



STUDIO DI FATTIBILITÀ DI UN SISTEMA OTTICO PORTATILE SEMPLIFICATO PER LA VALUTAZIONE DEL GRADO DI MATURAZIONE DI MIRTILLI

R. Beghi, R. Guidetti, R. Oberti, L. Bodria

Dipartimento di Ingegneria Agraria, Università degli Studi di Milano

SOMMARIO

Le fasi di maturazione dei mirtilli fino alla raccolta vengono oggi seguite senza l'aiuto di strumenti in grado di fornire dati oggettivi e anche il momento della raccolta viene deciso solamente sulla base dell'analisi visiva dei frutti e dell'esperienza del produttore. I produttori potrebbero quindi essere supportati nelle loro decisioni da strumenti semplici e portatili, utilizzabili direttamente in campo per la valutazione del grado di maturazione dei frutti.

Pertanto è stata studiata la possibilità di realizzare uno strumento ottico portatile ed economico, basato su tecnologia a LED e sulla misura e l'elaborazione del valore di riflettanza diffusa in corrispondenza di un numero limitato di lunghezze d'onda opportunamente selezionate.

*La selezione delle lunghezze d'onda più significative per l'individuazione dei frutti a maturazione commerciale adatti alla raccolta, è stata effettuata partendo da spettri Vis/NIR raccolti nell'intervallo 445-970 nm di campioni della varietà Brigitta (*Vaccinium corymbosum*). Le bacche raccolte sono state suddivise in quattro classi di maturazione in funzione del colore.*

Gli spettri acquisiti sono stati sottoposti a un'Analisi delle Componenti Principali (PCA, The Unscrambler® 9.6) che ha permesso di evidenziare in particolare due bande (attorno a 680 nm e a 740 nm) in corrispondenza delle quali risultano massimizzate le differenze tra gli spettri dei campioni completamente maturi e quelli delle altre classi. I valori di riflettanza registrati a queste lunghezze d'onda sono stati utilizzati per creare dei rapporti normalizzati rispetto alla lunghezza d'onda di 850 nm e sulla base di tali rapporti è stato elaborato un algoritmo semplificato per la classificazione dei frutti.

La classificazione dei campioni in base all'indice di maturazione elaborato ha mostrato un'elevata capacità di discriminare i frutti completamente maturi da quelli parzialmente o non maturi (93% di campioni correttamente classificati).

I risultati di questo studio indicano pertanto la fattibilità di uno strumento semplificato ed economico, basato sull'impiego di sole tre lunghezze d'onda, capace di valutare rapidamente e in condizioni di campo il grado di maturazione dei mirtilli.

Parole chiave: mirtilli, Vis-NIR, maturazione, classificazione, analisi non distruttiva.

1 INTRODUZIONE

I piccoli frutti costituiscono un prodotto agricolo che in questi ultimi anni, grazie alla sua gradevolezza e alle ormai riconosciute proprietà nutrizionali ed ai diversi impieghi nell'industria dolciaria, interessa sempre più il mercato costituendo, indubbiamente, una delle coltivazioni frutticole a maggior valore aggiunto. I piccoli frutti rossi, quali mirtillo, mora, lampone e ribes, sono una ricca fonte di sostanze antiossidanti, in particolare di flavonoidi e antociani. Questi ultimi costituiscono i pigmenti rosso-viola che impartiscono il caratteristico colore ai frutti. E' noto che i componenti polifenolici contribuiscono in larga misura al potere antiossidante dei frutti (Rice-Evans *et al.*, 1996; Cao *et al.*, 1997), soprattutto nelle specie non particolarmente ricche in acido ascorbico (Wang *et al.*, 1996; Moyer *et al.*, 2002).

Le fasi di maturazione dei mirtilli fino alla raccolta vengono oggi seguite senza l'aiuto di strumenti in grado di fornire dati oggettivi e anche il momento della raccolta viene deciso solamente sulla base dell'analisi visiva dei frutti e dell'esperienza del produttore. I produttori potrebbero quindi essere supportati nelle loro decisioni da strumenti semplici e portatili, utilizzabili direttamente in campo per la valutazione del grado di maturazione dei frutti (Beghi, 2008, Bodria & Beghi, 2007, Casiraghi *et al.* 2007, Williams & Norris, 2001, Bodria *et al.*, 2004, Ozaki *et al.*, 2007, Lu, 2001).

Il seguente lavoro ha avuto lo scopo di esplorare la possibilità di realizzare un sistema ottico semplificato per la valutazione in pianta del grado di maturazione di mirtilli. Tale strumento viene definito semplificato in quanto è basato sulla misura e l'elaborazione del valore di riflettanza diffusa in corrispondenza di un numero limitato di singole lunghezze d'onda (da 2 a 4), opportunamente selezionate. Col termine riflettanza diffusa si intende la misura della radiazione luminosa che riemerge dopo aver interagito con i primi strati del campione in una zona limitrofa a quella di illuminazione.

In queste condizioni è pertanto possibile illuminare i campioni mediante dei LED in grado di emettere luce alle lunghezze d'onda prescelte, e di misurare la luce riemessa dal frutto attraverso un singolo fotodiodo. La realizzazione di un dispositivo di questo tipo fornirebbe l'agricoltore di uno strumento compatto di formato tascabile, economico e di semplice utilizzo, che gli permetterebbe di effettuare direttamente in campo un'analisi rapida del grado di maturazione dei frutti in pianta.

2 MATERIALI E METODI

Per l'analisi nella regione Vis/NIR (445–970 nm) è stato utilizzato uno spettrometro portatile composto da uno spettroscopio AvaSpec 2048 di Avantes a monocromatore reticolare fisso e a rivelatore di tipo CCD (2048 pixel, risoluzione spettrale 0.3 nm), equipaggiato con un sistema di campionamento a fibra ottica (FCR-191R200-2-ME-S1 prodotta da Avantes) e di una sorgente di radiazione costituita da un faretto alogeno OSRAM della potenza di 50 Watt con temperatura di colore di 4500 °K con massima emissione a 500 nm. La metodologia qui presentata si basa sull'analisi degli spettri dei mirtilli (*Vaccinium corymbosum*) di varietà *Brigitta* (634 frutti in totale) acquisiti con cadenza settimanale nell'anno 2006. Le bacche raccolte sono state suddivise in classi di maturazione sulla base del colore e della pezzatura. La suddivisione in classi è stata fatta sulla base di un semplice criterio visivo, non potendo disporre di dati analitici di laboratorio sulle singole bacche. Questo tipo di classificazione segue i criteri visivi

utilizzati dagli agricoltori per decidere il momento ottimale della raccolta.

Le bacche sono state divise in quattro classi di maturazione (Tab. 1):

classe I: campioni ancora verdi, piccole dimensioni

classe II: campioni parzialmente invaiati, dimensioni maggiori

classe III: campioni quasi completamente invaiati o del tutto invaiati, zona della cicatrice peduncolare ancora chiara o rosata.

classe IV: campioni maturi, invaiati e con zona del cicatrice peduncolare blu-viola.

Classi	Peso medio di 5 frutti (g)	Dev. Std. (g)
I	5.0	0.7
II	5.7	0.6
III	9.4	1.0
IV	13.1	1.6

Tabella 1. Pesì medi dei frutti delle quattro classi e relative deviazioni standard.

Pertanto le classi I e II comprendono i frutti non ancora completamente invaiati e palesemente immaturi. La classe III invece comprende campioni invaiati ma che non hanno ancora raggiunto un grado di maturazione sufficiente per la raccolta. La classe IV invece comprende campioni maturi, con zona della cicatrice peduncolare blu-viola e pronti quindi per essere raccolti.

In pianta risulta difficile distinguere frutti di III e IV classe in quanto la zona visibile della bacca è quella del calice, mentre le due classi si differenziano soprattutto per la colorazione della zona della cicatrice peduncolare (Fig. 1).

Gli spettri grezzi sono stati elaborati mediante il software The Unscrambler® 9.6, effettuando i pretrattamenti di riduzione e smoothing. In figura 2 sono riportati i grafici degli spettri medi delle quattro classi nell'intervallo Vis/NIR considerato.

Nonostante la significativa variabilità degli spettri dei frutti all'interno delle singole classi, l'andamento degli spettri medi evidenzia una notevole differenza tra le prime due classi e le ultime due.



Figura 1. Confronto tra mirtilli di classe 3 e classe 4 (lato calice e peduncolo).

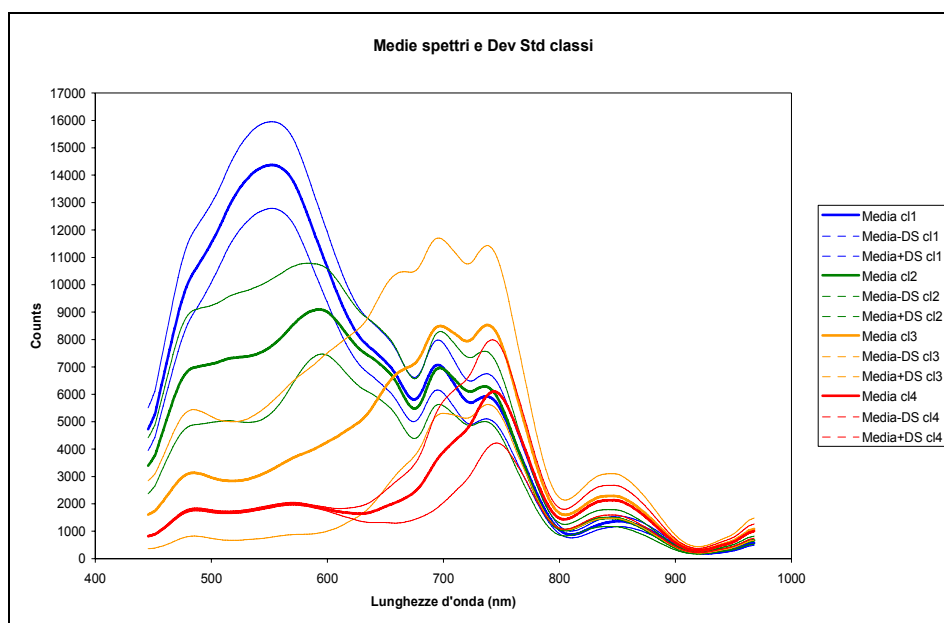


Figura 2. Andamento degli spettri delle quattro classi (medie e deviazioni standard) nell'intervallo 445 – 970 nm.

Questa differenza è dovuta soprattutto allo sviluppo degli antociani durante il progredire della maturazione (assenza di antociani in classe I, massima concentrazione in classe IV) che incide pesantemente sull'assorbimento intorno a 540 nm. Alla conclusione del processo di maturazione, la quantità di antociani è tale che ne risulta influenzato lo spettro anche in regioni adiacenti alla loro banda di assorbimento, con una riflettanza ridotta fino verso i 750 nm (Fig. 2).

3 RISULTATI

3.1 Analisi preliminare dei dati mediante PCA

L'attenzione si è concentrata sugli spettri delle classi III e IV, in quanto la possibile ricaduta applicativa più interessante è evidentemente quella di riuscire a discriminare i campioni appartenenti a queste due classi. Questo infatti permetterebbe di sviluppare un sistema in grado di determinare il momento in cui i frutti superano una determinata soglia nel loro grado di maturazione risultando pronti per la raccolta.

Analizzando quindi gli spettri di queste due classi, si è cercato di determinare alcune lunghezze d'onda, in corrispondenza delle quali le differenze fra gli spettri dei frutti di classe III e IV fossero le più pronunciate possibile. Sulla base delle intensità a queste lunghezze d'onda, infine, si baserà un algoritmo semplificato per la classificazione dei frutti.

Inizialmente è stata effettuata un'Analisi delle Componenti Principali (PCA) per evidenziare l'effettiva presenza di raggruppamenti omogenei negli spettri dei frutti appartenenti alle quattro diverse classi.

In Fig. 3 sono riportate le distribuzioni dei campioni nello spazio delle componenti principali (*Scores Plot*), in particolare è mostrata la distribuzione dei campioni lungo la prima e la seconda componente principale. Il grafico mostra come lungo la PC-1 (l'asse orizzontale) si differenzino soprattutto le prime due classi, mentre la terza e la quarta risultano sostanzialmente sovrapposte. I frutti di classe III e IV si differenziano maggiormente lungo la PC-2.

In Fig. 4 è riportata invece la distribuzione dei campioni lungo la seconda e la terza componente principale. In questo caso, mentre le classi I e II si sovrappongono notevolmente, la III e la IV classe risultano piuttosto separate in due gruppi, con una linea di separazione che corre lungo la bisettrice del 2° e 4° quadrante del piano PC-2 - PC-3. Da quest'analisi si può dedurre come la seconda e la terza componente principale siano in grado di spiegare meglio la variabilità presente tra la III e la IV classe.

Pertanto le lunghezze d'onda da selezionare andranno scelte in quelle zone dello spettro che contribuiscono maggiormente alla PC-2 e alla PC-3. Per la loro identificazione è stato analizzato il Loadings Plot sempre dell'analisi PCA (Fig. 5), dove appunto sono mostrati i contributi delle diverse regioni spettrali alla definizione delle diverse componenti principali.

Come si può vedere PC-2 e PC-3 evidenziano valori elevati di Loadings alle lunghezze d'onda intorno a 635 nm, 680 nm e 740 nm. La PC-1, che spiega bene la variabilità tra le prime due classi, ha invece valori di Loadings elevati intorno ai 550 nm.

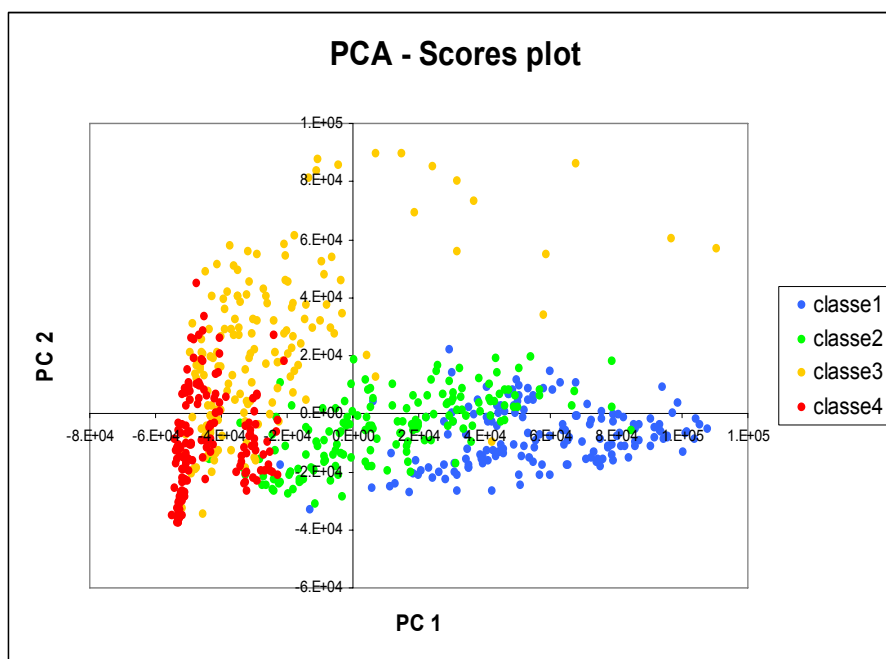


Figura 3. Scores plot dell'analisi PCA rappresentante la distribuzione dei campioni lungo la 1° e la 2° PC.

Sulla base di queste valutazioni sono state scelte inizialmente queste tre lunghezze

d'onda (635, 680 e 740 nm). I valori d'intensità della radiazione riemessa dai campioni a queste lunghezze d'onda sono stati utilizzati per calcolare dei rapporti normalizzati. Per la normalizzazione è stata scelta una lunghezza d'onda alla quale l'assorbimento delle due classi di maturazione (III e IV) fosse simile, e precisamente 850 nm (Fig. 2).

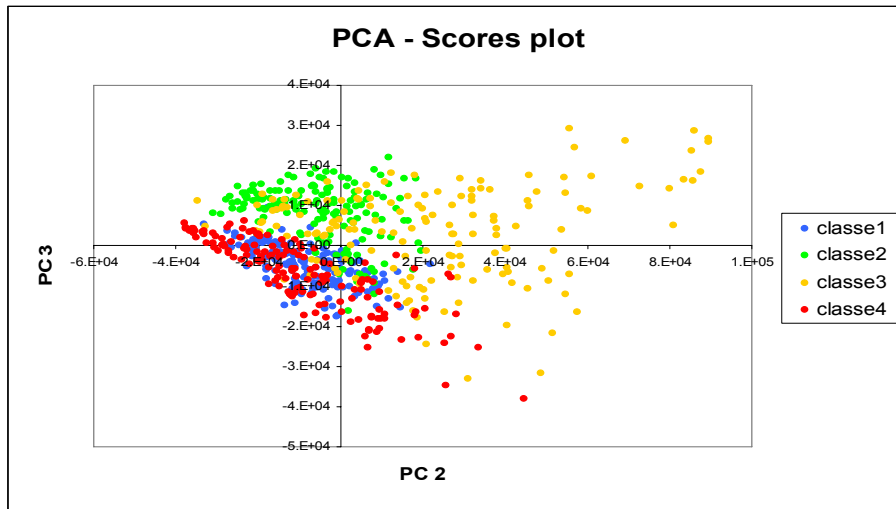


Figura 4. Scores plot dell'analisi PCA rappresentante la distribuzione dei campioni lungo la 2° e la 3° PC.

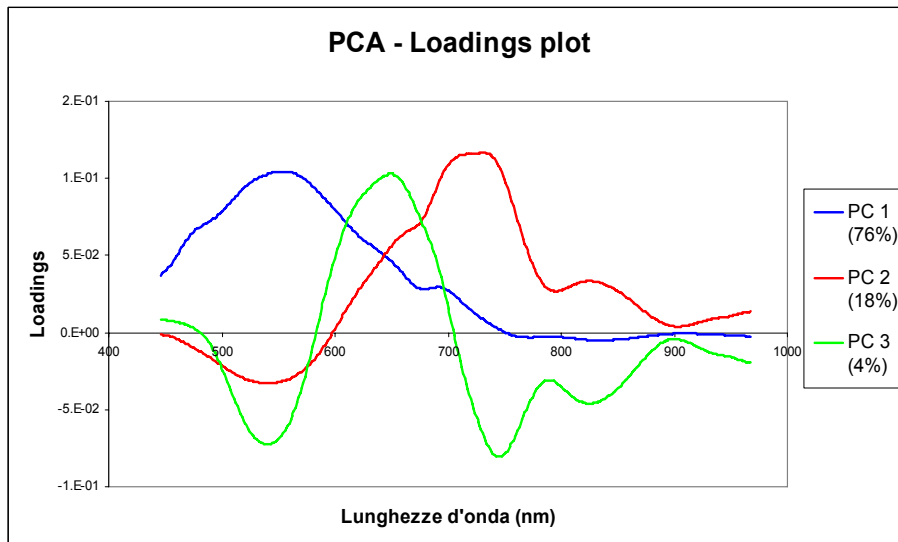


Figura 5. Loadings Plot delle prime tre componenti principali identificate nella PCA dei 634 frutti misurati.

Tuttavia, nell'ottica di realizzare uno strumento più semplice possibile, è stato

deciso di limitarsi all'utilizzo di solo due dei tre rapporti normalizzati a disposizione, scegliendo quelli che fornivano i risultati migliori. In questo modo quindi lo strumento potrà essere sviluppato sulla base della misura della riflettanza di sole tre lunghezze d'onda.

A seguito di prove i risultati migliori sono stati ottenuti con l'utilizzo dei rapporti 680/850 e 740/850. Il rapporto 635/850 è stato invece scartato fornendo una minore capacità di discriminare tra le classi. In corrispondenza di questa lunghezza d'onda infatti i valori di *Loadings* per la PC-3 erano sì elevati, ma la variabilità spiegata da questa componente è risultata ridotta (4%, Fig. 5) e meno significativa di quella ottenuta considerando la riflettanza a 680 nm.

3.2 Classificazione

I 634 campioni sono stati suddivisi in due gruppi, contenenti ciascuno circa il 50% dei campioni: un set di calibrazione di 318 dati e un set di validazione di 316 dati. Il set di calibrazione verrà utilizzato per ricavare un indice in grado di discriminare le classi di maturazione III e IV. In un secondo momento è stato utilizzato il secondo set a disposizione per la validazione dell'algoritmo trovato su campioni fino a quel momento incogniti.

Pertanto sono stati calcolati per tutti i campioni a disposizione i rapporti normalizzati tra i valori d'intensità della radiazione elettromagnetica a 680 e 740 nm e quelli a 850 nm. I valori dei rapporti normalizzati di tutti i campioni del set di calibrazione sono stati visualizzati in un grafico di dispersione bidimensionale (Fig. 6). Il grafico mostra come sia possibile suddividere bene il piano in due aree corrispondenti alla zona dei frutti maturi (classe IV) e alla zona di quelli non maturi (classi I, II e III). Alcuni campioni delle classi III e IV cadono al limite o nella zona errata a causa probabilmente dell'arbitrarietà della classificazione manuale. Si vede bene invece l'incapacità di discriminare i campioni delle prime due classi attraverso l'utilizzo di questi rapporti. In ogni caso i campioni della I e II classe risultano nettamente separati da quelli della IV.

Inoltre si può notare la presenza di una discreta correlazione tra i dati ($R^2 = 0.79$), indice del fatto che i due rapporti utilizzati sono intercorrelati tra loro e apportano informazione almeno in parte ridondante.

Tramite l'equazione della retta di demarcazione tra le due zone è stato possibile calcolare un Indice di Maturazione per ogni campione del set di calibrazione:

$$IM = \frac{I740}{I850} + 1,5 \times \frac{I680}{I850} \quad (1)$$

Sempre sulla base dell'equazione della retta che separa le due zone del piano, è stato fissato un valore soglia di $IM = 5,8$. In questo modo è stato possibile classificare tutti i campioni con $IM < 5,8$ come maturi e quelli con $IM > 5,8$ come non ancora maturi, sulla base di un indice semplificato per la valutazione del grado di maturazione.

Come si può vedere dal grafico della distribuzione di frequenza dei campioni (Fig. 7) le curve delle classi III e IV risultano ben distinte, permettendo quindi elevate percentuali di classificazioni corrette all'interno di queste classi.

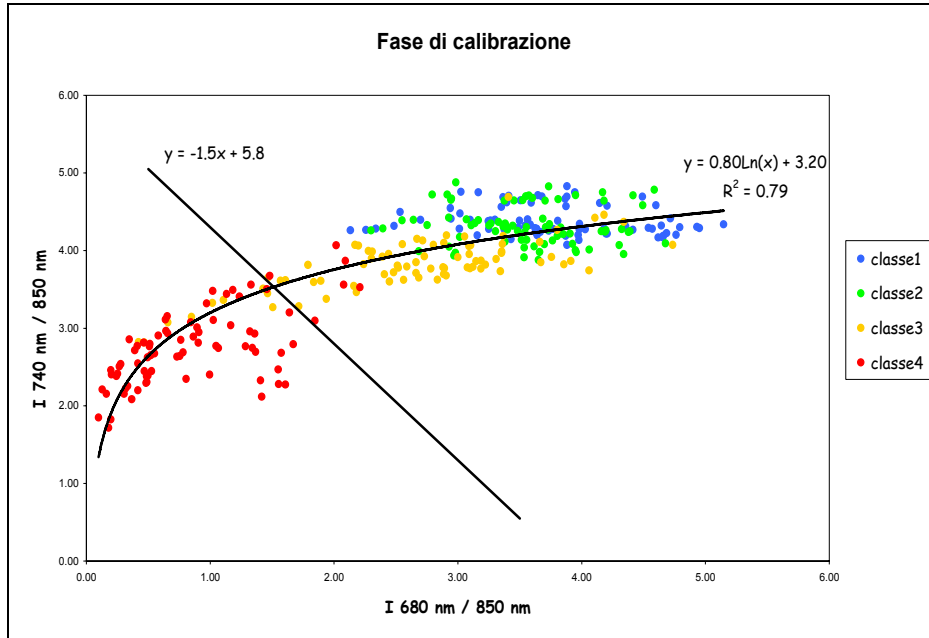


Figura 6. Grafico di dispersione dei campioni del set di calibrazione (318 campioni).

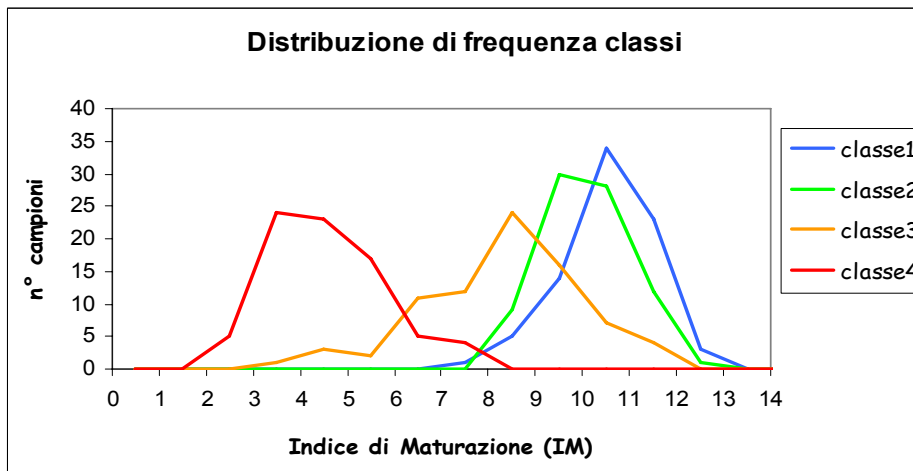


Figura 7. Distribuzione di frequenza classi sulla base dei Coefficienti di Maturazione (CM), fase di calibrazione.

Sono state ottenute sul set di calibrazione percentuali di corrette classificazioni all'interno della III e IV classe intorno al 90%. Inoltre, anche se di minor importanza, il 100% dei campioni del set di calibrazione della I e II classe sono stati correttamente classificati come non maturi, con valori di IM molto distanti dalla soglia pari a 5,8.

Successivamente si è calcolato l'indice IM definito dalla (1) per i 316 frutti del gruppo di validazione, con lo scopo di valutare la capacità di classificare anche campioni esterni al processo di determinazione dell'indice IM. Analogamente a quanto fatto per la fase di calibrazione, i valori dei rapporti normalizzati di tutti i campioni del set di validazione sono stati visualizzati in un grafico di dispersione bidimensionale (Fig. 8). La distribuzione sul piano dei due rapporti normalizzati risulta simile a quella ottenuta con il set di calibrazione, evidenziando una buona capacità di separare campioni della III e IV classe. Anche in questo caso per tutti i campioni è stato calcolato il valore di IM.

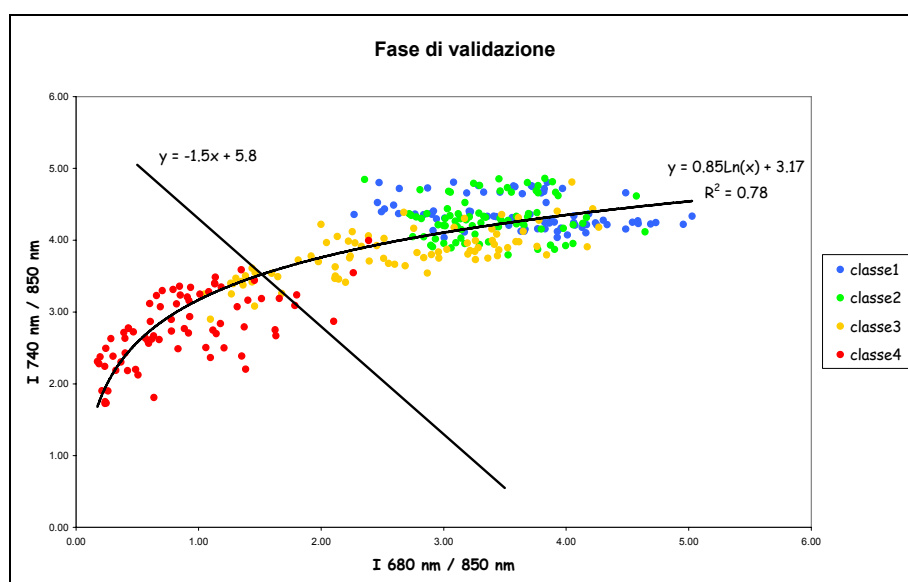


Figura 8. Grafico di dispersione dei campioni del set di validazione (316 campioni).

Anche in questo caso le curve delle classi III e IV risultano ben distinte. Ciò ha infatti permesso di confermare sul set di validazione le ottime percentuali di corrette classificazioni ottenute durante la fase di calibrazione (Tab. 2).

Più dell'82% dei campioni della III classe è stato correttamente classificato come non maturo, mentre quasi il 95% dei campioni della IV classe è stato classificato in modo corretto come maturo. Anche in questo caso il 100% dei campioni della I e II classe sono stati correttamente classificati come non maturi.

Classificazione di riferimento	Classificati in base a IM		
	Classi	Non Maturi	Maturi
	III	82.5%	17.5%
IV	5.3%	94.7%	

Tabella 2. Classificazione con IM sui campioni del set di validazione (classi III e IV).

4 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stato sperimentato un approccio metodologico basato sulle misure di riflettanza a un numero limitato di lunghezze d'onda (tre in totale) nella regione Vis/NIR, con lo scopo di realizzare uno strumento semplificato utilizzabile direttamente in pianta per un'analisi veloce del grado di maturazione dei frutti.

L'analisi esplorativa dei dati tramite PCA ha permesso di individuare le lunghezze d'onda più adatte (tre in totale), cioè quelle che permettono di discriminare meglio i campioni maturi da quelli che non lo sono ancora.

La fase di calibrazione ha permesso di individuare un algoritmo di calcolo tramite il quale calcolare un Indice di Maturazione (IM).

La classificazione dei campioni ha evidenziato infine un'elevata capacità da parte del sistema di discriminare tra i campioni maturi e quelli non maturi, con una percentuale di campioni delle classi III e IV correttamente classificati di circa il 90% durante la fase di calibrazione. La successiva classificazione sui campioni del set di validazione ha confermato i buoni risultati ottenuti, con una punta del 95% di campioni correttamente classificati per la classe IV.

I risultati di questo studio indicano pertanto la fattibilità di uno strumento semplificato ed economico, basato sull'impiego di sole tre lunghezze d'onda, capace di valutare rapidamente e in condizioni di campo il grado di maturazione dei mirtilli.

BIBLIOGRAFIA

- Beghi R., 2008. Tecniche innovative per la valorizzazione della qualità dei prodotti ortofrutticoli freschi. *Tesi di dottorato*. Scuola di dottorato "Innovazione tecnologica per le Scienze Agro-alimentari e Ambientali", Università degli Studi di Milano.
- Bodria L., Beghi R., 2007. La qualità si stima in campo grazie al progetto Innovì. *L'Informatore Agrario* n°16, 20-26.
- Bodria L., Fiala M., Guidetti R., Oberti R. 2004. Optical techniques to estimate the ripeness of red pigmented fruits, *Transactions of the ASAE*, Vol. 47(3):815-820.
- Casiraghi E., Bodria L., Guidetti R., Sinelli N., Beghi R., Cabassi G., 2007. Evaluation of Grape quality parameters by VIS/NIR and FT-NIR spectroscopy, *Italian Beverage Technology*, n°50, pp. 5-10.
- Cao G., Sofic E., Prior R.L. 1999. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* 22:749-760.
- Lu R., 2001. Predicting firmness and sugar content of sweet cherries using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Transactions of the ASAE*. 44(5): p. 1265-1271.
- Moyer R.A., Hummer K.E., Chad E.F., Frei B., Wrolstad R.E. 2002. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J. Agric. Food. Chem.* 50:519-525.
- Ozaki, Y., McClure, W.F., Christy, A. A. 2007. Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology, *Wiley Interscience*, Hoboken, New Jersey, USA.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.* 20:933-956.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44:701-705.
- Williams P. and Norris K., 2001. Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2nd edition, *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, Minnesota, USA.