60% di olio di oliva) sono gli acidi oleico e linolenico, mentre tutte le altre variabili presentano un loading negativo sulla PC1 (dove sono ricomprese le miscele al 60% di olio di arachide). Tale distribuzione dei loadings si rivela molto coerente con i dati relativi agli acidi grassi presenti negli oli puri. Rispetto all'olio di arachide, gli oli di oliva sono infatti caratterizzati da una maggiore quantità di acidi oleico e linolenico, mentre l'olio di arachide si connota

per una maggiore quantità dei rimanenti acidi grassi rispetto all'olio di oliva (cfr. tabelle 2 e 3).

Ne consegue che nella parte dello scatter plot caratterizzata da valori positivi della PC1 vengono raggruppate le miscele con un maggiore grado di similarità verso gli oli di oliva e un minore grado di similarità verso gli oli di arachide (miscele al 60% in olio di oliva); viceversa nella parte dello scatter plot rappresentata da valori negativi della PC1 sono concentrate le miscele con un maggiore grado di similarità verso gli oli di arachide e un minore grado di similarità verso gli oli di oliva (miscele al 40% in olio di oliva). Infine, in posizione centrale vengono ricondotte le miscele al 50%.

5.2.2.2 Miscela olio di oliva – olio di mais

Il data set è costituito da 36 campioni e 7 variabili. La PC1, unica componente con autovalore >1 , spiega da sola il 72,37% della varianza totale.

Anche in questo caso, analogamente a quanto visto con le miscele oliva-arachide, si può notare, nel biplot della PC1 vs PC2 (figura 20), una separazione molto ben definita dei campioni sull'asse della PC1, rispetto alla percentuale di olio di oliva in essi contenuta.

Come si può osservare dal biplot, le miscele contenenti il 60% di olio di oliva, raggruppate su valori positivi della PC1, sono caratterizzate da un elevato contenuto di acido oleico, unica variabile con un loading positivo sulla PC1. Le miscele contenenti il 40% di olio di oliva, ricomprese su valori negativi della PC1, mostrano un maggior contenuto di acidi miristico, linoleico, beenico e lignocerico, variabili con un loading marcatamente negativo sulla PC1. Analogamente al caso precedente, le miscele contenenti il 50% di olio di oliva si concentrano intorno all'origine degli assi. Gli acidi arachico e linolenico hanno valori negativi sia sulla PC1 che sulla PC2; in quest'ultima direzione non è presente variabilità dovuta alla percentuale di olio di oliva nelle miscele.

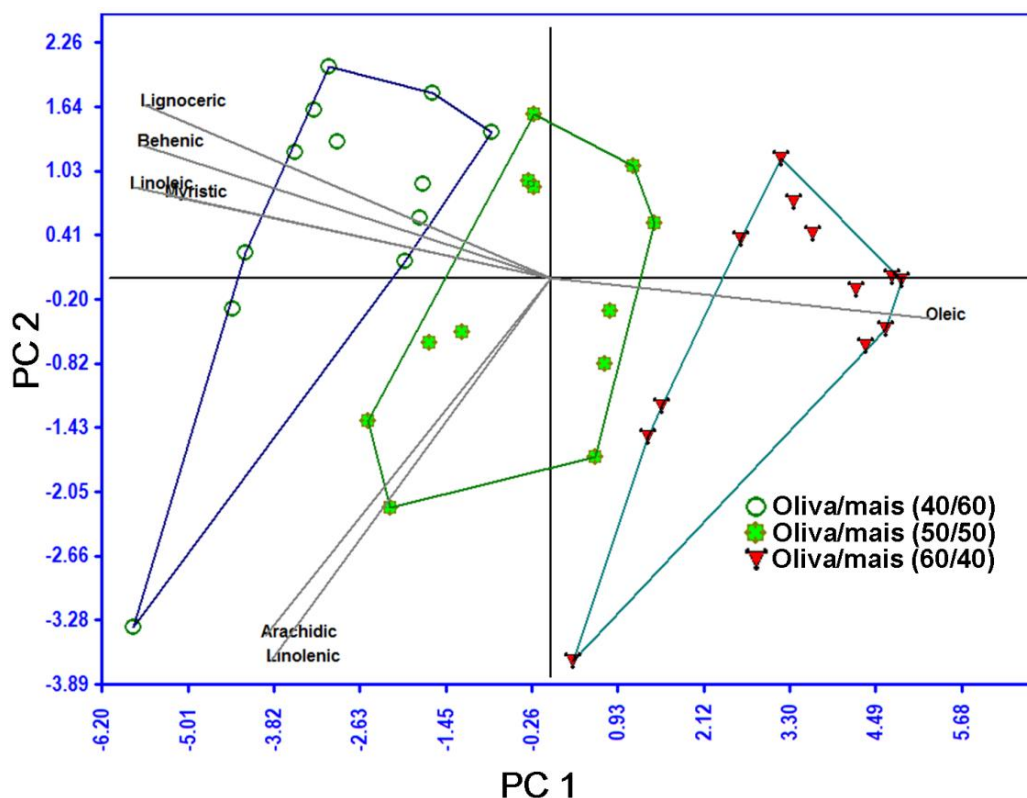


Figura 20: Biplot ottenuto applicando la PCA al data set oliva – mais.

E' possibile correlare tale distribuzione dei loadings con i dati relativi agli acidi grassi presenti negli oli puri. Gli oli di oliva si distinguono infatti per una maggiore quantità di acido oleico, variabile che caratterizza le miscele contenenti il 60% di olio di oliva, mentre l'olio di mais ha un elevato contenuto in acido linoleico, variabile che connota le miscele al 60% di olio di mais. Per quanto attiene agli acidi miristico, beenico e lignoceric, essi sono dei componenti minoritari degli oli puri (l'olio di mais ne contiene comunque una maggior quantità rispetto agli oli di oliva) e il trattamento dell'autoscaling tende a mettere in evidenza anche piccole variazioni presenti tra una tipologia di olio e l'altra.

5.2.2.3 Miscela olio di oliva-olio di riso

Il data set è costituito da 36 campioni e 7 variabili. La PC1, unica componente con autovalore >1 , spiega da sola il 79,43% della varianza totale.

Anche in questo caso si può notare, nel biplot della PC1 vs PC2 (figura 21), una separazione molto ben definita dei campioni sull'asse della PC1, rispetto alla percentuale di olio di oliva in essi contenuta.

A differenza di quanto osservato nei data set precedenti, le miscele contenenti il 60% di olio di oliva sono caratterizzate da valori negativi della PC1, mentre le miscele aventi il 40% di olio di oliva si raggruppano su valori positivi della PC1.

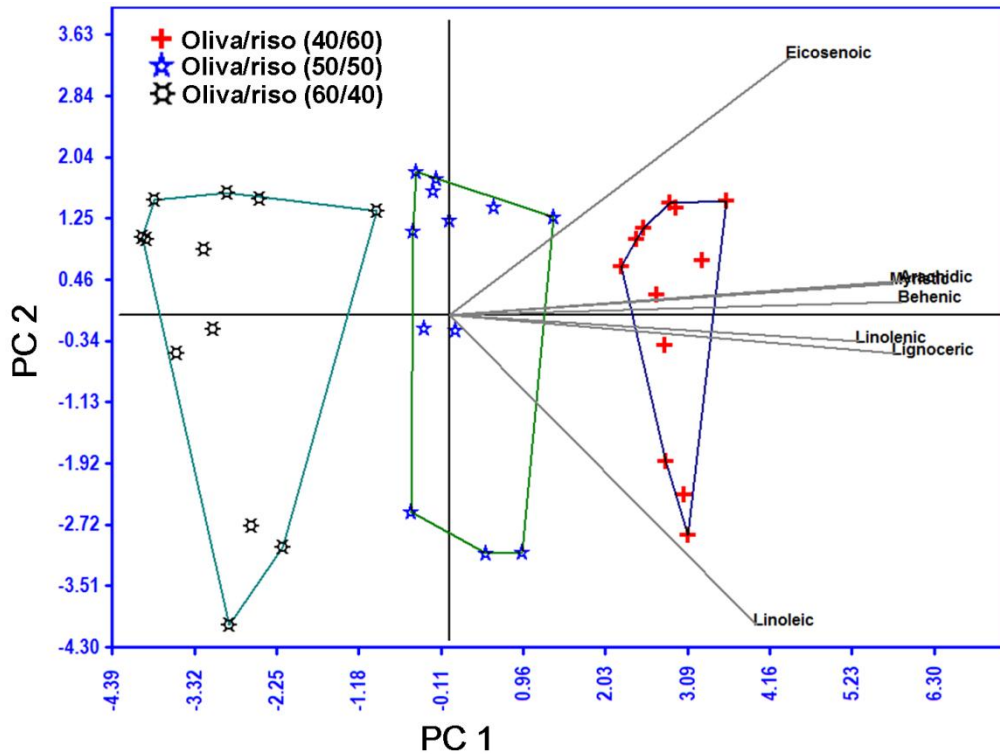


Figura 21: Biplot ottenuto applicando la PCA al data set oliva – riso.

Riguardo alla distribuzione dei loadings, si nota in questo caso come tutte le variabili abbiano dei loadings elevati su valori positivi della PC1: in altri termini i campioni più ricchi in olio di riso sono caratterizzati da un maggior contenuto di tutti gli acidi grassi utilizzati come variabili nel presente trattamento statistico. Se si confrontano questi risultati con i dati relativi agli acidi grassi presenti negli oli puri, si osserva che l'olio di riso presenta effettivamente, rispetto agli oli di oliva, un maggior contenuto di tutti gli acidi grassi utilizzati come variabili nel presente trattamento statistico. L'acido oleico, elemento notoriamente discriminante per gli oli di oliva, è stato escluso dal trattamento statistico in quanto è emerso dal test ANOVA che tale variabile non è significativamente discriminante per le miscele in esame.

5.2.2.4 Miscela olio di oliva-olio di vinacciolo

Il data set è costituito da 36 campioni e 7 variabili. Si osserva che le prime due componenti principali spiegano l'81,47% della varianza totale.

Anche in questo caso, come nei precedenti, si può notare, nel biplot della PC1 vs PC2 (figura 22), una separazione molto ben definita dei campioni sull'asse della PC1, rispetto alla percentuale di olio di oliva in essi contenuta.

Le miscele contenenti il 60% di olio di oliva, raggruppate su valori positivi della PC1, sono caratterizzate da un elevato contenuto di acidi oleico, linolenico, arachico e beenico (analoghe differenze sono riscontrabili tra i campioni di olio di oliva e di semi di vinacciolo puri).

Le miscele aventi il 40% di olio di oliva, raggruppate su valori negativi della PC1, mostrano un maggior contenuto di acido linoleico (tale variabile ha un contenuto significativamente più elevato in un olio di semi vinacciolo rispetto ad un olio di oliva tal quale) e di acido miristico (componente minoritario per il quale il trattamento dell'autoscaling tende a mettere in evidenza anche piccole variazioni presenti tra una tipologia di olio e l'altra).

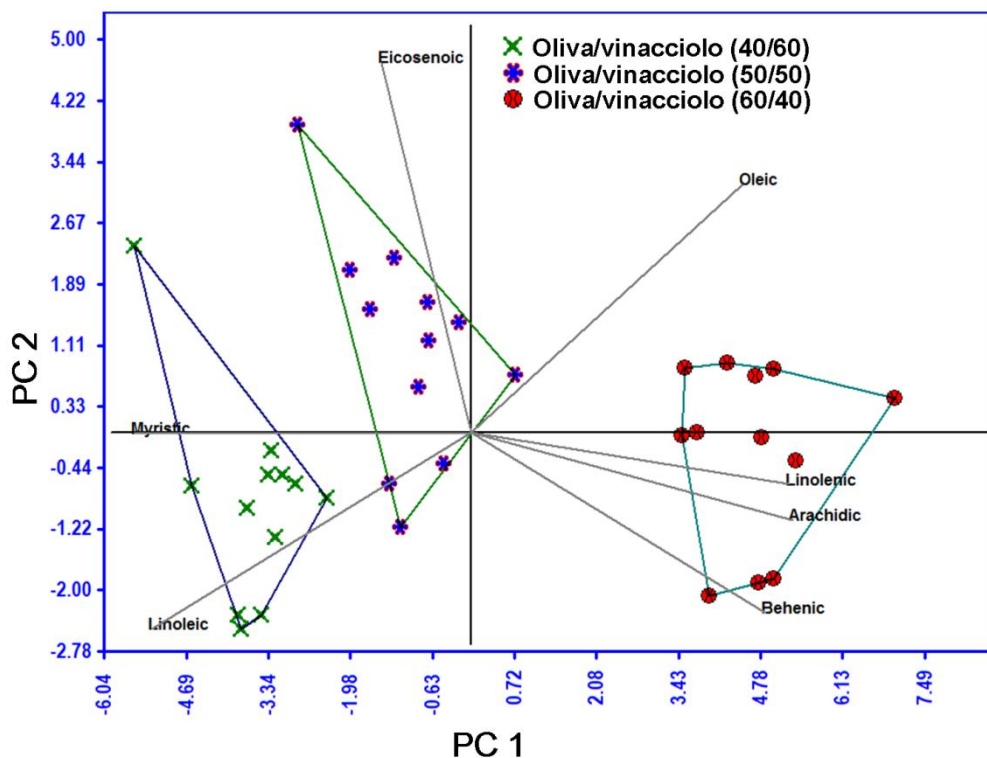


Figura 22: Biplot ottenuto applicando la PCA al data set oliva – vinacciolo.

5.2.2.5 PCA applicata ad un data set costituito da tutte le miscele

La PCA è stata applicata al data set costituito da tutti i campioni finora considerati. A questi si sono aggiunti quelli relativi alle miscele olio di oliva - olio di girasole, studiate separatamente nel precedente lavoro. E' stato quindi ottenuto un data set di 180 campioni.

Il criterio di selezione delle variabili è stato l'eliminazione di quelle più frequentemente escluse dai precedenti trattamenti statistici, a seguito ai risultati del test ANOVA. La PCA è stata quindi applicata a 8 variabili: acidi miristico, oleico, linoleico, arachico, linolenico, eicosenoico, beenico e lignocerico (con eliminazione degli acidi palmitico, palmitoleico, margarico, margaroleico e stearico).

Le prime 2 componenti principali hanno autovalori >1 e spiegano da sole l'85,10% della varianza contenuta nei dati.

Per quanto attiene alla visualizzazione grafica dei risultati, i campioni sono stati diversificati, in una prima fase, in funzione sia della percentuale di olio di oliva in essi contenuta, sia dell'olio di semi utilizzato nella miscela. Con questa modalità si visualizzano, pertanto, 15 raggruppamenti (per ciascuna delle 5 tipologie di oli di semi utilizzati nel presente lavoro, si definiscono 3 classi in funzione della percentuale di olio di oliva presente nelle miscele).

Attraverso il calcolo dei pesi di Fisher (valutati per ciascuna coppia di classi e per ciascuna PC attraverso il rapporto fra la varianza intercategoria e la varianza intracategoria) si è avuto modo di constatare che la PC1, la PC2 e la PC4 sono le componenti più significative ai fini del raggruppamento dei campioni in funzione della classe di appartenenza.

Si riportano quindi nelle figure 23(a) e 23(b), rispettivamente, i biplot della PC1 vs PC2 e della PC1 vs PC4. Dall'esame dei due biplot si osserva che i 15 gruppi sono ben separati tra loro in quasi tutti i casi; inoltre essi sono disposti in maniera tale da mostrare una maggiore vicinanza fra i campioni contenenti la stessa tipologia di oli (ad esempio oliva-girasole, oliva-mais, ecc.) piuttosto che tra campioni aventi la stessa percentuale di olio di oliva.

Queste prime visualizzazioni grafiche forniscono un'indicazione del fatto che le proprietà chimiche delle miscele sono strettamente legate alla loro effettiva composizione piuttosto che alla sola percentuale di olio di oliva in esse contenuta.

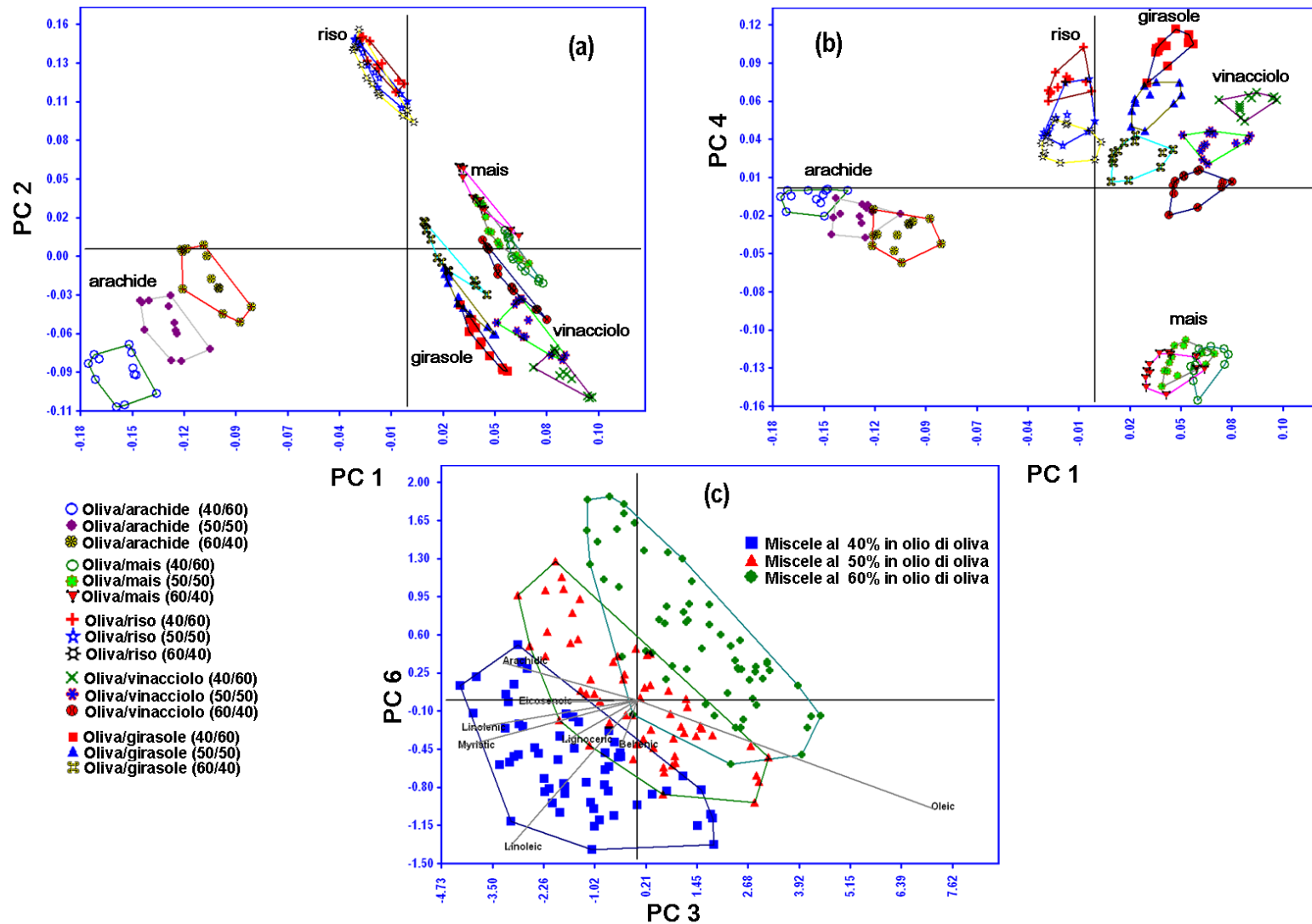


Figura 23: Biplots ottenuti applicando la PCA al data set costituito da tutte le miscele contenenti il 40%, 50% e 60% di olio di oliva (180 campioni). In (a) e (b) si visualizzano 15 gruppi (campioni diversificati in funzione sia della percentuale di olio di oliva, sia dell'olio di semi). In (c) si evidenziano 3 gruppi (campioni raggruppati esclusivamente in funzione del contenuto in olio di oliva).

I risultati ottenuti dalla PCA sono stati visualizzati anche considerando una suddivisione dei campioni in 3 classi, in funzione della percentuale di olio di oliva in essi contenuta. In questo caso si è potuto rilevare, attraverso il calcolo dei pesi di Fisher, che le componenti più significative ai fini del raggruppamento dei campioni in funzione della classe di appartenenza sono la PC3 e la PC6. Si riporta pertanto in figura 23(c) il biplot della PC3 vs PC6, dal quale si nota una certa sovrapposizione fra le classi 1 e 2 e fra le classi 2 e 3, mentre le classi 1 e 3 appaiono completamente separate.

Quest'ultima rappresentazione grafica consente di dedurre che è possibile, anche solo attraverso tecniche di tipo unsupervised, individuare un trend nella distribuzione dei campioni appartenenti a sistemi così complessi, nonostante lo studio di un consistente numero di miscele in funzione del solo contenuto di olio di oliva sia molto più elaborato rispetto alla valutazione di miscele binarie di oli (agevolmente differenziabili in funzione della percentuale di olio di oliva ivi presente).

Dalla distribuzione dei loadings si osserva che l'acido linoleico è orientato nella direzione di massima separazione fra le classi. Analogamente gli acidi beenico, lignocerico, miristico, linolenico ed eicosenoico appaiono tutti orientati nella direzione in cui sono maggiormente concentrati i campioni contenenti il 40% di olio di oliva.

5.2.3. Target factor analysis

La TFA è stata applicata ai quattro data set già sottoposti a PCA, cui sono stati aggiunti 6 “oggetti puri”: olio di oliva (avente composizione pari alla media dei 241 campioni di olio di oliva di cui al capitolo 4), olio di girasole, olio di mais, olio di arachide, olio di riso e olio di vinacciolo (differenti da quelli utilizzati per la preparazione delle miscele). In tabella 14 è riportato il profilo degli acidi grassi per i 6 oli puri.

La tecnica del TFA è stata applicata a mero scopo esplorativo, al fine di verificare la capacità del sistema di riconoscere il fingerprint degli oli puri utilizzati per produrre le miscele. Le variabili sono state sottoposte al column autoscaling. Il numero di fattori significativi è stato scelto utilizzando il criterio degli autovalori >1 .

	Oliva	Mais	Arachide	Vinacciolo	Girasole	Riso
Miristico	0.01	0.03	0.04	0.04	0.10	0.38
Palmitico	12.09	8.87	13.42	7.34	8.01	19.14
Palmitoleico	1.15	0.12	0.06	0.10	0.12	0.23
Margarico	0.05	0.07	0.05	0.05	0.00	0.04
Margaroleico	0.10	0.03	0.03	0.03	0.00	0.00
Stearico	3.01	1.92	3.08	3.65	3.21	2.13
Oleico	72.77	26.52	41.16	25.79	27.52	41.84
Linoleico	9.47	60.59	35.25	61.37	60.10	33.09
Arachico	0.36	0.39	1.47	0.29	0.18	1.02
Linolenico	0.60	0.90	0.10	0.52	0.05	0.86
Eicosenoico	0.23	0.19	0.94	0.22	0.11	0.46
Beenico	0.11	0.17	2.65	0.34	0.45	0.29
Lignocericico	0.05	0.21	1.59	0.26	0.14	0.48

Tabella 14: Composizione in acidi grassi (%m/m) dei 6 campioni di oli vegetali utilizzati come “oggetti puri” nella TFA.

Per quanto riguarda le miscele olio di oliva – olio di arachide, la PCA ha portato ad individuare 2 fattori significativi; ne consegue che la TFA debba identificare lo stesso numero di fattori reali, ovvero 2 tipologie di oli utilizzati per produrre le miscele. I 6 fattori inseriti nel data set, ordinati rispetto alla varianza residua, hanno dato come primo e secondo fattore target, rispettivamente, il profilo cromatografico dell’olio di oliva e dell’olio di arachide.

Per quanto attiene alle miscele olio di oliva – olio di mais, la PCA ha consentito di identificare soltanto un fattore significativo. Mediante l’applicazione della TFA si è riscontrato che i 6 fattori inseriti nel data set, ordinati rispetto alla varianza residua, hanno dato come primo fattore target il profilo cromatografico dell’olio di oliva. Il profilo dell’olio di mais compare come secondo fattore target.

Anche per le miscele olio di oliva – olio di riso la PCA ha individuato soltanto un fattore significativo. In seguito alla TFA il primo fattore target è risultato essere il profilo cromatografico dell’olio di riso, mentre il profilo dell’olio di oliva compare come secondo fattore target.

Riguardo, infine, alle miscele olio di oliva – olio di vinacciolo, la PCA ha portato a distinguere 2 fattori significativi, mentre la TFA ha dato come primo e secondo fattore target, rispettivamente, il profilo cromatografico dell'olio di oliva e dell'olio di mais. Il profilo dell'olio di vinacciolo compare come terzo fattore target. Questo mancato riconoscimento dell'olio di semi di vinacciolo potrebbe essere attribuibile alla similarità nel profilo acidico fra l'olio di vinacciolo utilizzato per la preparazione delle miscele e l'olio di mais inserito nella TFA.

La TFA è stata applicata infine al data set costituito da tutte le miscele, ottenendo come primo fattore target il profilo cromatografico dell'olio di oliva, unica tipologia di olio comune a tutti i campioni analizzati. Tale tecnica ha consentito complessivamente una buona descrizione dei sistemi studiati (ad esclusione delle miscele oliva-vinacciolo), anche se il numero di fattori significativi individuati non è stato sempre coerente con il numero di oli puri utilizzati per produrre le miscele.

5.2.4. SIMCA

Il SIMCA è stato applicato a ciascuno dei data set relativi alle miscele dell'olio di oliva con i quattro tipi di oli di semi analizzati, effettuando una cross-validazione con 6 gruppi di cancellazione, e utilizzando 7 componenti per la costruzione dei modelli di classe per le miscele olio di oliva-arachide e 6 componenti per gli altri tre tipi di miscele. SIMCA è stato impiegato, con un livello di confidenza del 95% per definire la distanza di classe e la unweighted augmented distance (Wold, Sjoström, 1977). Si sono ottenuti dei modelli con capacità di classificazione, sensibilità (corrispondente alla percentuale di campioni della classe modellata correttamente accettati dal modello) e specificità (definita come la percentuale di campioni di altre classi correttamente rifiutati dal modello, riferite alle stime della cross-validation) pari al 100%; la capacità di predizione è pari al 100% per le miscele riso-oliva e al 97,22% per gli altri tre tipi di miscela. Tali significativi risultati, esposti in tabella 15, sono coerenti con quelli ottenuti dall'applicazione della PCA agli stessi data set, per ciascuno dei quali le tre classi risultano ben separate già sul piano della PC1. Nelle figure 24-31 si riportano i Cooman's plot relativi alle classificazioni per ciascuno dei quattro data set analizzati.

	Arachide	Mais	Riso	Vinacciolo	Data set di 180 campioni
Capacità di classificazione media %	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Capacità di predizione media %	97,22	97,22	100,00	97,22	97,78
Sensibilità media %	100,00	100,00	100,00	100,00	95,56
Specificità media %	100,00	100,00	100,00	100,00	99,72

Tabella 15: SIMCA applicato ai quattro data set (miscela al 40%, 50% e 60% di olio di oliva) e al data set di 180 campioni: parametri di valutazione della performance dei modelli.

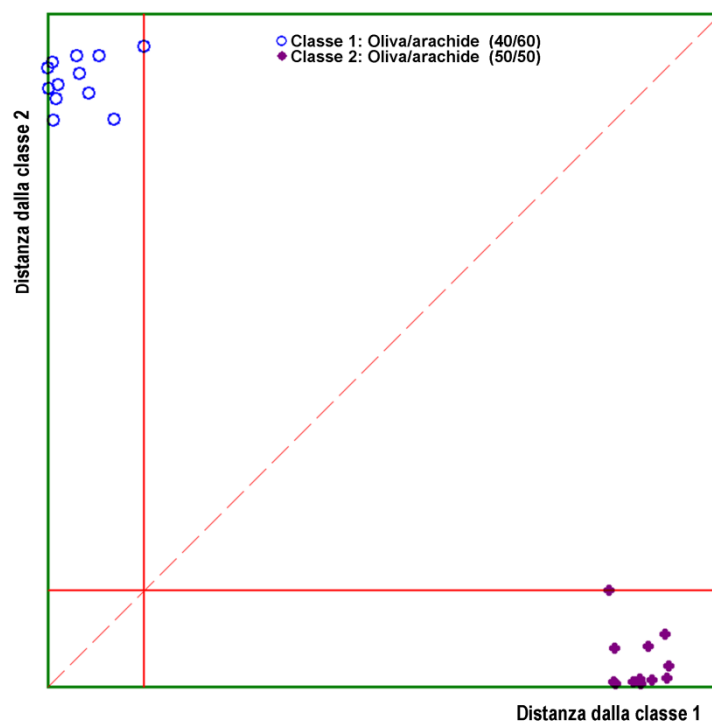


Figura 24: SIMCA applicato al data set oliva – arachide: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

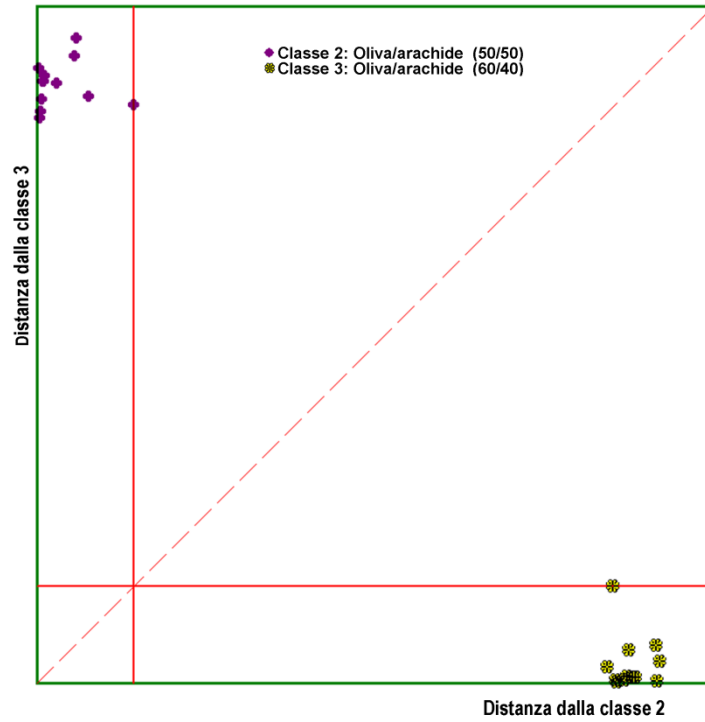


Figura 25: SIMCA applicato al data set oliva – arachide: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

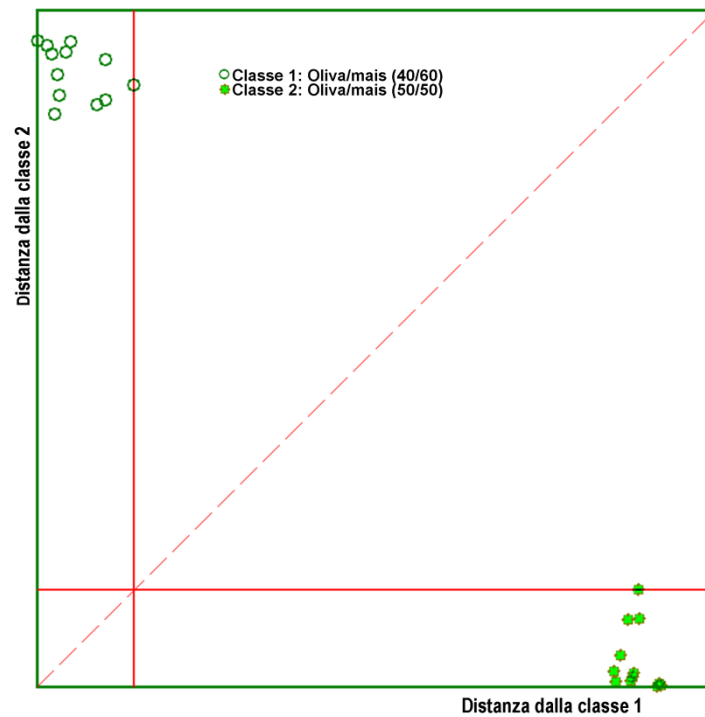


Figura 26: SIMCA applicato al data set oliva – mais: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

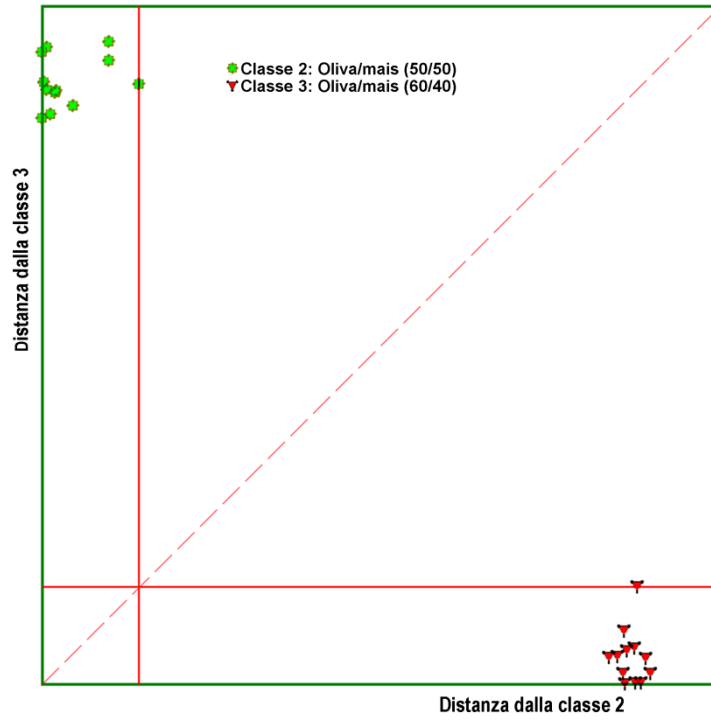


Figura 27: SIMCA applicato al data set oliva – mais: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

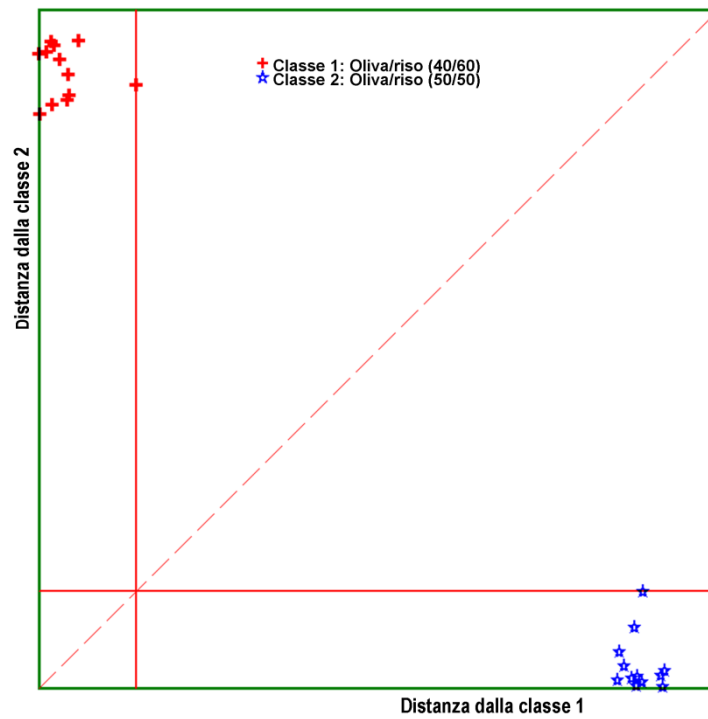


Figura 28: SIMCA applicato al data set oliva – riso: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

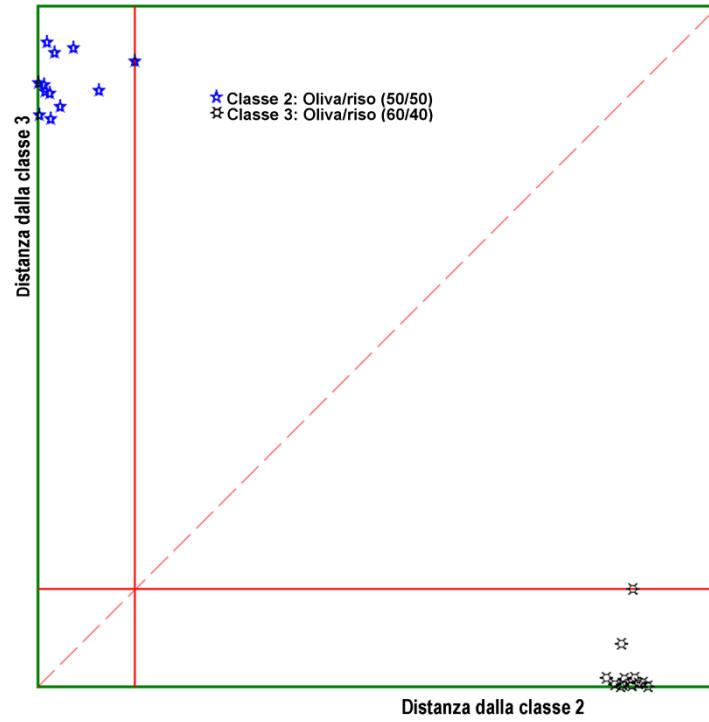


Figura 29: SIMCA applicato al data set oliva – riso: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

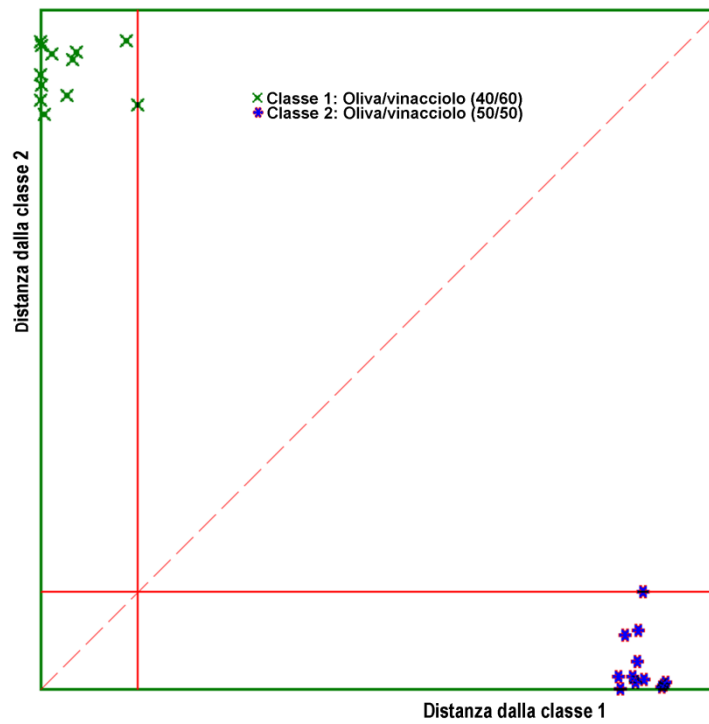


Figura 30: SIMCA applicato al data set oliva – vinacciolo: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

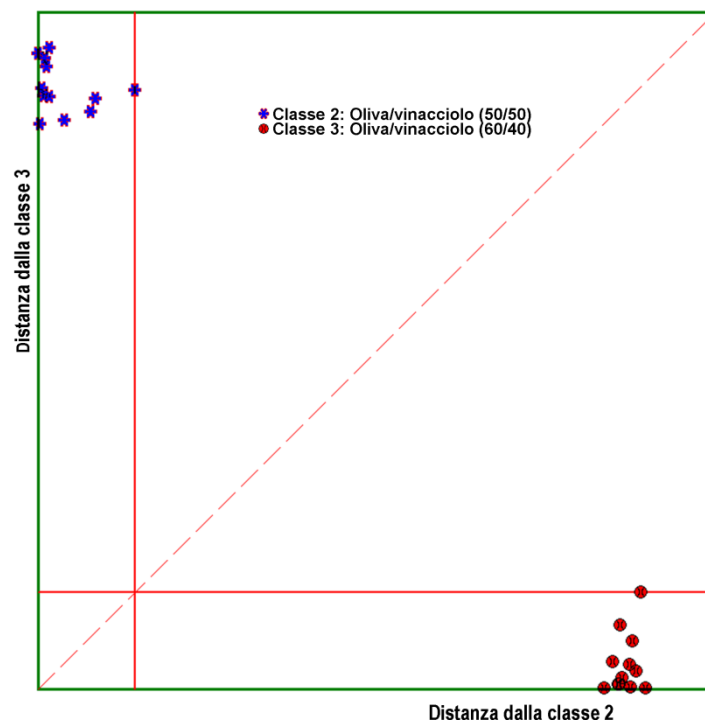


Figura 31: SIMCA applicato al data set oliva – vinacciolo: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

La tecnica del SIMCA è stata applicata anche al data set di 180 campioni (costituito da tutti i campioni finora considerati e da quelli relativi alle miscele olio di oliva - olio di girasole analizzate nel precedente lavoro) e 8 variabili (le stesse impiegate per la PCA nel paragrafo 5.2.2.5), effettuando una cross-validazione con 20 gruppi di cancellazione e utilizzando 7 componenti per la costruzione di ciascun modello di classe. La capacità di classificazione (modeling rate) per ciascuna delle 3 classi risulta essere del 100%. L'abilità di predizione (prediction rate) per ciascuna delle 3 classi è rispettivamente del 96,67%, 100% e 96,67%, mentre il valore medio, pari a 97,78%, è riportato in tabella 15.

La sensibilità risulta essere, per ciascuna delle 3 classi, pari a 96,67%, 95,0% e 95,0%. La specificità è anch'essa pari al 100%, fatta eccezione per la specificità della classe 3 verso la classe 2, pari al 98,75%. I valori medi di sensibilità e specificità, pari rispettivamente a 95,56 e 99,72, sono indicati in tabella 15.

Nelle figure 32 e 33 sono riportati i Cooman's plots (Coomans et al., 1984) riferiti rispettivamente alla classificazione dei campioni nelle classi 1 e 2 e nelle classi 2 e 3.

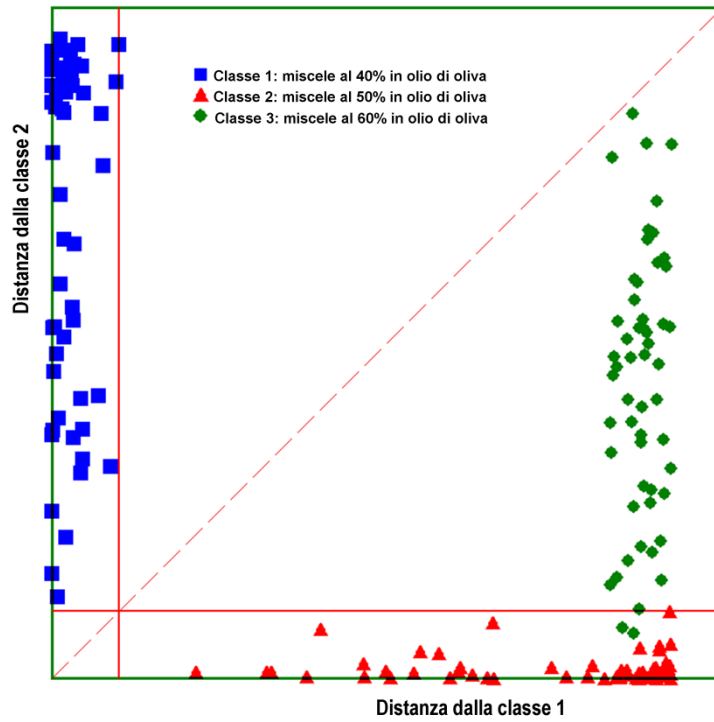


Figura 32: SIMCA applicato al data set di 180 campioni: Cooman's plot per le classi 1 e 2.

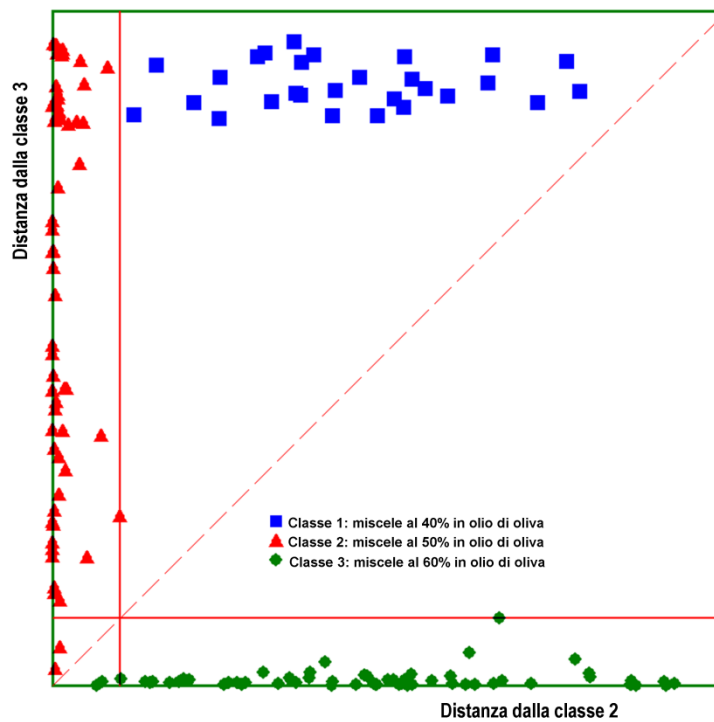


Figura 33: SIMCA applicato al data set di 180 campioni: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

L'applicazione del SIMCA, tecnica di tipo supervised e di modellamento di classe, consente di compiere un ulteriore passo in avanti rispetto ai risultati ottenuti mediante PCA, in quanto dimostra come sia possibile riuscire a studiare il sistema e a suddividerlo in tre classi al fine di ottenere un riconoscimento qualitativo. Tali classi, sebbene al loro interno siano piuttosto eterogenee, sono differenziabili in funzione della quantità di olio di oliva presente nella miscela.

5.2.5. PLS

L'algoritmo PLS è stato applicato separatamente ai quattro data set, ciascuno costituito da 36 campioni e dalle stesse variabili utilizzate per la PCA e per il SIMCA. Da ogni data set sono stati estratti 12 campioni, al fine di costruirne il relativo calibration set esterno. Le variabili sono state centrate, e si sono utilizzati 6 gruppi di cancellazione per la validazione del modello, ottenendo la migliore predizione con 3 variabili latenti per il data set oliva-arachide e 4 variabili latenti per gli altri tre data set. Ne consegue che la forma chiusa è stata calcolata con una complessità pari a 3 per il primo data set e 4 per gli altri data set.

L'algoritmo PLS è stato infine applicato al data set ottenuto riunendo tutti i campioni (180), analogamente a quanto già effettuato con PCA e SIMCA. Il data set esterno è stato ottenuto estraendo 30 campioni, sono stati utilizzati 15 gruppi di cancellazione e la migliore predizione si è avuta con 7 variabili latenti. La forma chiusa è stata calcolata con una complessità pari a 7.

In tabella 16 sono riportati i parametri con cui è stata valutata la performance dei modelli.

La capacità predittiva dei modelli, valutata attraverso il valore medio di SDEP rispetto ai gruppi di cancellazione, espressa in unità di percentuale di olio di oliva nelle miscele, è più che soddisfacente e risulta inoltre abbastanza omogenea fra tutti i data set considerati, compreso quello globale. Sono state ricavate anche delle buone prestazioni riferibili alla stabilità dei modelli (ovvero una minima variabilità nella prestazione tra un gruppo di cancellazione e l'altro) considerando i valori relativamente bassi della deviazione standard del parametro SDEP nei gruppi di cancellazione e della deviazione standard della media. Questi parametri

presentano dei valori leggermente più elevati, ma ancora accettabili per quanto attiene alle miscele mais-oliva e riso-oliva.

	Arachide	Mais	Riso	Vinacciolo	Data set di 180 campioni
Valore medio di SDEP nei gruppi di cancellazione	1,57	1,76	1,50	1,17	1,68
Dev. st. di SDEP	0,29	0,64	0,64	0,37	0,40
Dev. st. del valore medio di SDEP	0,12	0,26	0,38	0,16	0,10
RMSEP	1,28	4,22	4,98	2,83	3,97

Tabella 16: PLS applicato ai quattro data set (miscele al 40%, 50% e 60% di olio di oliva) e al data set di 180 campioni: parametri di valutazione della performance dei modelli.

Risultano infine più che tollerabili gli errori sulla predizione del test set esterno, valutati attraverso il parametro RMSEP (Kowalski, Seasholtz, 1991; Massart et al., 1997). Anche in questo caso le miscele mais-oliva e riso-oliva presentano degli errori più elevati (rispettivamente 4,22 e 4,98%).

Una valutazione complessiva del modello ottenuto analizzando tutti i campioni, che rappresenta la vera sfida analitica di questo lavoro sperimentale, è molto positiva in quanto detto modello di regressione – derivante da un set di oli di oliva scelti in maniera tale da avere la più ampia variabilità possibile nella concentrazione di acidi grassi, ognuno di essi miscelato con cinque differenti tipi di oli di semi – fornisce un errore in predizione pari a 1,68% ed un errore in predizione su un test set esterno pari al 3,97%.

5.2.6. Analisi di miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva

I risultati ottenuti dai trattamenti statistici multivariati appena descritti, in particolare quelli provenienti dall'applicazione dei metodi di classificazione e di regressione (errore in predizione pari a 3,97%) indicano che il metodo proposto ha la capacità di discriminare miscele che abbiano una differenza di concentrazione dell'olio di oliva inferiore al 5%. Sulla base di tali risultati e considerando che la calibrazione è stata effettuata utilizzando miscele con una differenza di concentrazione pari al 10% (livelli di concentrazione pari al 40%, 50% e 60%), è stato effettuato un ulteriore trattamento statistico includendo le miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva, inizialmente escluse.

Obiettivo di questa trattazione è stato quello di verificare la possibilità di migliorare ulteriormente le performance dei metodi supervised, nonostante i primi risultati del test ANOVA (par.5.2.1.) avessero indicato che per miscele con una differenza di concentrazione pari al 5%, la maggior parte delle variabili perdono potere discriminante, in quanto la varianza intercategoria tende ad essere paragonabile alla varianza all'interno della categoria.

Anche i presenti trattamenti statistici sono stati applicati alle variabili selezionate secondo lo schema riportato in tabella 13.

5.2.6.1 SIMCA

Il SIMCA è stato applicato ai 5 data set, effettuando una cross-validazione con 10 gruppi di cancellazione, e utilizzando 7 componenti per la costruzione dei modelli di classe per le miscele olio di oliva-arachide e oliva-girasole e 6 componenti per gli altri tre tipi di miscele. I risultati sono esposti in tabella 17; essi dimostrano che i modelli ottenuti consentono ancora una buona differenziazione dei campioni in funzione della classe di appartenenza.

E' stato costruito, infine, un data set contenente tutte le miscele analizzate, per un totale di 300 campioni e 8 variabili (quelle utilizzate per la PCA del paragrafo 5.2.2.5). La tecnica del SIMCA è stata impiegata effettuando una cross-validazione con 20 gruppi di cancellazione, e utilizzando 7 componenti per la costruzione di ciascun modello di classe. I risultati ottenuti, riportati anch'essi in tabella 17, sono ancora molto soddisfacenti e permettono una buona classificazione di miscele che presentino una differenza composizionale del 5% in

olio di oliva. I modelli ricavati considerando separatamente le miscele binarie mostrano, in ogni caso, una migliore performance.

	Girasole	Arachide	Mais	Riso	Vinacciolo	Data set di 300 campioni
Capacità di classificazione media %	100,00	100,00	98,33	100,00	100,00	85,33
Capacità di predizione media %	83,33	86,67	81,67	96,67	85,00	79,67
Sensibilità media %	100,00	100,00	100,00	98,33	100,00	95,67
Specificità media %	99,17	100,00	98,75	100,00	100,00	88,83

Tabella 17: SIMCA applicato ai cinque data set (miscele al 40%, 45%, 50%, 55% e 60% di olio di oliva) e al data set di 300 campioni: parametri di valutazione della performance dei modelli.

Nelle figure 34 e 35 sono mostrati i Cooman's plots riferiti rispettivamente alla classificazione dei campioni nelle classi 2 e 3 e nelle classi 3 e 4. Attraverso tali rappresentazioni grafiche è possibile evidenziare la capacità del modello di differenziare le miscele contenenti il 50% (classe 3) di olio di oliva da quelle contenenti il 45% (classe 2) e il 55% (classe 4). Si evince che esiste un certo numero di campioni appartenenti alle categorie 2 e 3 (figura 34), che sono classificati nella zona comune ad entrambe le classi, così come un certo numero di campioni appartenenti alle categorie 3 e 4 (figura 35), appaiono classificati nella zona comune ad entrambe le classi.

Si riportano nelle figure 36-45 i Cooman's plots ottenuti per le miscele binarie, dai quali si nota una drastica riduzione nella classificazione dei campioni nelle zone comuni a due classi. Anche attraverso la valutazione dei Cooman's plots si conferma pertanto che l'applicazione del SIMCA a data set costituiti da miscele binarie fornisce dei risultati migliori rispetto al data set complessivo.

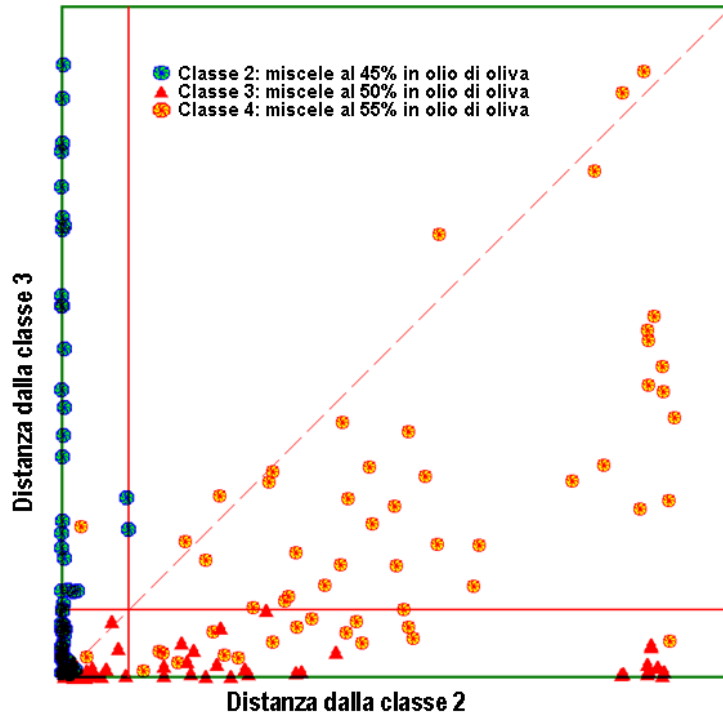


Figura 34: SIMCA applicato al data set di 300 campioni: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

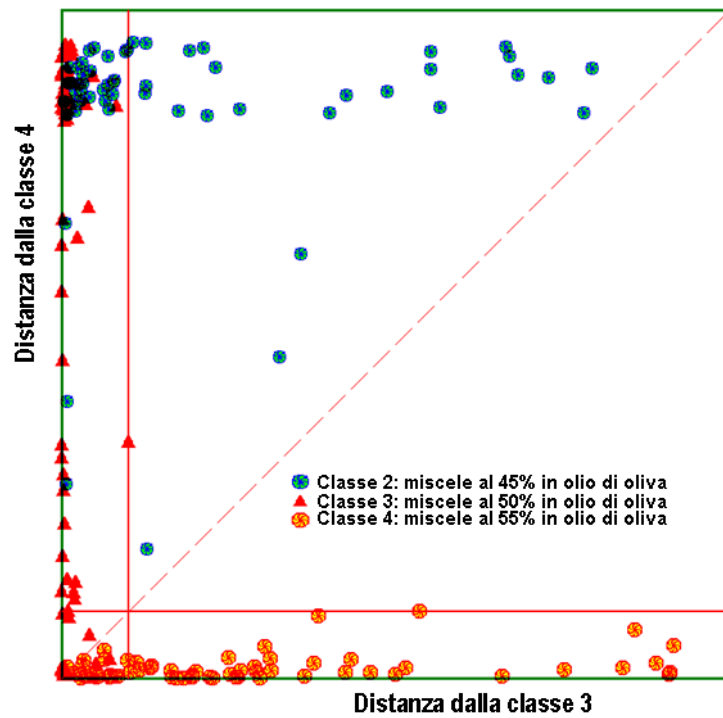


Figura 35: SIMCA applicato al data set di 300 campioni: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

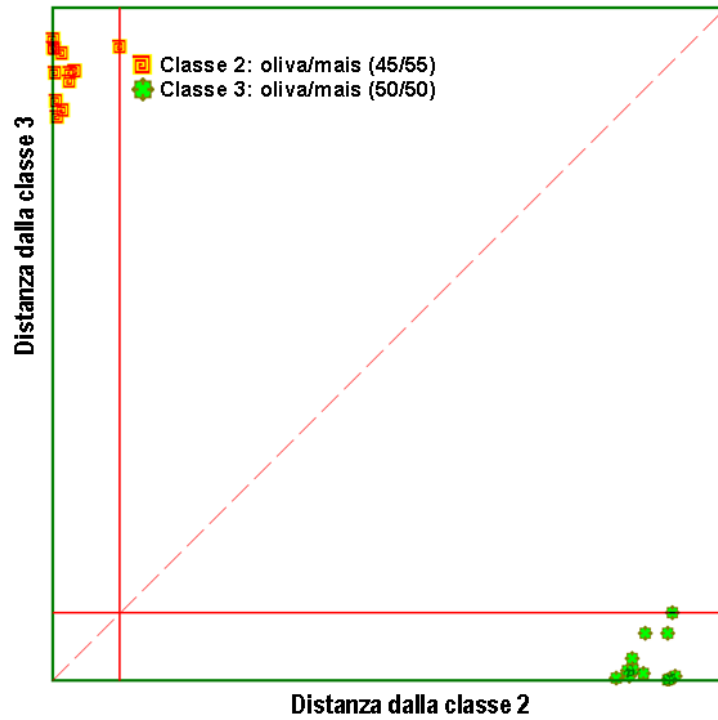


Figura 36: SIMCA applicato al data set oliva – mais: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

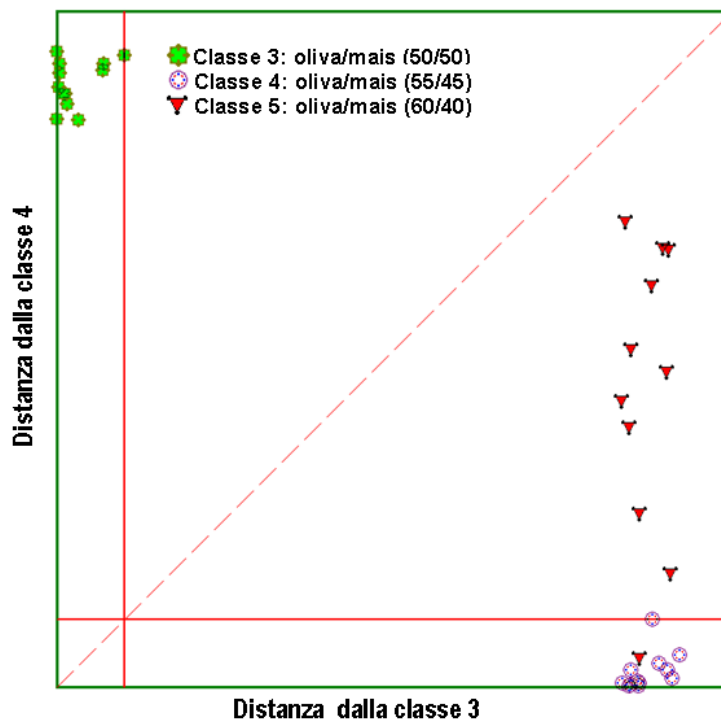


Figura 37: SIMCA applicato al data set oliva – mais: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

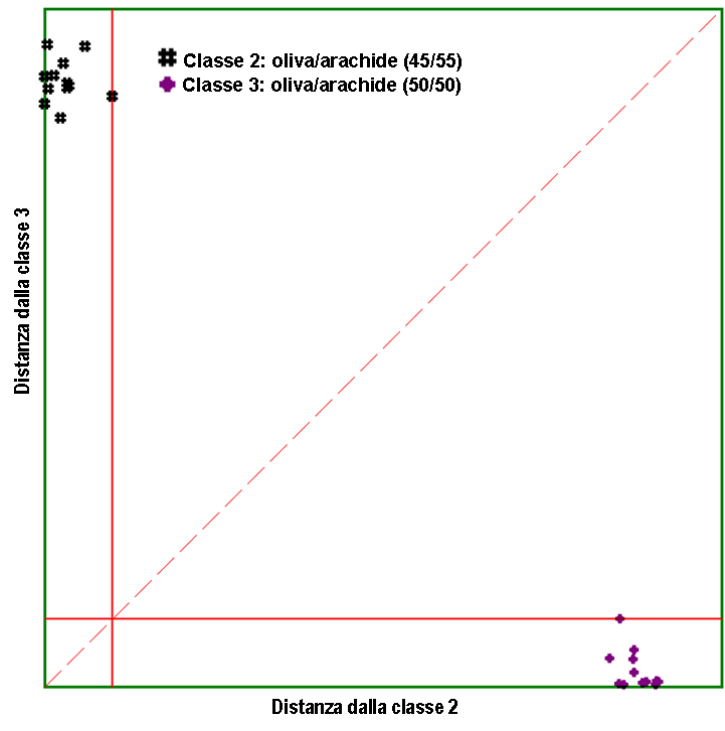


Figura 38: SIMCA applicato al data set oliva – arachide: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

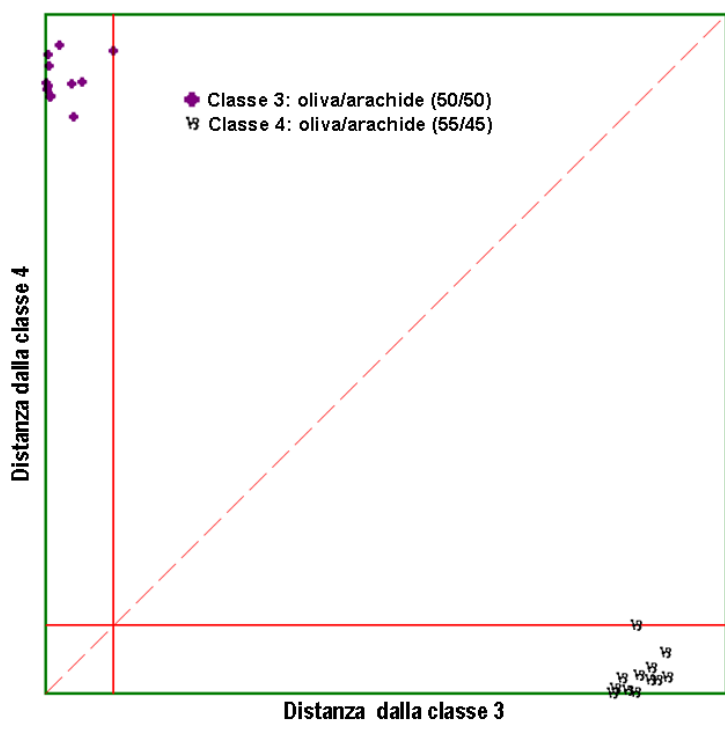


Figura 39: SIMCA applicato al data set oliva – arachide: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

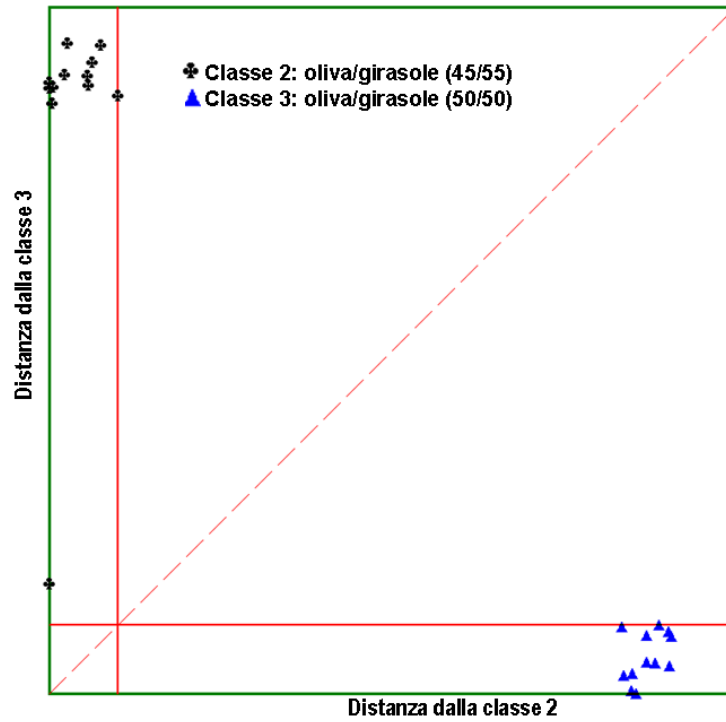


Figura 40: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

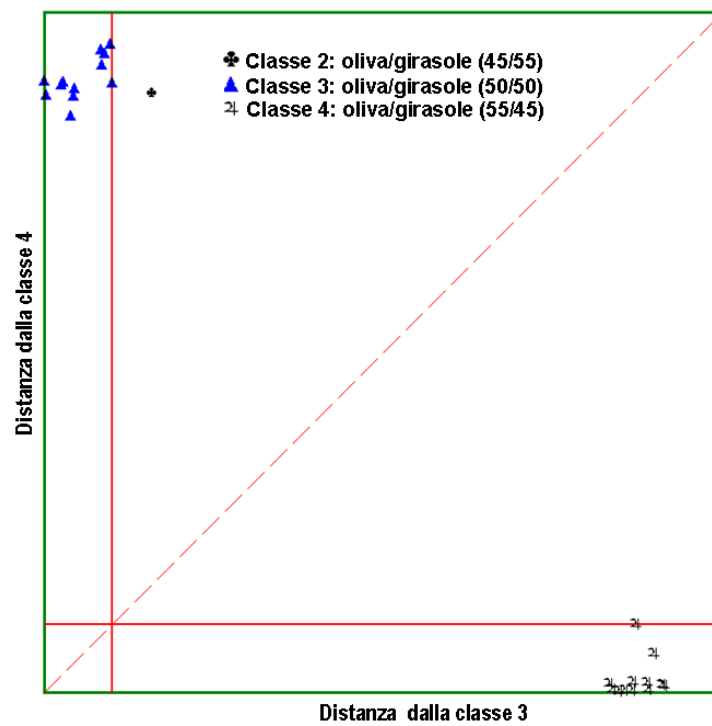


Figura 41: SIMCA applicato al data set oliva – girasole: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

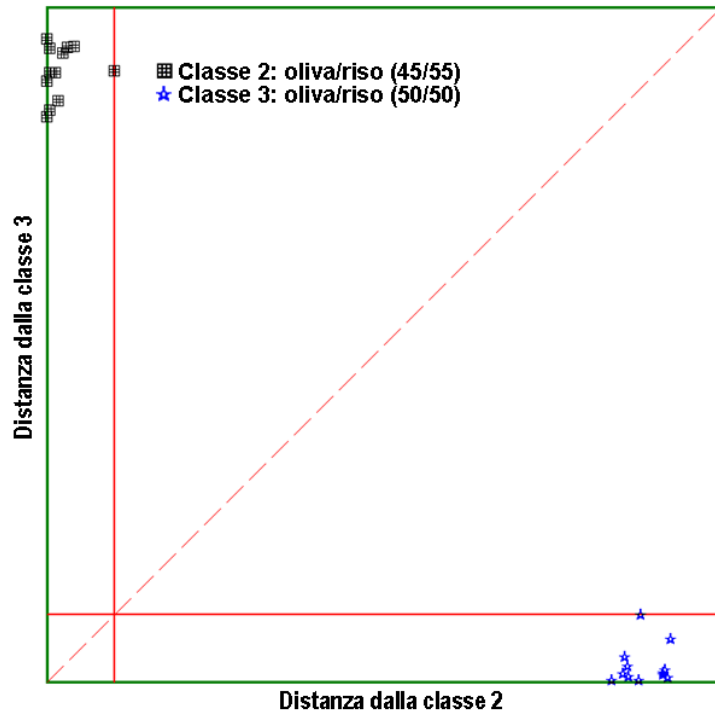


Figura 42: SIMCA applicato al data set oliva – riso: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

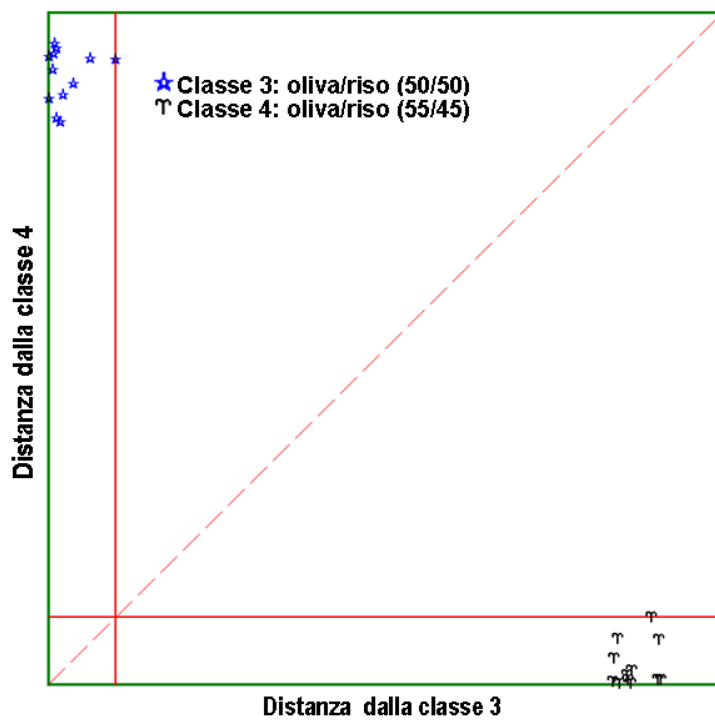


Figura 43: SIMCA applicato al data set oliva – riso: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

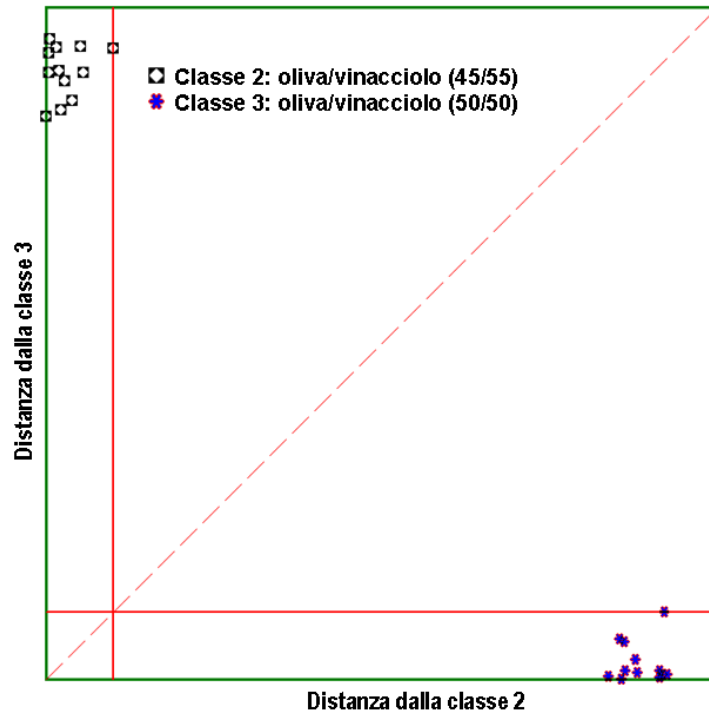


Figura 44: SIMCA applicato al data set oliva – vinacciolo: Cooman's plot per le classi 2 e 3.

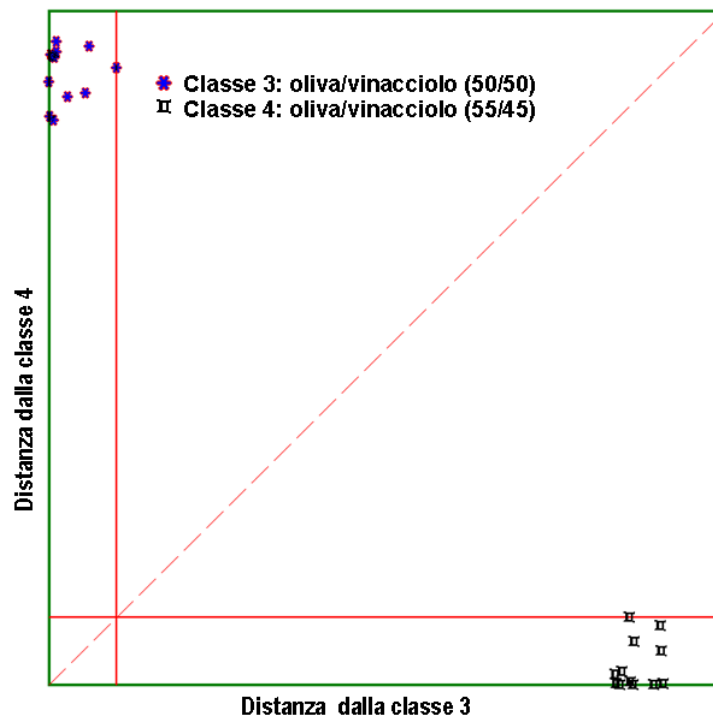


Figura 45: SIMCA applicato al data set oliva – vinacciolo: Cooman's plot per le classi 3 e 4.

5.2.6.2 PLS

Analogamente a quanto fatto per il SIMCA, anche la regressione mediante PLS è stata applicata ai 5 data set, estraendo 20 campioni per la costruzione del calibration set esterno.

Le variabili sono state centrate e sono stati utilizzati 10 gruppi di cancellazione per la validazione del modello, ottenendo la migliore predizione con 7 variabili latenti per il data set oliva-girasole, 6 variabili latenti per il data set oliva-arachide e 5 variabili latenti per gli altri tre data set. Ne consegue che la forma chiusa è stata calcolata con una complessità pari a 7 per il primo data set, 6 per il secondo data set e 5 per gli altri data set. L'algoritmo PLS è stato infine applicato al data set ottenuto riunendo tutti i campioni (300), analogamente a quanto già effettuato con SIMCA. Il data set esterno è stato creato estraendo 30 campioni; si sono utilizzati 27 gruppi di cancellazione e la migliore predizione è stata ricavata con 7 variabili latenti. La forma chiusa è stata calcolata con una complessità pari a 7. In tabella 18 sono riportati i parametri con cui è stata valutata la performance del modello.

	Girasole	Arachide	Mais	Riso	Vinacciolo	Data set di 300 campioni
Valore medio di SDEP nei gruppi di cancellazione	1,42	1,74	1,35	1,29	0,87	1,98
Dev. st. di SDEP	0,64	0,69	0,74	0,76	0,47	0,48
Dev. st. del valore medio di SDEP	0,20	0,22	0,23	0,24	0,15	0,09
RMSEP	2,83	2,34	4,96	3,53	3,38	4,62

Tabella 18: PLS applicato ai cinque data set (miscele al 40%, 45%, 50%, 55% e 60% di olio di oliva) e al data set di 300 campioni: parametri di valutazione della performance dei modelli.

Dal confronto di tali performances con quelle ottenute analizzando le miscele contenenti il 40%, 50% e 60% di olio di oliva (cfr. tabella 16), non si osservano differenze significative. In particolare, per quanto attiene alla capacità predittiva dei modelli, valutata attraverso il valore medio di SDEP rispetto ai gruppi di cancellazione, si può notare che vi è un generale miglioramento delle performance dei modelli, ad eccezione dei data set relativi alle miscele oliva-arachide e al data

set globale. Per quel che riguarda invece gli errori sulla predizione del test set esterno, valutati attraverso il parametro RMSEP, si assiste ad un generale peggioramento dei modelli, ad eccezione delle miscele oliva-riso, per le quali si ha viceversa un miglioramento della prestazione.

I parametri confrontati presentano tuttavia delle differenze piuttosto esigue; per questo motivo si può concludere che, ai fini di una determinazione quantitativa, per miscele contenenti una quantità di olio di oliva prossima al 50% sia fondamentale il confronto con miscele contenenti il 40%, 50% e 60% di olio di oliva. I modelli costruiti mostrano delle capacità predittive inferiori al 5% e il confronto con miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva conferma tale risultato ($RMSEP = 4,62$) non apportando dei miglioramenti di performance significativi. Questo risultato assume una rilevante importanza qualora si debba caratterizzare una miscela incognita utilizzando un data set rappresentativo di una consistente variabilità sia nella composizione acidica degli oli di oliva che degli oli di semi.

Qualora invece si possa confrontare il campione incognito con miscele contenenti una ben definita tipologia di olio di semi, si è in presenza di condizioni sicuramente più favorevoli nelle quali è possibile creare modelli con errori in predizione generalmente inferiori a quelli ottenuti con il data set globale. In questi casi l'inserimento nella calibrazione di miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva può essere utilmente percorso al fine di migliorare la conoscenza del sistema, in quanto possono ricavarsi utili informazioni dall'applicazione delle tecniche di modellamento di classe, pur non derivando sempre un miglioramento degli errori in predizione sulla calibrazione multivariata. In figura 46(a) e 46(b) sono riportate, rispettivamente, le percentuali di olio di oliva previste e calcolate in funzione delle percentuali reali.

Lo studio di miscele che differiscono per una concentrazione di olio di oliva pari al 10% ha consentito l'individuazione delle variabili statisticamente significative per gli scopi del presente studio, mentre l'analisi di miscele che differiscono per una concentrazione di olio di oliva pari al 5% ha permesso una valutazione più completa delle potenzialità e dei limiti del metodo proposto.

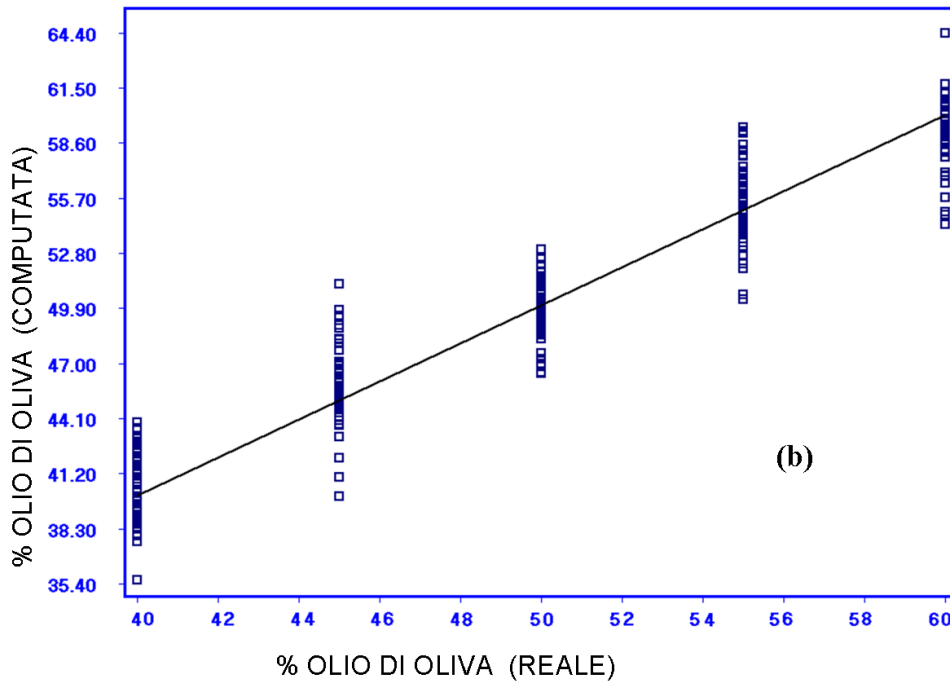
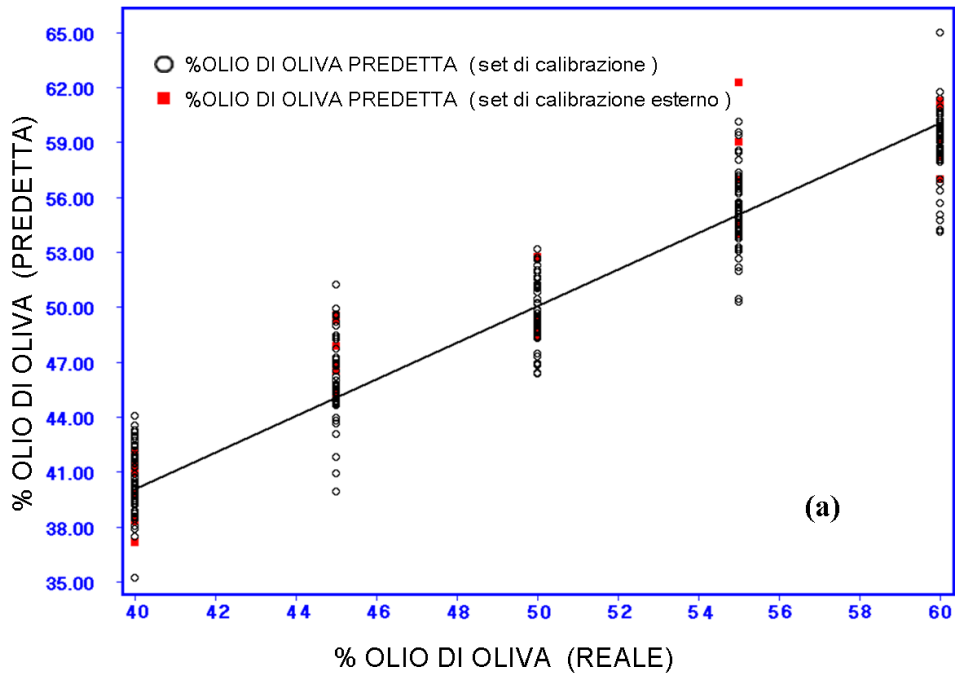


Figura 46: PLS applicato al data set di 300 campioni: concentrazioni di olio di oliva predette (fig. 46(a)) e compute (fig. 46(b)) in funzione della concentrazione reale.

5.3 Conclusioni della sperimentazione

L'estensione dello studio condotto nella sperimentazione preliminare (data set oliva- girasole) a miscele di olio di oliva con altre quattro tipologie di olio di semi (arachide, mais, riso e vinacciolo) ha confermato pienamente i primi risultati, portando alla costruzione di modelli che consentono di riconoscere e verificare la percentuale di olio di oliva in una miscela binaria.

Inoltre l'applicazione dei metodi supervised al data set costituito da tutte le miscele aventi una concentrazione di olio di oliva pari al 40%, 50% e 60% ha permesso di creare un ottimo modello di classificazione attraverso il SIMCA (sensibilità pari a 95,56% e selettività pari a 99,72%) e un ottimo modello quantitativo attraverso il PLS (con un valore medio di SDEP pari a 1,68% e RMSEP pari a 3,97%).

L'introduzione delle miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva ha consentito di ottenere ancora validi modelli di classificazione. In questo caso risultati nettamente migliori si sono riscontrati applicando il SIMCA ai gruppi di miscele binarie anziché al data set complessivo.

Per quanto riguarda invece l'algoritmo PLS, l'introduzione delle miscele al 45% e al 55% di olio di oliva non ha apportato miglioramenti significativi, anzi in alcuni casi si sono osservati addirittura lievi peggioramenti negli errori in predizione. In linea generale si conferma un errore in predizione sull'evaluation set esterno inferiore al 5%.

E' possibile concludere che l'applicazione di questo metodo allo studio di una miscela incognita per verificarne la conformità a quanto previsto dal Reg. UE 29/2012 può essere affrontato adottando dei calibration set che includano miscele al 40%, 45%, 50%, 55% e 60% di olio di oliva, nel caso in cui si debba effettuare un confronto con un solo tipo di miscele binarie. Qualora invece non si conosca la tipologia di olio di semi utilizzato nella miscela e sia quindi necessario il confronto con varie tipologie di miscele binarie, può essere sufficiente costruire un calibration set contenente miscele al 40%, 50% e 60% di olio di oliva.

CONCLUSIONI

Da un esame del contesto legislativo europeo è emerso come siano state abbattute le barriere alla commercializzazione di miscele di olio di oliva e oli di semi nel territorio dell'Unione, e ciò a prescindere dai divieti nazionali sulla produzione delle miscele per il consumo interno.

A fronte di tale liberalizzazione, non esiste tuttavia un metodo analitico ufficiale che consenta il controllo della percentuale di un olio di oliva e quindi la veridicità di quanto riportato in etichetta, sia allo scopo di garantire una giusta tutela al consumatore, che per una finalità di controllo dell'operato delle imprese. In particolare assume rilevanza discriminante, in materia di etichettatura, la quantità del 50% di olio di oliva.

Da un punto di vista analitico il problema delle miscele si è rivelato sensibilmente differente dallo studio delle frodi connesse all'adulterazione di una matrice costituita prevalentemente da olio di oliva (extra vergine o no). Mentre infatti questa tipologia di problema, ampiamente affrontata sia dalla letteratura che dalla legislazione europea, è finalizzata a rivelare la presenza fraudolenta di parametri che dovrebbero essere pressoché assenti (ovvero ricadere all'interno di certi limiti di legge), lo studio di miscele comporta invece un approccio totalmente differente, richiedendo la valutazione di matrici che conservano il fingerprint dell'olio di oliva (indipendentemente dalla categoria merceologica di appartenenza) soltanto per il 50% della composizione.

Lo studio sviluppato in questo lavoro di tesi è stato dunque finalizzato a verificare la possibilità di differenziare miscele binarie il cui contenuto di olio di oliva sia pari al 40%, 50% e 60%. Le analisi chimiche sono state condotte sugli esteri metilici degli acidi grassi, parametri che offrono il vantaggio di fornire un fingerprint dell'olio di oliva a prescindere dalla categoria merceologica di appartenenza (vergini, raffinato, sansa, ecc.), ma hanno il limite di manifestare già una consistente variabilità intrinseca per gli oli di oliva. Si pensi al solo acido oleico che presenta un range di variabilità compreso fra il 55,0% e l'83,0%. Tale inconveniente è stato tenuto in considerazione preparando le miscele a partire da oli di oliva con notevoli differenze nel profilo degli acidi grassi. I dati sono stati elaborati con tecniche di analisi statistica multivariata che hanno consentito di

evidenziare, attraverso l'analisi delle componenti principali (PCA), la naturale variabilità esistente fra le miscele in funzione della percentuale di olio di oliva.

Risultati significativi sono stati ottenuti con il Soft Independent Models of Class Analogy (SIMCA) che ha offerto un ottimo modello di classificazione e l'elaborazione di una regola di decisione per valutare se una miscela incognita possa essere ricondotta ad uno dei gruppi analizzati. Anche il Partial Least Squares (PLS), metodo di calibrazione multivariata, si è rivelato molto efficace, permettendo la determinazione della percentuale di olio di oliva in una miscela con un errore di predizione inferiore al 5% (espresso come concentrazione di olio di oliva nella miscela).

Sulla base di tali risultati il metodo proposto è stato anche testato su miscele che presentano una differenza di concentrazione reale di olio di oliva pari al 5%: sono state aggiunte miscele contenenti il 45% ed il 55% di olio di oliva. In questo caso si è riscontrato un miglioramento della performance dei soli metodi di classificazione se applicati ai gruppi di miscele binarie anziché al data set complessivo; al riguardo i risultati della calibrazione multivariata non hanno fornito dei miglioramenti significativi.

In conclusione, il metodo di analisi proposto nel presente lavoro di tesi può dimostrarsi efficace per il controllo delle miscele legali di oli di oliva e oli di semi al fine di verificarne la conformità a quanto previsto dal Reg. UE 29/2012. La miscela in esame deve essere confrontata con un set di miscele a composizione nota, contenenti il 40%, il 50% e il 60% di olio di oliva. Tali miscele devono essere preparate a partire da oli di oliva rappresentativi della naturale variabilità esistente in ordine al profilo di acidi grassi. Infine, qualora si conosca la tipologia di olio di semi utilizzato per la preparazione della miscela incognita, il set di calibrazione può includere anche miscele contenenti il 45% e il 55% di olio di oliva.

BIBLIOGRAFIA

Riferimenti bibliografici

Alonso-Salces, R.M., Héberger, K., Holland, M.V., Moreno-Rojas, J.M., Mariani, C., Bellan, G., Reniero, F., Guillou, C. (2010). Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chemistry*, 118, 956-965.

Alonso-Salces, R.M., Holland, M.V. Guillou, C. (2011). ¹H NMR fingerprinting to evaluate the stability of olive oil. *Food Control*, 22, 2041-2046.

Amelotti, G. (1990). *Sostanze grasse alimentari*, CLESAV, Milano.

Brereton, R.G., (2003). *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Wiley.

Bucci, R., Magrì, A.D., Magrì, A.L., Marini, D., Marini, F. (2002). Chemical Authentication of Extra Virgin Olive Oil Varieties by Supervised Chemometric Procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 413-418.

Camin, F., Larcher, R., Perini, M., Bontempo, L., Bertoldi, D., Gagliano, G., Nicolini, G., Versini, G. (2010). Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chemistry* 118 901–909.

Caponio F., Conte L., Summo C., Paradiso V.M., Pedone G., Gomes T. *Evoluzione della normativa per la classificazione merceologica degli oli d'oliva. La rivista italiana delle sostanze grasse - Vol . LXXXIX - Gennaio/Marzo 2012 pagg 29-39.*

Cinquanta, L., Esti, M., La Notte E. (1997). Evolution of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil During Storage, *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*. 74 (10), 1259-1264.

Codex Standard for Named Vegetable Oils. Codex Stan 210-1999.

Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils. Codex Stan 33-1981.

Coomans, D., Broeckart, I., Derde, M.P., Tassin, A., Massart, D.L., & Wold, S. (1984). Use of a microcomputer for the definition of multivariate confidence regions in medical diagnosis based on clinical laboratory profiles. *Computers and Biomedical Research*, 17, 1-14.

Cossignani, L., Simonetti, M. S., Damiani P. (2001). Structural changes of triacylglycerol and diacylglycerol fractions during olive drupe ripening. *European Food Research and Technology*. 212, 160–164.

Cossignani, L., Luneia, R., Damiani, P., Simonetti, M. S., Ricciari, R., Tiscornia, E. (2007). Analysis of isomeric diacylglycerolic classes to evaluate the quality of olive oil in relation to storage conditions. *European Food Research and Technology*, 224, 379–383.

Dais, P., Hatzakis, E. (2013). Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Analytica Chimica Acta* 765 1–27.

De la Mata, P., Dominguez-Vidal, A., Bosque Sendra, J.M., Ruiz-Medina, A., Cuadros Rodríguez, L., & Ayora-Cañada, M.J. (2012). Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. *Food Control*, 23, 449-455.

De la Mata-Espinosa, P., Bosque-Sendra, J.M., Bro, R., & Cuadros-Rodríguez, L. (2011). Olive oil quantification of edible vegetable oil blends using triacylglycerols chromatographic fingerprints and chemometric tools. *Talanta*, 85, 177-182.

Diaz, T.G., Merás, I.D., Casas, J.S., Franco, M.F.A. (2005). Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control*, 16, 339-347.

D’Imperio, M., Mannina, L., Capitani, D., Bidet, O., Rossi, E., Bucarelli, F.M., Quaglia, G.B., Segre, A. (2007). NMR and statistical study of olive oils from Lazio: a geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chemistry*, 105, 1256-1267.

Fasciotti, M., & Pereira Netto, A.D. (2010). Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. *Talanta*, 81, 1116-1125.

Forina, M., Lanteri, S., Armanino, C., Cerrato-Oliveiros, C., & Casolino C. V-PARVUS 2010: An Extendable Package of Programs for Data Explorative Analysis, Classification and Regression Analysis, Department of Chimica e Technologie Farmaceutiche e Alimentari, University of Genova, Genova, Italy. URL <http://www.parvus.unige.it>.

Gallardo-Guerrero, M. L., Roca, M., Gandul-Rojas, B., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2004). Storage influence on the initial content and class of pigments of virgin olive oil. In *Proceeding of 3rd international congress ‘‘Pigments in Foods’’*. Quimper, France, June.

Gandul-Rojas, B., Roca, M., & Mínguez-Mosquera, M. I. (1999). Chlorophyll and carotenoid pattern in virgin olive oil. Adulteration control. In M. I. Mínguez-Mosquera, M. Jareń-Galań, & D. Hornero-Méndez, (Eds.), *Proceeding of 1st international congress on pigments in food technology* (p. 381). Sevilla, Spain.

- García-González, D.L., Mannina, L., D'Imperio, M., Segre A.L., & Aparicio, R., (2004). Using ^1H and ^{13}C NMR techniques and artificial neural networks to detect the adulteration of olive oil with hazelnut oil. *European Food Research and Technologies*, 219, 545-548.
- Gurdeniz, G., & Ozen, B. (2009). Detection of adulteration of extra-virgin olive oil by chemometric analysis of mid-infrared spectral data. *Food Chemistry*, 116, 519-525.
- IBM SPSS Statistics computer program, Version 19, 2010.
- Jung, J., Puff, B., Eberts, T., Hener, U., Mosandl, A. (2007). Reductive ester cleavage of acyl glycerides—GC-C/P-IRMS measurements of glycerol and fatty alcohols. *European Food Research and Technology*, 225, 191–197.
- Kasemsumran, S., Kang, N., Christy, A., & Ozaki, Y., (2005). Partial Least Squares Processing of Near-Infrared Spectra for Discrimination and Quantification of Adulterated Olive Oils. *Spectroscopy Letters*, 38, 839-851.
- Kowalski, B.R., & Seasholtz, M.B. (1991). Recent developments in multivariate calibration. *Journal of Chemometrics*, 5, 129-145.
- Lohnes, M.T., Guy, R.D., Wentzell, P.D. (1999). Window target-testing factor analysis: theory and application to the chromatographic analysis of complex mixtures with multiwavelength fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 389, 95-113.
- Longobardi, F., Ventrella, A., Napoli, C., Humpfer, E., Schütz, B., Schäfer, H., Kontominas, M.G., Sacco, A. (2012). Classification of olive oils according to geographical origin by using ^1H NMR fingerprinting combined with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 130 (1), 177-183.
- Maggio, R.M., Cerretani, L., Chiavaro, E., Kaufman T.S., & Bendini A. (2010). A novel chemometric strategy for the estimation of extra virgin olive oil adulteration with edible oils. *Food Control*, 21, 890-895.
- Mannina, L., Marini, F., Gobbino, M., Sobolev, A.P., Capitani, D. (2010). NMR and chemometrics in tracing European olive oils: The case study of Ligurian samples. *Talanta*, 80, 2141-2148.
- Marini, F., Magrì, A.L., Bucci, R., Balestrieri, F., Marini, D. (2006). Class-modeling techniques in the authentication of Italian oils from Sicily with a protected Denomination of origin (PDO). *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 80, 140-149.
- Massari P. (2004). Il commento. *Corriere tributario*, 32, 2561-2565.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., & Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Data Handling in Science and Technology 20A, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A*, Elsevier, Amsterdam.

Miao, L., Cai, W., Shao, X. (2011). Rapid analysis of multicomponent pesticide mixture by GC-MS with the aid of chemometric resolution. *Talanta*, 83, 1247-1253.

Monfreda, M., Gobbi, L., Grippa, A. (2012). Blends of olive oil and sunflower oil: characterisation and olive oil quantification using fatty acid composition and chemometric tools. *Food Chemistry*, 134, 2283-2290.

Monfreda, M., Gobbi, L., Grippa, A. (2014). Blends of olive oil and seeds oils: characterisation and olive oil quantification using fatty acids composition and chemometric tools. Part II. *Food Chemistry*, 145, 584-592.

Olivae/No. 117-2012 pagg. 3-4. *Date importanti nella storia del COI. Jean-Louis Barjol.*

Olivae/No. 113-2010 pagg. 5-6. *Storia degli accordi internazionali sull'olio di oliva e sulle olive da tavola.*

Papadia, P., Del Coco, L., Muzzalupo, I., Rizzi, M., Perri, E., Cesari, G., Simeone, V., Mondelli, D., Schena, F.P., Fanizzi, F.P. (2011). Multivariate analysis of ¹H-NMR spectra of genetically characterized extra virgin olive oils and growth soil correlations. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (10), 1463-1475.

Parcerisa, J., Casals, I., Boatella, J., Codony, R., & Rafecas, M. (2000). Analysis of olive and hazelnut oil mixtures by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of triacylglycerols and gas-liquid chromatography of non-saponifiable compounds (tocopherols and sterols). *Journal of Chromatography A*, 881, 149-158.

Peña, F., Cárdenas, S., Gallego, M., & Valcárcel, M. (2005). Direct olive oil authentication: Detection of adulteration of olive oil with hazelnut oil by direct coupling of headspace and mass spectrometry, and multivariate regression techniques. *Journal of Chromatography A*, 1074, 215-221.

Pizarro, C., Rodríguez-Tecedor, S., Pérez-del-Notario, N., González-Sáiz, J.M. (2011). Recognition of volatile compounds as markers in geographical discrimination of Spanish extra virgin olive oils by chemometric analysis of non-specific chromatography volatile profiles. *Journal of Chromatography A*, 1218 (3), pp. 518-523.

Pouliarekou, E., Badeka, A., Tasioula-Margari, M., Kontakos, S., Longobardi, F., Kontominas, M.G. (2011). Characterization and classification of Western Greek

olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 1218 (42), 7534-7542.

Poulli, K.I., Mousdis, G.A., & Georgiou, C.A. (2007). Rapid synchronous fluorescence method for virgin olive oil adulteration assessment. *Food Chemistry*, 105, 369-375.

Priego Capote, F., Ruiz Jiménez, J., & Luque de Castro, M.D. (2007). Sequential (step-by-step) detection, identification and quantitation of extra virgin olive oil adulteration by chemometric treatment of chromatographic profiles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1859-1865.

Rohman, A. & Che Man, Y.B. (2012). Authentication of extra virgin olive oil from sesame oil using FTIR spectroscopy and gas chromatography. *International Journal of Food Properties*, 15, 1309-1318. *Regio Decreto Legge n. 1986 del 27 settembre 1936. Gazzetta Ufficiale del Regno d'Italia n. 272 del 24 novembre 1936.*

Roca, M., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., & Minguéz-Mosquera, M. I. (2003). Pigment parameters determining Spanish virgin olive oil authenticity: stability during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80, 1237-1240.

Royer, A., Gerard, C., Naulet, N., Lees, M., Martin, G.J. (1999). Stable Isotope Characterization of Olive Oils. I—Compositional and Carbon-13 Profiles of Fatty Acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76 (3) 357-363.

Ruiz-Samblás, C., Marini, F., Cuadros-Rodríguez, L., & González-Casado, A. (2012). Quantification of blending of olive oils and edible vegetable oils by triacylglycerol fingerprint gas chromatography and chemometric tools. *Journal of Chromatography B*, 910, 71-77.

Shao, L., Roske, C.W., Griffiths, P.R. (2010). Detection of chemical agents in the atmosphere by open-path FT-IR spectroscopy under conditions of background interference: II. Fog and rain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1521-1528.

Toti Elisabetta. Le principali novità del nuovo regolamento sull'etichettatura degli alimenti. *La rivista di scienza dell'alimentazione*, numero IV, ottobre-dicembre 2011, anno 40.

Unioncamerelombardia. Camere di commercio lombarde. (2009). *Guida pratica alle regole di origine della merce e alla nuova "normativa sul "made in Italy"*.

Unioncamere. Camere di commercio d'Italia. (2010). *Guida pratica per l'etichettatura e presentazione degli oli di oliva*.

Unioncamere Piemonte e Camera di commercio industria artigianato e agricoltura di Torino. Unione europea: istruzioni per l'uso. Guida pratica n. 3/2012. L'etichettatura dei prodotti alimentari. La normativa dell'Unione europea e nazionale.

Vichi, S., Lazzez, A., Grati-Kamoun, N., Caixach J. (2012). *Modifications in virgin olive oil glycerolipid fingerprint during olive ripening by MALDI-TOF MS analysis. Food Science and Technology* 48, 24- 29.

Vigli, G., Philippidis, A., Spyros, A., & Dais, P. (2003). Classification of Edible Oils by Employing ^{31}P and ^1H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5715-5722.

Wold, S., Sjostrom, M. (1977) in: B.R. Kowalski (Ed.) *Chemometrics, Theory and Application*, ACS Symposium Series No. 52, American Chemical Society, Washington, DC, 243-282.

Riferimenti normativi e giurisprudenziali

Accordo di Madrid relativo alla repressione delle indicazioni false o fallaci del 14 aprile 1891 riveduto a Washington il 2 giugno 1911, a l'Aja il 6 novembre 1925, a Londra il 2 giugno 1934 e a Lisbona il 31 ottobre 1958.

Consiglio di Stato, Sez. VI - 31 gennaio 2003 - Sentenza n. 482.

Convenzione internazionale sul sistema armonizzato di designazione e di codificazione delle merci (*Gazzetta ufficiale n. L 198 del 20/07/1987 pag. 0003 – 0010*).

Decreto 10 novembre 2009. Disposizioni nazionali relative alle norme di commercializzazione dell'olio di oliva. (GU n.12 del 16-1-2010).

Decreto Legislativo 27 gennaio 1992, n. 109. Attuazione delle direttive n. 89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari. (GU n.39 del 17-2-1992 - Suppl. Ordinario n. 31).

Decreto-Legge 25 settembre 2009, n. 135. Disposizioni urgenti per l'attuazione di obblighi comunitari e per l'esecuzione di sentenze della Corte di giustizia delle Comunità europee. (09G0145) (GU n.223 del 25-9-2009).

Decreto-Legge 22 giugno 2012, n. 83. Misure urgenti per la crescita del Paese. (12G0109) (GU n.147 del 26-6-2012 - Suppl. Ordinario n. 129).

Decreto del Presidente della Repubblica 26 febbraio 1968, n. 656. Norme per l'applicazione dell'Accordo di Madrid del 14 aprile 1891, sulla repressione delle false o fallaci indicazioni di provenienza delle merci, riveduto a Lisbona il 31 ottobre 1958. (GU n.133 del 27-5-1968).

Direttiva 79/112/CEE del Consiglio, del 18 dicembre 1978, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità. GU L 33 dell' 8.2.1979, pagg. 1–14.

Direttiva 87/250/CEE della Commissione del 15 aprile 1987 relativa all'indicazione del titolo alcolometrico volumico nell'etichettatura di bevande alcoliche destinate al consumatore finale. GU L 113 del 30.4.1987, pagg. 57–58

Direttiva 89/395/CEE del Consiglio del 14 giugno 1989 che modifica la direttiva 79/112/CEE relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità. GU L 186 del 30.6.1989, pagg. 17–20.

Direttiva 89/396/CEE del Consiglio, del 14 giugno 1989, relativa alle diciture o marche che consentono di identificare la partita alla quale appartiene una derrata alimentare. GU L 186 del 30.6.1989, pagg. 21–22.

Direttiva 90/496/CEE del Consiglio, del 24 settembre 1990, relativa all'etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari. GU L 276 del 6.10.1990, pagg. 40–44.

Direttiva 98/34/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 giugno 1998 che prevede una procedura d'informazione nel settore delle norme e delle regolamentazioni tecniche. GU L 204 del 21.7.1998, pagg. 37–48.

Direttiva 1999/10/CE della Commissione dell'8 marzo 1999 che introduce deroghe alle disposizioni di cui all'articolo 7 della direttiva 79/112/CEE del Consiglio per quanto riguarda l'etichettatura dei prodotti alimentari. GU L 69 del 16.3.1999, pagg. 22–23.

Direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 marzo 2000, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità. GU L 109 del 6.5.2000, pagg. 29–42.

Direttiva 2002/67/CE della Commissione, del 18 luglio 2002, relativa all'etichettatura dei generi alimentari contenenti chinino e dei prodotti alimentari contenenti caffeina. GU L 191 del 19.7.2002, pagg. 20–21.

Direttiva 2008/5/CE della Commissione, del 30 gennaio 2008, relativa alla specificazione sull'etichetta di alcuni prodotti alimentari di altre indicazioni obbligatorie oltre a quelle previste dalla direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio. GU L 27 del 31.1.2008, pagg. 12–16

Direttiva 2011/91/UE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 13 dicembre 2011, relativa alle diciture o marche che consentono di identificare la partita alla quale appartiene una derrata alimentare. GU L 334 del 16.12.2011, pagg. 1–5.

Direttiva 2005/29/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, dell'11 maggio 2005, relativa alle pratiche commerciali sleali tra imprese e consumatori nel mercato interno e che modifica la direttiva 84/450/CEE del Consiglio e le direttive 97/7/CE, 98/27/CE e 2002/65/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 2006/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio («direttiva sulle pratiche commerciali sleali»). GU L 149 dell' 11.6.2005, pagg. 22–39.

Legge n. 136 del 5 aprile 1908 sui provvedimenti per combattere le frodi nel commercio dell'olio di oliva. Gazzetta Ufficiale del Regno d'Italia n. 90 del 16 aprile 1908.

Legge 13 novembre 1960, n. 1407. Norme per la classificazione e la vendita degli olii di oliva. (GU n.295 del 2-12-1960).

Legge 4 luglio 1967, n. 676. Ratifica ed esecuzione dei seguenti atti Internazionali, firmati a Lisbona il 31 ottobre 1958: a) Convenzione di Parigi per la protezione della proprieta' industriale del 20 marzo 1883, riveduta successivamente a Bruxelles, a Washington, a L'Aja, a Londra e a Lisbona; b) Accordo di Madrid per la repressione delle indicazioni di provenienza false o fallaci del 14 aprile 1891, riveduto successivamente a Washington, a L'Aja, a Londra e a Lisbona; c) Accordo di Lisbona per la protezione e la registrazione internazionale delle denominazioni di origine. (GU n.202 del 12-8-1967).

Legge 27 gennaio 1968, n. 35. Norme per il controllo della pubblicita' e del commercio dell'olio di oliva e dell'olio di semi. (GU n.37 del 12-2-1968).

Legge 24 dicembre 2003, n. 350. Disposizioni per la formazione del bilancio annuale e pluriennale dello Stato (legge finanziaria 2004). (GU n.299 del 27-12-2003 - Suppl. Ordinario n. 196).

Legge 27 dicembre 2006, n. 296. Disposizioni per la formazione del bilancio annuale e pluriennale dello Stato (legge finanziaria 2007). (GU n.299 del 27-12-2006 - Suppl. Ordinario n. 244).

Legge 23 luglio 2009, n. 99. Disposizioni per lo sviluppo e l'internazionalizzazione delle imprese, nonché in materia di energia. (09G0111) (GU n.176 del 31-7-2009 - Suppl. Ordinario n. 136).

Legge 20 novembre 2009, n. 166. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 25 settembre 2009, n. 135, recante disposizioni urgenti per l'attuazione di obblighi comunitari e per l'esecuzione di sentenze della Corte di giustizia delle Comunita' europee. (09G0180) (GU n.274 del 24-11-2009 - Suppl. Ordinario n. 215).

Legge 7 agosto 2012, n. 134. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 22 giugno 2012, n. 83, recante misure urgenti per la crescita del Paese. (12G0152) (GU n.187 del 11-8-2012 - Suppl. Ordinario n. 171).

Legge 14 gennaio 2013, n. 9. Norme sulla qualità e la trasparenza della filiera degli oli di oliva vergini. (13G00030) (GU n.26 del 31-1-2013).

Ministero dello Sviluppo Economico. Dipartimento per l'impresa e l'internazionalizzazione. Circolare esplicativa (n. 124898 del 9 novembre 2009) sull'art. 4 comma 49-bis della legge 24 dicembre 2003 n. 350, come introdotto dall'art. 16 del decreto legge 25 settembre 2009, n. 135.

Regio Decreto n. 1398 del 19 ottobre 1930. Approvazione del testo definitivo del Codice penale. Suppl. alla Gazzetta Ufficiale n. 251 del 26 ottobre 1930.

Regio Decreto Legge n. 2033 del 15 ottobre 1925. Repressione delle frodi nella preparazione e nel commercio di sostanze di uso agrario e di prodotti agrari. Gazzetta Ufficiale del Regno d'Italia n. 281 del 3 dicembre 1925.

Regolamento CEE n. 136 del 22 settembre 1966 relativo all'attuazione di un'organizzazione comune dei mercati nel settore dei grassi. GU 172 del 30.9.1966, pagg. 3025–3035.

Regolamento CEE 950/1968 del Consiglio relativo alla tariffa doganale comune. GU L 172 del 22.7.1968, pagg. 1–402.

Regolamento (CEE) n. 2658/87 del Consiglio del 23 luglio 1987 relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune. GU L 256 del 7.9.1987, pagg. 1–675.

Regolamento (CEE) n. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. GU L 248 del 5.9.1991, pagg. 1–83.

Regolamento (CEE) n. 2913/92 del Consiglio, del 12 ottobre 1992, che istituisce un codice doganale comunitario. GU L 302 del 19.10.1992, pagg. 1–50

Regolamento (CE) n. 1019/2002 della Commissione, del 13 giugno 2002, relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva. GU L 155 del 14.6.2002, pagg. 27–31.

Regolamento (CE) n. 1989/2003 della Commissione, del 6 novembre 2003, che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti. GU L 295 del 13.11.2003, pagg. 57–77.

Regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione, del 31 marzo 2004, relativo all'etichettatura di prodotti e ingredienti alimentari addizionati di fitosteroli, esteri di fitosterolo, fitostanoli e/o esteri di fitostanolo. GU L 97 dell' 1.4.2004, pagg. 44–45.

Regolamento (CE) n. 1234/2007 del Consiglio, del 22 ottobre 2007, recante organizzazione comune dei mercati agricoli e disposizioni specifiche per taluni prodotti agricoli (regolamento unico OCM). GU L 299 del 16.11.2007, pagg. 1–149.

Regolamento (CE) n. 182/2009 della Commissione, del 6 marzo 2009, che modifica il regolamento (CE) n. 1019/2002 relativo alle norme di commercializzazione dell'olio di oliva. GU L 63 del 7.3.2009, pagg. 6–8

Regolamento (UE) n. 61/2011 della Commissione, del 24 gennaio 2011, che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli

d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti. GU L 23 del 27.1.2011, pagg. 1–14.

Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 ottobre 2011, relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione. GU L 304 del 22.11.2011, pagg. 18–63.

Regolamento di esecuzione (UE) n. 29/2012 della Commissione, del 13 gennaio 2012, relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva. GU L 12 del 14.1.2012, pagg. 14–21.

Regolamento (UE) n. 608/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 12 giugno 2013, relativo alla tutela dei diritti di proprietà intellettuale da parte delle autorità doganali e che abroga il regolamento (CE) n. 1383/2003 del Consiglio. GU L 181 del 29.6.2013, pagg. 15–34.

Regolamento (UE) n. 952/2013 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 ottobre 2013, che istituisce il codice doganale dell'Unione. GU L 269 del 10.10.2013 pagg. 1-101.

Regolamento di esecuzione (UE) n. 1001/2013 della Commissione, del 4 ottobre 2013, che modifica l'allegato I del regolamento (CEE) n. 2658/87 relativo alla nomenclatura tariffaria e statistica ed alla tariffa doganale comune. GU L 290 del 31.10.2013, pagg. 1–901.

Regolamento di esecuzione (UE) n. 1335/2013 della Commissione, del 13 dicembre 2013, che modifica il regolamento di esecuzione (UE) n. 29/2012 relativo alle norme di commercializzazione dell'olio d'oliva. GU L 335 del 14.12.2013, pagg. 14–16.

Regolamento di esecuzione (UE) N. 1348/2013 della Commissione del 16 dicembre 2013 che modifica il regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. GU L 338 del 17.12.2013, pagg. 31–67.

Sitografia

- [1] http://www.ddcustomslaw.com/pdf/Nomenclature_tariffe.pdf
- [2] <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/100-mission-statement>
- [3] <http://www.freeonline.org/articoli/art/panel-test-dell-olio-di-oliva-trent-anni-di-analisi-sensoriale.html>. Lauro Antonio G. Panel test dell'olio di oliva. Trent'anni di analisi sensoriale. 23.08.2011.
- [4] <http://www.teatronaturale.it/strettamente-tecnico/l-arca-olearia/13279-sofisticazioni-adulterazioni-and-co-come-giudicare-la-purezza-di-un-olio-d-oliva.htm>
- [5] <http://www.codexalimentarius.org/>
- [6] <http://pieronuciari.it/2013/03/16/legge-salva-olio-italiano-gli-sviluppi-e-la-conclusione-della-vicenda/>
- [7] <http://www.rivistaeuropae.eu/diritto/nuova-puntata-nellaffaire-olio-doliva-la-commissione-fa-marcia-indietro-ora-litalia-piange/>
- [8] <http://www.teatronaturale.it/strettamente-tecnico/l-arca-olearia/18217-etichettatura-dell-extra-vergine-la-legge-mongiello-e-cogente-dal-22-novembre-2013.htm>
- [9] <http://www.agenziadogane.gov.it/wps/wcm/connect/Internet/ed/Operatore/Are+tematiche/Lotta+alla+contraffazione/>