

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



FACOLTÀ DI AGRARIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZA DEGLI ALIMENTI

Tesi di Dottorato di Ricerca

SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI
AGRO-ALIMENTARI

XXIV ciclo

I COMPONENTI DELL'AROMA COME INDICATORI
DELLA QUALITÀ E TIPICITÀ DEGLI OLI
EXTRA VERGINI DI OLIVA

Tutor
Ch.mo Prof.
RAFFAELE SACCHI

Dottoranda
Dott.ssa DOROTEA ANNA DELLA MEDAGLIA

Coordinatore
Ch.mo Prof. GIANCARLO BARBIERI

INDICE

I. INTRODUZIONE	2
1.1 L'ULIVO, L'OLIVA E L'OLIO	2
1.2 L'AROMA DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA	6
1.2.1 <i>La biogenesi degli aromi</i>	7
1.2.2 <i>Fattori che influenzano la formazione dell'aroma</i>	11
1.3 QUALITÀ E TIPICITÀ DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA	21
1.3.1 <i>Composti volatili e qualità sensoriale</i>	22
1.3.2 <i>Marcatori di tipicità</i>	27
1.4 L'OLIO NELLE PREPARAZIONI ALIMENTARI	32
1.4.1 <i>Le conserve vegetali sott'olio</i>	36
1.4.2 <i>Gli oli aromatizzati</i>	40
II. OBIETTIVI DELLO STUDIO	48
III. RISULTATI E DISCUSSIONE	49
3.1 LE MOLECOLE VOLATILI: POTENZIALI MARCATORI DELLA TIPICITÀ SENSORIALE E DELL'OLIO	49
3.1.1 <i>Materiali e metodi</i>	49
3.1.2 <i>Risultati e Discussione</i>	55
3.1.3 <i>Conclusioni</i>	58
3.2 CARATTERIZZAZIONE DI CONSERVE SOTT'OLIO	59
3.2.1 <i>Materiali e metodi</i>	59
3.2.2 <i>Risultati e Discussione</i>	63
3.2.3 <i>Conclusioni</i>	74
3.3 CARATTERIZZAZIONE DI OLIO AROMATIZZATO AL PEPERONCINO	75
3.3.1 <i>Materiali e metodi</i>	75
3.3.2 <i>Risultati e Discussione</i>	77
3.3.3 <i>Conclusioni</i>	82
3.4 CARATTERIZZAZIONE DI OLIO AROMATIZZATO ALLA LIQUIRIZIA	84
3.4.1 <i>Materiali e metodi</i>	84
3.4.2 <i>Risultati e Discussione</i>	85
3.4.3 <i>Conclusioni</i>	93
BIBLIOGRAFIA	94
APPENDICE	101
PUBBLICAZIONI	101

I. INTRODUZIONE

1.1 L'ULIVO, L'OLIVA E L'OLIO

L'olio, termine che deriva dal Sumero *ulu*, diventato *èlaion* in greco e *oleum* in latino (Antolini, 1997), è il prodotto ottenuto dalla molitura delle drupe dell'olivo (*Olea europea*), una pianta arborea da frutto appartenente alla famiglia delle *Oleaceae* (Dicotiledoni). L'ulivo è una delle piante coltivate più antiche al mondo. È originaria di una zona del Medio Oriente compresa tra l'Armenia, il Turkestan e il Pamir (Asia centrale) (Antolini, 1997). La sua diffusione su tutta la costa del mediterraneo è da attribuire ai Fenici, popolo dedito ai traffici mercantili e marittimi. La coltivazione dell'ulivo si sviluppò notevolmente dapprima con i Greci, poi con i Romani, che iniziarono a coltivarlo in tutti i territori conquistati. Sotto la spinta di popolazioni camito-semite prima, e successivamente per opera dei fenici, dei greci, dei romani e per ultimi degli arabi, la storia dell'olivo s'intreccia, quindi, sempre più con quella dei popoli che imparano ad estrarre e utilizzare l'olio dapprima solo per l'illuminazione e come unguento, e poi, più tardi, anche come prodotto alimentare (Barone & Di Marco, 2003). Dal 6° secolo a.C., gli olivi coltivati si diffondono in tutto il Mediterraneo, raggiungendo la Tunisia, la Sicilia, la Magna Grecia e più tardi il Centro ed il Nord Italia (Doveri & Baldoni, 2007).

L'olivo (*Olea europaea* L.) è pianta tipicamente mediterranea, particolarmente adattata, dunque, a regioni di tipo temperato caldo caratterizzate da stagioni estive lunghe ed asciutte. È pianta arborea sempreverde di medio sviluppo (4-8 metri di altezza). Le variabili ambientali (suolo e clima), la cultivar e le condizioni imposte dalle tecniche colturali possono far variare di molto le caratteristiche di portamento dell'albero, la forma e la densità della chioma, nonché lo sviluppo complessivo della pianta, le cui dimensioni possono essere anche notevoli (15 metri di altezza e 1,5-2 di diametro del tronco) oppure si riducono in presenza di condizioni limitanti (basse temperature al nord, aridità al sud). Caratteristiche di questa specie sono l'adattamento a condizioni ambientali e colturali estreme e la longevità. Esemplari monumentali, vecchi di diverse centinaia di anni, si riscontrano sparsi in tutte le aree tradizionali di coltura caratterizzandone il paesaggio (Barone & Di Marco, 2003). Dopo il XV secolo, con l'insediamento europeo nelle Americhe l'olivo arrivò nel Nuovo Mondo, ma solo negli ultimi tempi ha ampliato in modo significativo la sua coltivazione oltre l'area del Mediterraneo. Oggi, è coltivato commercialmente in Australia, Nuova Zelanda, Sud America (Argentina e Cile), Sud Africa e Nord America (California, Canada); dalla fine degli anni '90 si registra un forte aumento del trend produttivo in questi paesi, benché il principale produttore resta l'Europa (Spagna, Italia, Grecia, Portogallo e Francia). Importanti produttori sono anche altri paesi della fascia mediterranea (Turchia, Algeria, Marocco, Tunisia, Siria e Libia) (Doveri & Baldoni, 2007).

Dal punto di vista botanico l'olivo è praticamente l'unica specie, tra le 600 circa che compongono la famiglia cui appartiene, le *Oleaceae*, a frutto commestibile. Dei circa trenta generi della famiglia alcuni sono d'interesse agricolo od ornamentale quali: *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Syringa* e *Phillyrea*. Il genere *Olea*, sottofamiglia *Oleideae*, comprende due sotto-generi: *Olea* e *Paniculatae*. Il primo è diviso in due sezioni: *Olea*, che contiene solo *O. europaea* (includendo sia la forma coltivata che selvatica), e *Ligustroides*. In accordo con la recente revisione della tassonomia di *O. europaea*, questa specie è divisa in sei sotto-specie, sulla base della morfologia e della distribuzione geografica: la sub specie presente in Italia è la *subsp. europaea*, con le due varietà botaniche *europaea* (olivo coltivato) e *sylvestris* (olivo selvatico), ampiamente distribuita in tutto il bacino del Mediterraneo (Barone & Di Marco, 2003; Doveri & Baldoni, 2007). All'olivo selvatico appartengono arbusti o alberi spinescenti nella fase giovanile, a foglie piccole, arrotondate, con frutto piccolo, nocciolo piuttosto grande e basso contenuto in olio. Le popolazioni di olivo selvatico (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) sono limitate a poche aree isolate delle foreste native del Mediterraneo,

dove polline e noccioli possono essere distribuiti dal vento e dagli uccelli. L'analisi molecolare, utilizzando sia i marcatori nucleari che citoplasmatici, ha dimostrato che le popolazioni del Mediterraneo orientale e occidentale sono fortemente differenziate le une dalle altre. Al contrario, le olive coltivate (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) non mostrano tale differenziazione in relazione alla localizzazione geografica, anche se la loro variabilità è molto elevata. Solo poche cultivar presentano una diffusione su vasta area, la maggioranza è fortemente localizzata (Doveri & Baldoni, 2007). Il numero effettivo di cultivar nel mondo è stimato in circa 1500, oltre a 3000 sinonimi di cultivar registrati, ecotipi e varietà locali che contribuiscono alla enorme ricchezza del germoplasma dell'olivo. Italia, Spagna, Francia, Tunisia e Grecia hanno il maggior numero di cultivar con valori stimati di 610, 280, 100, 70 e 40, rispettivamente. Gli alti livelli di diversità genetica e morfologica presenti oggi possono essere dovuti al continuo processo di addomesticamento dell'olivo attraverso eventi di ibridazione locale di alberi coltivati con i molteplici germoplasma selvatici del Mediterraneo (Fogher *et al.*, 2010).

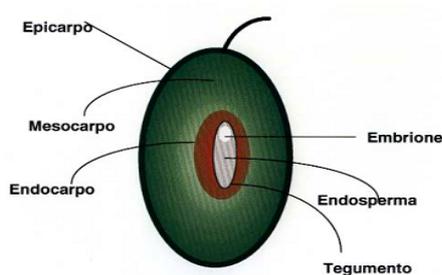


Figura 1.1 Struttura della drupa

Il frutto dell'oliva è una drupa di peso variabile tra 0,5 e 20 g, formata dall'epicarpo, mesocarpo, endocarpo e più internamente dal seme (Fig. 1.1). Nei riguardi dell'oliva risulta difficile parlare di composizione media data la sua notevolissima differenziazione varietale che si traduce in un'elevata variabilità compositiva. I componenti quantitativamente più importanti del frutto fresco sono l'acqua (40-70 %) e le sostanze grasse (6-25%), contenute principalmente nel mesocarpo. Il frutto poi contiene composti idrosolubili quali zuccheri semplici, acidi organici, sostanze azotate e sostanze fenoliche ed una frazione insolubile di natura colloidale. I colloidali della drupa comprendono i componenti la parete cellulare o la lamella mediana (cellulose, emicellulose e pectine), proteine strutturali ed enzimatiche e fosfolipidi di membrana. I più importanti zuccheri riducenti ritrovati nelle olive comprendono il glucosio, fruttosio e saccarosio mentre tra gli acidi organici i più rappresentati sono l'acido citrico, l'acido malico e l'acido ossalico. Nella composizione delle olive riveste poi una notevole importanza la frazione fenolica, che include i precursori degli antiossidanti naturali presenti negli oli vergini di oliva. I composti fenolici che sono presenti nella drupa in quantità molto elevate (dal 0,5 al 2,5% del peso fresco) e includono tra i componenti più rilevanti l'oleuropeina, la demetiloleuropeina e ligstroside ed il verbascoside. Questi composti sono presenti in modo più consistente nella buccia e nella polpa mentre la mandorla li contiene in concentrazioni molto ridotte.

L'olio risulta presente principalmente nella polpa (16-25% del peso fresco) e limitatamente nella mandorla della drupa dell'oliva (1-1,5% del peso fresco) (Cimato *et al.*, 2001; Di Vaio, 2008; Gucci *et al.*, 2003). Il seme ha il compito di propagare la specie vegetale, pertanto accumula sostanze (lipidi, carboidrati, proteine) che possono essere utilizzate dall'embrione durante le prime fasi di germinazione. Il frutto, invece, ha il ruolo di disseminare il seme e pertanto l'accumulo di sostanze di riserva (lipidi) può essere legato alla funzione di attrarre animali e rendersi appetibile ad essi per poter essere disseminato altrove (Sanchez & Harwood, 2002).

Nella prima fase di maturazione del frutto l'olio è presente sotto forma di minuscole gocce nelle cellule del mesocarpo che aumentano il loro volume fino ad occupare gran parte della stessa cellula. Il grasso è racchiuso in piccolissime sacche membranose che ne impediscono il contatto con il protoplasma (dove sono presenti anche gli enzimi responsabili delle alterazioni lipolitiche ed ossidative). Successivamente l'olio occuperà circa l'80% dello spazio intracellulare e di questo, il 70-85% sarà racchiuso da una struttura membranosa vacuolare (olio disponibile o libero), mentre il rimanente risulterà disperso, sotto forma di minute goccioline, nel citoplasma. Il contenuto in olio della drupa dell'olivo aumenta con la maturazione fino ad un valore massimo, oltre il quale tende a decrescere leggermente durante la sovra maturazione. La maturazione ideale, dal punto di vista sia tecnologico che qualitativo, corrisponde alla fase di invaiatura (cambiamento del colore) quando la drupa mostra la superficie parzialmente o completamente colorata e la polpa ancora chiara; ciò avviene in momenti caratteristici della campagna di produzione differenti da cultivar a cultivar (a maturazione più o meno precoce o tardiva), in relazione anche all'andamento climatico dell'annata (Sacchi *et al.*, 2003). L'intero processo tecnologico di produzione dell'olio dalle olive prevede l'uso esclusivo di mezzi fisici e meccanici nell'ambito delle diverse fasi che portano alla separazione della componente oleosa dalla sansa e dall'acqua di vegetazione (**Fig. 1.2**).

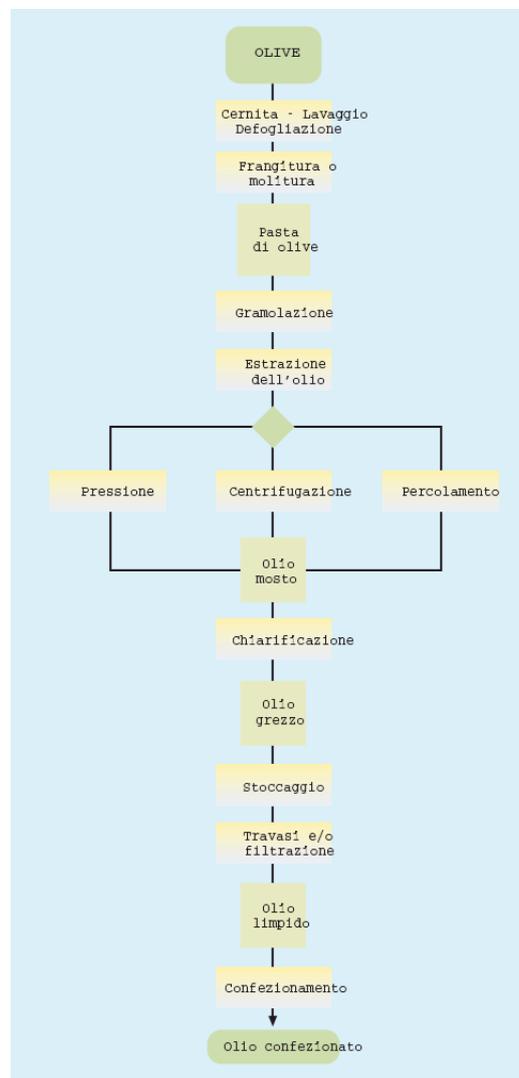


Figura 1.2 Processo produttivo dell'olio dalle olive (Sacchi *et al.*, 2003)

Dal punto di vista chimico-fisico, l'olio di oliva può essere considerato un grasso alimentare liquido a temperatura ambiente. La composizione chimica dell'olio di oliva può essere schematizzata molto semplicemente, dal punto di vista delle rispettive proporzioni, in componenti maggiori e minori. La serie dei composti maggiori (98-99%) è costituita principalmente dai triacilgliceroli o trigliceridi (TAG) e dal gruppo costituito dagli acidi grassi liberi (FFA) e dai mono e digliceridi (MAG e DAG). Gli acidi grassi che compongono i trigliceridi sono principalmente: palmitico C16:0 (P: 6,30-20,93%), palmitoleico C16:1 (Po: 0,32-3,52%), stearico C18:0 (S: 0,32-5,33%), oleico C18:1 (O: 55,23- 86,64%), linoleico C18:2 (L: 2,7-20,24%) e linolenico C18:3 (Ln: 0,11-1,52%). L'ampio range di acidi grassi è in gran parte dipendente dalla cultivar e, in una certa misura, dall'origine geografica in relazione alle condizioni pedoclimatiche. Altri derivanti degli acidi grassi, come fosfolipidi, cere ed esteri degli steroli, sono inclusi tradizionalmente nei composti minori insieme ad un gruppo ampio ed eterogeneo di oltre 200 composti costituito da steroli, alcoli alifatici, idrocarburi, biofenoli, tocoferoli, composti volatili. Benché quantitativamente si tratti di concentrazioni esigue, che raggiungono in qualche caso al massimo poche centinaia di ppm, tali composti minori giocano un ruolo importante nel definire i peculiari caratteri di unicità dell'olio di oliva come grasso alimentare sia dal punto di vista della qualità sensoriale che nutrizionale, nella definizione della tipicità e della genuinità e più recentemente nell'ambito della tracciabilità oltre agli aspetti salutistici (Garcia-Gonzàles *et al.*, 2008). Tutti questi composti sono alla base delle sfide attuali e future nell'ambito della ricerca scientifica sull'olio di oliva (**Fig. 1.3**) (Garcia-Gonzàles & Aparicio, 2010).

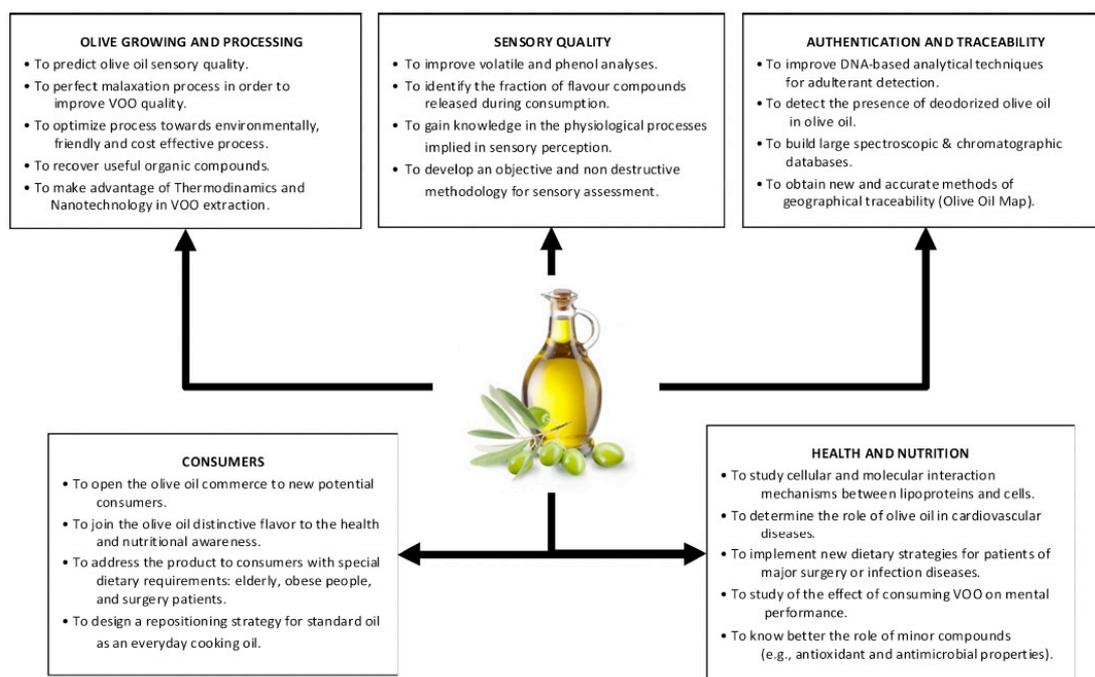


Figura 1.3 Sfide attuali e future nell'ambito della ricerca (Garcia-Gonzàles & Aparicio, 2010)

L'olio extra vergine è caratterizzato da un *flavour* fragrante e delicato che è stato apprezzato fin dall'antichità da tutti i popoli del bacino mediterraneo, sua naturale zona di provenienza, e che ne ha diffuso il consumo anche nei paesi in cui era praticamente sconosciuto (Nord Europa, Canada, Stati Uniti, Giappone). Molti consumatori identificano nell'olio di oliva un prodotto alimentare che combina perfettamente valori nutrizionali e sensoriali. Questa percezione ha ampliato il consumo di olio d'oliva a dati che erano inimmaginabili solo un decennio fa (Unaprol, 2010; Simonelli, 2011).

1.2 L'AROMA DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA

L'olio Extra Vergine di Oliva può essere considerato un “*lipid fruit juice*” ottenuto dal frutto fresco dell'olivo (*Olea europea*) per mezzo di processi puramente fisici e meccanici. Questo lo rende un prodotto dalle caratteristiche particolari, soprattutto dal punto di vista delle proprietà organolettiche e nutrizionali, che riveste un ruolo fondamentale nelle abitudini alimentari delle popolazioni del Mediterraneo.

Numerose sono le varietà di olive da cui si ricava l'olio, la loro diffusione è strettamente legata al territorio, ognuna presenta differenti caratteristiche compositive (acidi grassi, antiossidanti, ecc.) e sensoriali (odori e sapori tipici).

La qualità sensoriale è definita mediante la valutazione organolettica effettuata secondo il metodo COI (Panel Test) introdotto dalla normativa comunitaria nel 1991 e più volte aggiornato (Reg. CEE 2568/91 e succ. mod.). L'insieme dei numerosi composti volatili (con le moderne tecniche di analisi ne sono stati identificati oltre cento nell'olio) contribuisce a formare l'aroma dell'olio. Si tratta di sostanze chimiche naturali volatili a temperatura corporea, percepibili attraverso i recettori olfattivi della cavità retronasale. In un prodotto di qualità i composti volatili derivano dalle reazioni biochimiche naturali che si innescano nell'oliva durante la molitura e l'estrazione dell'olio in frantoio. La loro composizione è alla base della diversità di aroma che si riscontra tra i singoli oli di oliva e varia con la varietà di oliva, con il grado di maturazione, con la temperatura di estrazione e con vari altri fattori, contribuendo alla tipicità del prodotto. E' stato ampiamente dimostrato in letteratura che cultivar, condizioni climatiche del luogo di coltivazione, pratiche agronomiche, grado di maturazione, condizioni di stoccaggio e tecniche di lavorazione del frutto sono tutti fattori che possono influenzare la formazione e la presenza di composti responsabili dell'aroma dell'olio vergine di oliva, sia nella tipologia che nella quantità di composti volatili e fenolici. Olivi della stessa varietà, coltivati nelle medesime condizioni ambientali, producono oli con composti volatili differenti, come avviene anche per una stessa cultivar coltivata in areali diversi (Angerosa *et al.*, 1999; Benincasa *et al.*, 2003).

I composti volatili responsabili della maggior parte delle sensazioni organolettiche percepite durante l'assaggio di un olio extra vergine di oliva sono caratterizzati da un basso peso molecolare (< 300 Da), appartengono a diverse classi chimiche quali aldeidi, alcoli, esteri, eteri, idrocarburi, chetoni, furani, terpeni (Angerosa *et al.*, 2004; Sakouhi *et al.*, 2009), fenoli (Vichi *et al.*, 2008) e altri composti volatili non ancora identificati. Tra questi, i composti C6 e C5 che si originano dalla “cascata delle lipossigenasi”, hanno odori che ricordano quelli delle foglie o di frutti o vegetali non completamente maturi e dell'erba appena tagliata. Sono ritenuti responsabili delle cosiddette note di *verde* e di *fruttato* dell'olio di oliva di buona qualità (Aparicio & Morales, 1998; Angerosa *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2006). Da diverso tempo i composti minori dell'olio extravergine di oliva sono studiati con riferimento anche alle soglie di percezione dei singoli composti per tentare di spiegare l'origine delle percezioni sensoriali sperimentate durante l'assaggio (Guth & Grosh, 1993; Aparicio *et al.*, 1996) e il possibile ruolo delle interazioni tra i diversi componenti (Caporale *et al.*, 2004). La maggior parte delle sensazioni organolettiche percepite durante l'assaggio di un olio extra vergine di oliva sono dovute alle stimolazioni della mucosa olfattiva da parte dei composti volatili.

Questi sono caratterizzati da:

- basso peso molecolare (< 300 Da);
- elevata volatilità per raggiungere facilmente l'epitelio olfattivo;
- sufficiente idrosolubilità per diffondere nella mucosa che ricopre le cellule olfattive.
- buona liposolubilità per attraversare le membrane lipidiche e giungere alle proteine recettoriali.

L'olio vergine di oliva sintetizzato nella drupa e immagazzinato nel vacuolo delle cellule oleifere del mesocarpo contiene solo piccolissime quantità di composti volatili derivanti dal metabolismo degli acidi grassi o dalla conversione

di alcuni amminoacidi. La maggior parte di questi composti, derivanti da un olio di buona qualità, si originano dall'ossidazione enzimatica degli acidi linolenico e linoleico quando la drupa viene franta e le strutture cellulari vengono lese (Angerosa, 2002).

I componenti responsabili delle note olfattive appartengono a diverse classi chimiche quali aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, idrocarburi, eteri. Essi non esistono (o esistono solo in tracce) nelle cellule intatte, si formano in seguito all'attivazione di una serie di reazioni enzimatiche che, nel loro insieme, vanno sotto il nome di "cascata delle lipossigenasi" (Angerosa, 2002).

La composizione volatile dell'olio di oliva dipende da numerosi fattori come i livelli e l'attività degli enzimi coinvolti nelle varie vie metaboliche (Angerosa, 2002; Angerosa *et al.*, 1999) i quali sono determinati geneticamente (Campeol *et al.*, 2001), il ciclo di maturazione dei frutti (Aparicio & Morales, 1998; Lazzez *et al.*, 2008), il metodo di estrazione e le condizioni di conservazione (Di Giovacchino *et al.*, 2001; Vekiari *et al.*, 2007), il clima e il tipo di suolo (Ranalli *et al.*, 1999).

Il *flavour* è un elemento rilevante nella determinazione della qualità e dell'autenticità degli oli extravergini di oliva. Proprietà sensoriali distintive possono essere attribuite a una complessa miscela di più di un centinaio di composti volatili (Morales *et al.*, 1994; Vichi *et al.*, 2003) di differenti classi chimiche, principalmente aldeidi, alcoli, esteri, idrocarburi e chetoni. Negli oli vergini di oliva di alta qualità, i composti C5 e C6 generati enzimaticamente attraverso la via della lipossigenasi rappresentano la frazione più importante dei profili volatili (Angerosa *et al.*, 1999; Cavalli *et al.*, 2004) e sono responsabili delle note odorose di verde (Angerosa, 2002).

I composti volatili C6 e C5 responsabili delle note odorose degli oli vergini di oliva provengono dalla via della lipossigenasi primaria e secondaria, rispettivamente (Angerosa, 2002; Aparicio & Morales, 1998; Kiritsakis *et al.*, 1998).

Da un punto di vista quantitativo, le aldeidi C6 e i loro corrispondenti alcoli sono le principali famiglie chimiche presenti negli spazi di testa dei vari oli extravergini. Questo può essere spiegato dalla differente attività dell'enzima alcol-deidrogenasi che riduce i composti aldeidici C6 nei loro corrispondenti alcoli. Le aldeidi sono usualmente caratterizzate da sentori di verde, fruttato e note sensoriali di amaro (Manai *et al.*, 2008). Invece, gli esteri C6 contribuiscono alle note sensoriali di "dolce" oltre che di "fruttato" (Inarejos-García *et al.*, 2010).

Da studi analitici condotti da diversi autori (Sanchez & Harwood, 2002; Conde *et al.*, 2008; Angerosa, 2002) e su diverse cultivar spagnole e italiane mediante gas-cromatografia accoppiata a spettrometria di massa sui composti volatili, è emerso che i seguenti composti rappresentano più dell'80% del totale: aldeidi C6 (esanale, *cis*-3-esenale, *trans*-2-esenale), alcoli (esanolo, *cis*-3-esenolo, *trans*-2-esenolo), esteri (esil acetato, *cis*-3-esenil acetato).

1.2.1 La biogenesi degli aromi

I composti volatili nell'olio vergine di oliva sono principalmente formati dall'ossidazione chimica ed enzimatica. I volatili formati dall'ossidazione chimica dell'olio sono responsabili dell'*off-flavour* riferito alla rancidità ossidativa. In contrasto, l'ossidazione enzimatica degli oli di oliva, specialmente attraverso la via della lipossigenasi (LOX), è considerata la principale responsabile dell'aroma dell'olio (**Fig.1.4**) (Angerosa, 2002; Angerosa *et al.*, 2004; Kiritsakis, 1998).

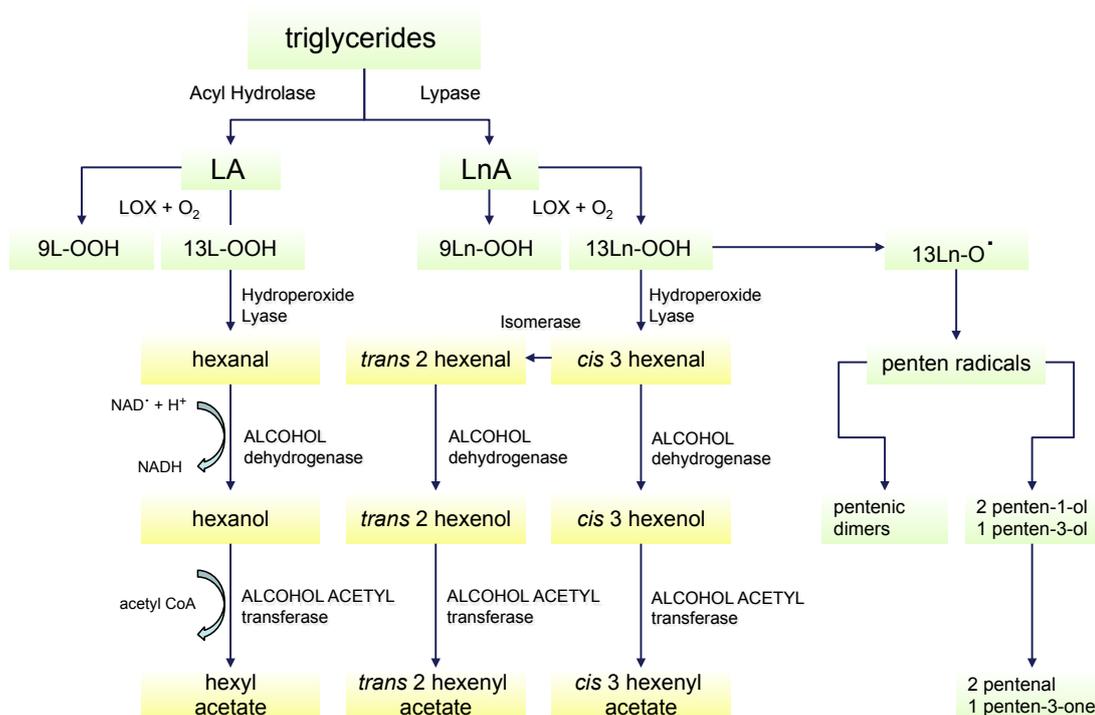


Figura 1.4 La cascata della lipossigenasi (Angerosa *et al.*, 2004)

La via o, meglio, la cascata delle lipossigenasi è una via metabolica che prevede l'azione combinata e sequenziale di quattro enzimi: lipossigenasi, idroperossido liasi, alcol deidrogenasi e alcol aciltransferasi (Olias *et al.*, 1993; Conde *et al.*, 2008; Sanchez e Harwood, 2002). La cascata delle lipossigenasi è iniziata dall'attivazione di enzimi quando i tessuti dell'oliva sono distrutti. La reazione coinvolge le lipasi endogene (acil-idrolasi, **AH**) associate alle membrane cellulari ed enzimi che ossidano (lipossigenasi, **LOX**) e scindono (idroperossido liasi, **HPL**) gli acidi grassi polinsaturi per produrre aldeidi. Queste sono successivamente ridotte ad alcoli (alcol deidrogenasi, **ADH**) ed esterificate solitamente con una molecola di acido acetico (da alcol aciltransferasi, **AAT**).

Azione dell'acil-idrolasi (**AH**) e delle lipossigenasi (**LOX**)

Nel primo step della formazione dei volatili, le acil-idrolasi (**AH**) idrolizzano i trigliceridi e i fosfolipidi dimembrana rilasciando acidi grassi liberi. Le acil-idrolasi lipolitiche sono un gruppo di enzimi che includono lipasi, fosfolipasi e galattolipasi. L'acil-idrolasi esibisce uno stretto range di attività di pH nell'intervallo basico con un optimum di attività intorno a pH 8,5.

Gli idroperossidi sono formati quando gli acidi grassi rilasciati dall'azione delle acil-idrolasi vengono ossidati tramite l'azione delle lipossigenasi (**LOX**). Queste mostrano regiospecificità per la posizione Δ -13 di entrambi gli acidi polinsaturi (linoleico e linolenico), producendo idroperossidi dell'acido grasso per il 75–90% in posizione Δ -13. L'enzima è più attivo con l'acido linolenico che con l'acido linoleico (Salas *et al.*, 1999; Sanchez & Salas, 2000). L'alta attività delle lipossigenasi nei confronti dell'acido linolenico e dell'acido linoleico favorisce la biogenesi di molti dei composti volatili insaturi a sei carboni (**Fig. 1.4**), i quali sono i maggiori costituenti dell'aroma dell'olio vergine di oliva (Salas *et al.*, 1999). Le olive mostrano la più alta attività delle lipossigenasi circa 15 settimane dopo la fioritura e decresce durante i periodi di sviluppo e maturazione (Salas *et al.*, 1999).

Le lipossigenasi hanno mostrato di essere termicamente instabili. A 60°C, l'attività delle lipossigenasi è ridotta a meno del 10% entro 1 minuto (Anthon & Barrett, 2003). I risultati non escludono la stabilità termica di una forma minore dell'enzima che è responsabile della formazione lipidica dei 13-idroperossidi (Anthon & Barrett, 2003). Sono state riportate differenti stabilità termiche per le lipossigenasi e questo può anche essere attribuito all'esistenza di differenti isoforme (Kalua *et al.*, 2007).

Azione dell'idroperossido-liasi (HPL) e della cis-3 trans-2-enale isomerasi

L'idroperossido-liasi (HPL) catalizza la scissione degli idroperossidi degli acidi grassi, producendo aldeidi e ossoacidi volatili (Fig. 1.4). L'enzima HPL può produrre aldeidi C6 e ω -ossoacidi C12 dai 13-idroperossidi dell'acido linolenico o linoleico, o aldeidi C9 e ω -ossoacidi C9 dai derivati 9-idroperossidi degli stessi acidi grassi, dipendendo dalla specificità dell'enzima per il substrato (Kalua *et al.*, 2007). L'isoforma HPL che scinde i 9-idroperossidi è responsabile del caratteristico odore di cetriolo di alcuni frutti e vegetali, mentre l'isoforma dell'enzima che utilizza i 13-idroperossidi produce aldeidi C6 responsabili dell'aroma di verde (Olias *et al.*, 1993; Salas & Sanchez, 1999; Sanchez & Salas, 2000). La scissione dei 13-idroperossidi forma aldeidi C6 (Fig.) che includono aldeidi sature (esanale) dall'acido linoleico e insature (*cis*-3-esenale) dall'acido linolenico. L'aldeide insatura *cis*-3-esenale, è piuttosto instabile e viene di solito sottoposta a una rapida isomerizzazione nel composto più stabile, la *trans*-2-esenale, con l'aiuto della *cis*-3:*trans*-2-enale isomerasi (William *et al.*, 2000). Le aldeidi formate tramite l'attività delle HPL e isomerizzate con l'aiuto della *cis*-3:*trans*-2-enale isomerasi sono ulteriormente ridotte ad alcoli.

Il più alto livello di attività dell'HPL è rilevato nelle olive verdi raccolte all'epoca iniziale di sviluppo. C'è una leggera diminuzione a maturità, ma un alto livello di attività è mantenuto durante la maturazione. Conseguentemente, la diminuzione nella concentrazione di composti volatili C6 negli oli da olive mature non è attribuibile all'attività delle idroperossido-liasi (Salas & Sanchez, 1999). Questo suggerisce che il fattore limitante nella formazione di aldeidi volatili potrebbe essere non il livello di HPL ma la disponibilità del substrato polinsaturo (Kalua *et al.*, 2007) o il pH (Sacchi, 2011).

È stato dimostrato che l'HPL è labile al calore (Anthon & Barret, 2003) e mostra un'attività ottimale in leggere condizioni acide. L'attività dell'HPL può essere rapidamente ridotta a una piccola percentuale della sua attività originale ad elevate temperature (Anthon & Barrett, 2003). La massima attività è stata osservata a 15 °C con un chiaro declino a 35 °C (Salas & Sanchez, 1999).

Azione dell'alcol-deidrogenasi (ADH)

L'alcol-deidrogenasi catalizza la riduzione reversibile delle aldeidi alifatiche ad alcoli (Fig. 1.4). L'ADH è molto diffuso nel regno delle piante ed è responsabile della formazione degli alcoli volatili che contribuiscono all'aroma dei prodotti vegetali (Sanchez & Salas, 2000). C'è un declino nell'attività dell'alcol-deidrogenasi quando il colore delle olive cambia a porpora durante il processo di maturazione. Il nocciolo delle olive sembra essere una buona risorsa di ADH, che è più specifico per le aldeidi sature C6 (Luaces *et al.*, 2003). Il range di pH per l'attività dell'alcol-deidrogenasi è tra 5.0 e 8.5 con un optimum a 6.8. I *threshold* degli alcoli sono nettamente più alti delle corrispondenti aldeidi.

Azione dell'alcol-acetil transferasi (AAT)

Gli alcoli, prodotti dall'azione dell'alcol-deidrogenasi, possono essere trasformati in esteri volatili. L'alcol-acetil transferasi catalizza, infatti, la formazione di esteri acetati attraverso derivati dell'acetil-CoA. Gli esteri acetati, e gli esteri di alcoli con altri acidi grassi sono importanti costituenti di molti frutti. Negli oli di oliva, l'etil-propionato e l'esil-acetato sono importanti costituenti delle note di fruttato e di dolce (Sanchez & Salas, 2000; Williams *et al.*, 1998). L'AAT delle olive non mostra attività verso gli alcoli a corta catena come il metanolo e l'etanolo e mostra bassa attività

verso butanolo e 3-metilbutanolo (Sanchez & Salas, 2000). La mancanza di attività verso gli alcoli a corta catena spiega la scarsità di esenil-acetato nell'olio di oliva sebbene la concentrazione dei precursori (*cis*-3-esenolo e *trans*-2-esenolo) è dominante tra gli alcoli volatili (Salas, 2004). Questa mancanza di attività suggerisce anche che l'etil-acetato, un estere comunemente rilevato nell'olio di oliva, potrebbe essere sintetizzato attraverso una diversa via metabolica (Salas, 2004). Simili osservazioni sulla mancanza di attività dell'AAT verso gli alcoli a corta catena sono state fatte per l'alcol-acetil transferasi della fragola dove l'esanololo è il substrato preferito con diminuzione delle quantità di esterificazione del butanolo, alcol isoamilico, propanolo ed etanolo (Perez *et al.*, 1993). AAT è un enzima più selettivo, formando esteri acetati e solo piccoli quantitativi di propionato ed esteri butirrati (Perez *et al.*, 1996). La massima attività dell'alcol-acetil transferasi nelle olive è ottenuta con l'esanololo e il *cis*-3-esenolo; il *trans*-2-esenolo è un substrato più scarso (Salas, 2004). L'optimum di range del pH per l'attività dell'AAT appare nell'intervallo basico con una rapida diminuzione nell'intervallo acido (Salas, 2004). L'attività dell'alcol-acetil transferasi mostra un maximum a 35°C.

Inoltre, si osserva un accumulo di alcoli quando l'attività dell'AAT è più bassa degli enzimi precedenti nella via metabolica. Aumentando l'attività dell'AAT aumenta la produzione di esteri volatili responsabili dell'aroma di fruttato, floreale e di dolce nell'olio di oliva. L'attività dell'alcol-acetil transferasi può essere aumentata tramite la selezione delle cultivar e la modifica del processo di estrazione, come l'operare a più basse temperature per prevenire l'inattivazione degli enzimi, promuovere l'attività di esterificazione (Salas, 2004) e ridurre la densità di esteri volatili.

Quindi, molti degli enzimi coinvolti nella formazione dei composti volatili attraverso la via delle lipossigenasi diminuiscono la loro attività con la maturazione dei frutti, per esempio l'alcol-deidrogenasi (Salas & Sanchez, 1998) e le lipossigenasi (Salas *et al.*, 1999). Questo spiega l'osservazione di un ridotto contenuto di composti volatili C6, specialmente quelli dall'acido linolenico, nell'aroma degli oli di oliva con l'aumento del grado di maturazione del frutto (Salas & Sanchez, 1998).

Molte delle aldeidi C6 raggiungono un massimo quando la pigmentazione dell'epidermide delle olive cambia da verde a porpora (Angerosa & Basti, 2001). Alle prime fasi di maturazione, i quantitativi di aldeidi C6 sono comparabili a quelli degli alcoli (Angerosa & Basti, 2001). La *trans*-2-esenale, il principale composto volatile della maggior parte degli oli extravergini di oliva europei, diminuisce con la maturazione nella maggioranza delle cultivar. La diminuzione è osservata per molti delle aldeidi prodotte dalla via della lipossigenasi eccetto per la *cis*-3-esenale, che aumenta con la maturazione (Aparicio & Morales, 1998).

I componenti correlati positivamente con l'I.M. (indice di maturazione) negli oli di oliva risultano essere il *trans*-3-esen-1-olo, *cis*-3-esen-1-olo, *trans*-2-esen-1-olo, esanale ed esil-acetato (Aparicio & Morales, 1998).

Oltre ai composti prodotti dalla via della lipossigenasi, ci sono molti altri composti che si originano da altre vie metaboliche e che possono incidere sul profilo sensoriale, molte volte condizionando anche in negativo l'aroma finale (*offflavour*). Le principali vie oltre alle lipossigenasi, riguardano: fermentazione di zuccheri, conversione di alcuni amminoacidi, metabolismo di acidi grassi e scissione omolitica dei 13-idroperossidi (Angerosa, 2002).

Proprio con quest'ultima via si è cercato di spiegare la presenza considerevole di composti C5, in particolare alcoli e altri composti carbonilici (Angerosa *et al.*, 2000). In verità questa via risulta essere un'ulteriore *branch* della cascata delle lipossigenasi, infatti i composti di partenza sono sempre i 13-idroperossidi, che attraverso la formazione di alcossi radicali, portano alla neogenesi dei prodotti C5. Alcuni di questi composti C5 risultano contribuire ad alcune note verdi (Angerosa *et al.*, 2000). Alcuni composti volatili possono essere formati anche da amminoacidi, ad esempio è stato riportato che valina e leucina sono convertiti in composti volatili (alchili ramificati, composti acilici degli esteri e alcoli ramificati) che possono risultare in variazioni dell'aroma dell'olio (Kalua *et al.*, 2007).

Nella **Figura 1.5** sono mostrate le principali vie di formazione dei composti volatili e i loro prodotti finali (Angerosa *et al.*, 2002).



Figura 1.5 Principali vie di formazione dei composti volatili e i loro prodotti finali (Angerosa *et al.*, 2002)

Le differenze nei contenuti dei volatili C5 e C6 potrebbero anche essere relazionati alla regione geografica. Per esempio, il dominio della *trans*-2-esenale nei profili volatili degli oli extravergini di oliva europei (Cavalli *et al.*, 2004) non è sempre osservata negli oli di altre regioni (Kiritsakis, 1998). Uno dei primi studi (Reiners & Grosch, 1998) indicava la ricchezza di aldeidi C6 negli oli italiani ma rilevava che gli esteri di fruttato erano dominanti tra i composti aromatici degli oli marocchini. La variazione nei livelli delle aldeidi e degli alcoli C6 nei campioni di olio di differenti regioni suggeriscono come le condizioni ambientali potrebbero influenzare l'attività delle ADH (Kalua *et al.*, 2007). Differenze nei livelli di esteri nell'olio di oliva non erano osservate tra le varie zone in un altro studio, indicando una minore dipendenza dell'attività delle AAT dalle condizioni climatiche (Vichi *et al.*, 2003). È stato ipotizzato che l'accumulo di composti volatili è dominato dalla varietà, con i fattori climatici e ambientali che probabilmente hanno un effetto indiretto nel modificare il grado di maturazione (Angerosa *et al.*, 1999). Sebbene ci sia un legame tra la varietà e l'accumulo di composti volatili, non è chiaro tuttavia se questo sia il caso di tutti i composti volatili. Vichi *et al.* (2003) non osservarono differenze nei composti volatili C5 rispetto alla cultivar, indicando che l'area geografica è il principale fattore influente sulla formazione di questi composti (Kalua *et al.*, 2007).

1.2.2 Fattori che influenzano la formazione dell'aroma

Tutti i fattori che intervengono nel corso delle diverse fasi del processo produttivo dell'olio dalle olive ne influenzano il contenuto dei composti minori e, di conseguenza, la qualità sensoriale (**Tab. 1.1**) (García- Gonzales & Aparicio, 2010). La selezione di olive a giusta maturazione e condizioni di processo ottimali sono fattori che possono essere usati per controllare il processo di formazione dei composti volatili.

Tabella 1.1 Fattori che influenzano il contenuto dei composti minori dell'olio (García- Gonzales & Aparicio, 2010)

process	objective	drawbacks	parameters to be controlled
hedgerow orchards	high yields kg per ha automatic fertirrigation	low diversity of cultivars high water consumption high risk of the olive oil tree illnesses (e.g., verticillium wilt)	harvesting time by chemical/sensory parameters effect of wastewater on oil production phenol content to avoid excessive reduction
traditional orchards	sustainable production high diversity of cultivars low pesticide and water consumption	variability of chemical composition between seasons difficulty in automation more affected by pest outbreak	chemical composition related to cultivars
harvesting (by shakers)	lower cost harvesting better harvesting for olives	in case of small olive mill capacity, olives might be stored for days before processing	sensory defects due to long olive storage
washing	cleaning olives removing earth, mud, leaves, twigs, etc. protecting machinery from mineral materials avoiding undesirable sensory attributes	loss of olive oil with over-ripen olives need of a water recycling system	E-2-hexenal and bitterness perception if leaves are added moldy and earthy sensory perceptions and related volatiles if uncleaned olives are used
crushing by metallic crushers	lowering cost increasing hourly working load several kinds of crushers at various speeds	emulsions temperature of the paste increases up to 6–10 °C lesser amount of volatiles than old granite crushers	metallic sensory perception bitterness, if there is violent crushing
mixing	automating control of time and temperature applying inert atmosphere (N ₂) while mixing	occasional addition of coadjuvants (micronized mineral talc)	sensory perception and volatiles if temperature is too high amount of phenols with N ₂ atmosphere
pressure	lowering investment and energy/water consumption minimizing OMW ³ production	hygienic working conditions lower scores in sensory assessment high labor costs low working load discontinuous process	chlorophylls, peroxide value, alcohols, ketones, and acetic acid
percolation	working at room temperature with no water addition higher olive oil quality	semiautomated process low yield not applicable to all olives low working load	yield
three-phase decanters	lowering labor cost with fully automated process increasing oil yield, <3–5% oil in olive pomace	high investment energy and water consumptions high volume of OMW need for OMW treatment plants	compounds related to taste
two-phase decanters	reducing low OMW effluents and high amount of phenols	lower yield highly wet olive pomace need for a second decanting of "alperujo"	compounds related to flavor and taste, induction time
modern storing	enhanced storing procedure (stainless steel containers under inert atmosphere)	high cost room temperature control	rancid (hexanal and nonanal) and o-diphenols
bottling	avoid oxidation with brown glass and use of N ₂ headspace	selling in low quality plastic containers	rancid and cucumber defects (2,6-nonadienal), pyropheophytins, shelf life

Materia prima

La cultivar è sicuramente uno dei fattori più importante nel determinare la qualità aromatica dell'olio, poiché la quantità e qualità dei composti aromatici e delle note sensoriali varia profondamente per cause genetiche (Tura *et al.*, 2008). Difatti frutti da differenti cultivar cresciuti sotto le stesse condizioni ambientali potrebbero produrre oli con differenti composti volatili, così come frutti della stessa cultivar cresciuti in differenti aree geografiche (Angerosa *et al.*, 1999; Kalua *et al.*, 2007).

Il fatto che cultivar diverse, coltivate sotto identiche condizioni ambientali e di lavorazione, possano produrre oli con note aromatiche differenti è stato dimostrato da molti decenni: Montedoro *et al.* (1987), studiando le caratteristiche di tre cultivar italiane (Canino, Frantoio e Leccino), hanno osservato differenze quantitative, più che qualitative, dei composti volatili (Montedoro *et al.*, 1987).

I fattori varietali sono fondamentali nella formazione dei composti aromatici, in quanto ogni varietà è caratterizzata da una specifica quantità di enzimi coinvolti nella loro biosintesi.

E' stato evidenziato che la differenza fra oli monovarietali è dovuta principalmente a differenze quantitative della presenza di enzimi, più che qualitative. L'influenza della cultivar può essere evidenziata dal differente ammontare di composti C6 derivanti dall'ossidazione enzimatica dell'acido linoleico. E' stato evidenziato come l'influenza delle variabili climatiche sia secondaria all'effetto della cultivar sulla formazione dell'aroma negli oli vergini di oliva. Questa caratteristica, insieme alla differente concentrazione di trans-2-esenale, può essere un valido strumento per differenziare oli monovarietali, provenienti cioè da cultivar diverse (Angerosa *et al.*, 2004).

Dhifi *et al.* (2004) hanno studiato il contenuto in composti aromatici di quattro varietà tunisine (Chetoui, Chemlali, Chemchali, Oueslati), individuando una grande variabilità di concentrazione: la cultivar Chemchali ha mostrato il massimo fra i campioni analizzati (59.7 µg/mL), mentre il minimo si è riscontrato nella varietà Oueslati (15.7 µg/mL). Poiché nella sperimentazione sono state annullate gli effetti dovuti a differenze nella lavorazione, le diverse concentrazioni di composti volatili sono da attribuirsi ai fattori genetici e alla loro interazione con le condizioni climatiche e pratiche agronomiche (Dhifi *et al.*, 2004).

Cultivar Chetoui e Chemlali, coltivate in Tunisia, sono state comparate alle cv Nocellara del Belice, Biancolilla e Cerasuola (coltivate in Sicilia), verificando che oli vergini ottenuti dalla varietà Chetoui sono caratterizzati da minor contenuto di aldeidi C6 (come il trans-2-esenale) ed esteri, responsabili della nota sensoriale “verde” e “fruttato”, rispettivamente, confrontati con oli ottenuti dalle altre varietà citate (Baccouri *et al.*, 2008).

Secondo Tura *et al.* (2008), i principali composti volatili che presentano maggiore variabilità per effetto della cultivar sono i seguenti: etanolo, 2-metilpropanolo, pentanolo, cis-2-pentenolo, cis-3-esenolo e ottanolo. Mentre, tra le note sensoriali, le seguenti sembrano dipendere principalmente dalla cultivar: “floreale”, “banana”, “mela”, “noce”, “fieno”, “burro”, “dolce” e “fruttato” (Tura *et al.*, 2008).

La concentrazione dei composti volatili responsabili dell'aroma dell'olio varia in relazione al grado di maturazione del frutto. Con l'avanzare della maturazione, infatti, si verifica un aumento della quantità di composti volatili, fino a raggiungere un picco massimo in corrispondenza dell'invasatura, a cui segue un decremento in stadi di maturazione più avanzati (Aparicio & Morales, 1998; Kiritsakis 1998).

Scamogli *et al.* (2009), in accordo con altri autori, hanno evidenziato la diminuzione nel tempo della nota aromatica definita con l'attributo di “fruttato erbaceo”, dovuta a diminuzione della concentrazione di composti quali aldeidi C6, esenale, trans-2-esenale. Contemporaneamente si è registrata un aumento dell'acido linoleico ed aumento del linolenico con il progredire del processo di inolizione, probabilmente per effetto dell'aumentata attività enzimatica. Anche Salvador *et al.* (2001) hanno riscontrato una diminuzione degli attributi positivi, soprattutto fruttato ed amaro, a causa dell'avanzamento del processo di maturazione.

Le piante sono soggette all'attacco di diversi organismi e come risultato hanno evoluto un complesso sistema di difesa contro i potenziali patogeni per assicurarsi la sopravvivenza, la crescita e lo sviluppo. In risposta ad attacchi patogeni, le piante sintetizzano composti che attivano meccanismi di difesa nei frutti; ciò potrebbe aver effetto sull'aroma complessivo dell'olio di oliva (Gomez-Caravaca, 2008). Tra i parassiti animali e vegetali che colpiscono l'olivo, la mosca, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) è quella più temuta negli ambienti di coltivazione tradizionali, in quanto può compromettere fortemente la qualità e la produzione, provocando inoltre cascola anticipata e riduzione della resa in olio. Lo studio dell'influenza del livello di attacco di *Bactrocera* su cv di Coratina e Nebbio, ha dimostrato un peggioramento del livello qualitativo all'aumentare della percentuale di olive infestate. Queste ultime subiscono un netto decremento del contenuto fenolico e un aumento di alcoli e aldeidi con sensazioni sgradevoli (Angerosa *et al.*, 1992).

Il notevole incremento dei composti carbonilici e alcoli è in relazione allo stadio di sviluppo dell'insetto e alla percentuale di attacco delle olive (Angerosa *et al.*, 2004).

In conseguenza dell'attacco della mosca può verificarsi diminuzione del rapporto trans-2-esenale/esanale e del rapporto esanale/alcoli totali. Quest'ultimo ha una buona correlazione con la gravità dell'infestazione, per cui può essere considerato come parametro oggettivo per stabilire se e in che misura le olive, da cui si è estratto l'olio, hanno subito attacco della mosca olearia (Angerosa *et al.*, 1992).

Molti studi sono stati condotti sull'effetto della disponibilità d'acqua durante il periodo di crescita delle drupe e la concentrazione dei composti volatili. I risultati hanno dimostrato che, nelle condizioni climatiche dell'Italia centrale, la piovosità è preminente rispetto alle temperature, e che alcuni composti, come esanale e isobutil-acetato sono correlati negativamente alla piovosità (Angerosa *et al.*, 2004). L'effetto della maggiore disponibilità idrica si esplica in una variazione della concentrazione di composti volatili, soprattutto trans-2-esenale, cis-3-esenolo ed esanolo, nel senso di un loro incremento all'aumentare del volume irriguo. Alcuni altri composti volatili non sembrano subire variazioni, come ad esempio 1-penten-3-one e 1-penten-3-olo, poiché sembrano più correlati a fattori stagionali e di maturazione che alle pratiche irrigue (Gomez-Rico *et al.*, 2006). In studi successivi, gli stessi autori (Gomez-Rico *et al.*, 2009) hanno verificato che anche l'esanale mostra una variazione inversa della sua concentrazione all'aumentare dello stress idrico. A conclusioni opposte sono giunti Stefanoudaki *et al.* (2009), che hanno riscontrato valori più bassi di 1-penten-3-olo e 1-penten-3-one a causa dell'irrigazione, per la varietà Leccino ma non per quella Cornicabra (in cui non si riscontrano modificazioni significative). E' stata riportata una diminuzione della concentrazione dei composti volatili totali in oli da olive irrigate. I composti C5 subiscono un drastico decremento ma, in contrasto con altri autori, non si sono riscontrati incrementi nella concentrazione dei composti volatili C6. Inoltre, l'irrigazione influisce su alcuni composti volatili derivanti dal metabolismo degli amminoacidi. Diversi autori concordano nell'affermazione che i composti volatili dell'olio vergine di oliva sono influenzati più dal tipo di strategia irrigua adottata che non dall'ammontare totale di acqua fornita alla coltura e che l'ammontare dei composti fenolici è in relazione al livello di stress idrico applicato (Gomez-Rico, 2006; Stefanoudaki *et al.*, 2009).

Da un lavoro di Kandylyis *et al.* (2011), la composizione volatile degli oli di oliva sembra comunque essere influenzata innanzitutto dal grado di maturazione e dalla regione geografica piuttosto che dall'irrigazione.

Area geografica

L'area geografica di origine ha un ruolo importante nella definizione del profilo aromatico di un olio vergine di oliva. L'ambiente di crescita dell'olivo esercita un effetto indiretto sulla composizione volatile dell'olio modificando il grado di maturazione del frutto (Angerosa *et al.*, 1999). Tra l'altro, è ben noto che il clima associato a differenti latitudini e altitudini, dove gli olivi sono piantati, influenza l'attività degli enzimi delle olive e quindi la composizione chimica dell'olio di oliva (Garcia-González *et al.*, 2010). Ciò a dimostrazione della rilevanza dei disciplinari D.O.P., con un riferimento particolare al discorso del legame col territorio.

Diversi studi hanno confermato la ricchezza degli oli vergini italiani in aldeidi C6, mentre gli esteri fruttati sono dominanti nell'aroma degli oli vergini marocchini. La variazione del livello di aldeidi C6 ed alcoli implica che le condizioni ambientali possono influenzare l'attività dell'alcol deidrogenasi (Kalua *et al.*, 2007).

Vichi *et al.* (2003) non ha osservato alcuna differenza nella concentrazione dei composti C5 per cause varietali, suggerendo quindi che questi composti potrebbero essere influenzati principalmente dall'area geografica di origine.

Alcuni recenti studi hanno dimostrato la possibilità di discriminare oli provenienti da diverse regioni italiane mediante l'analisi dei composti volatili. La relazione fra origine degli oli vergine di oliva e profilo dei loro composti volatili è stata confermata usando HS-SPME-GC/MS. La procedura statistica di analisi dei composti principali (PCA) è stata

applicata per discriminare oli vergini di oliva provenienti da diverse origini geografiche e usare composti volatili quali marcatori (Angerosa *et al.*, 2004).

Issaoui *et al.* (2009) hanno studiato l'effetto della differenza di altitudine, latitudine e condizioni climatiche (nord e sud della Tunisia) nelle cultivar Chemlali e Chetoui. Oli provenienti da olivi coltivati in un'area geografica a maggior latitudine hanno mostrato un maggior numero di composti aromatici (15 contro 18) rispetto a quelli coltivati a sud. Fra le due cultivar, la Chemlali ha mostrato maggiori differenze nella composizione: oli provenienti dal sud presentano, fra i costituenti più importanti, il trans-2-esanale, dodecene, esanolo e valencene. Oli provenienti dalle regioni settentrionali contengono invece principalmente i seguenti composti volatili: cis-3-esenil acetato, cis- β -ocimene, esil acetato e cis-cis- α -farnesene (quest'ultimo composto molto più presente negli oli di varietà Chemlali rispetto alla Chetoui). Il valencene è un sesquiterpene ritrovato in tutti i campioni analizzati nello studio qui citato, ma data la scarsità di studi a riguardo non è conosciuto il ruolo di questi composti nell'aroma dell'olio.

Varietà coltivate a basse altitudini ed elevate temperature hanno mostrato un'alta presenza di aldeidi. La trans-2-esanale ed alcuni composti alcolici, come l'esanolo potrebbero essere usati quali marcatori per differenziare oli provenienti da regioni geografiche diverse (Issaoui *et al.*, 2009).

Anche altri autori, infatti, concordano che alcuni composti volatili hanno una forte dipendenza per l'area geografica di origine, come il livello di esanale, esanolo, trans-2-esanale, cis-3-esanale, trans-3-esenolo, cis-3-esenolo e trans-2-esenolo (Vichi *et al.*, 2003). Ciò è stato spiegato da Issaoui *et al.* (2009) ipotizzando che il livello di alcol acil-trasferasi (AAT) sia dipendente dalle condizioni pedoclimatiche. Al panel test, oli ottenuti dalla varietà Chemlali da olive coltivate al nord sono più fruttati, più amari e piccanti, mentre l'attributo fruttato è molto ridotto per quelli del sud. La varietà Chetoui non subisce variazioni significative in relazione alla latitudine di coltivazione.

Da ricerche sul contenuto in composti fenolici in relazione al variare dell'altitudine è risultato che per le cultivar Frantoio, Leccino, Moraiolo e Coratina, l'ammontare di polifenoli è doppio in oli prodotti ad altitudini inferiori a 100 mslm rispetto a quelli prodotti nell'entroterra, nella regione toscana (Aparicio & Luna, 2002). Ad alte altitudini, quindi, si ottengono oli generalmente più dolci e con un aroma erbaceo più intenso rispetto a più basse altitudini. Quest'ultimo aspetto è spiegato dalla maggiore presenza di esanale, probabilmente a causa dell'influenza della temperatura a diverse altitudini sull'attività degli enzimi della cascata della lipossigenasi (Aparicio & Luna, 2002).

L'applicazione della *cluster analysis* sul complesso dei composti volatili "verdi" ha consentito a Luna *et al.* (2006) di raggruppare 39 varietà analizzate in gruppi, con lo scopo di trovare marcatori tra i composti volatili che potessero discriminare oli provenienti da diverse aree. Il primo gruppo, costituito da varietà provenienti da diverse aree geografiche (Arbequina, Coratina, Frantoio, Moraiolo, Morruda, Cordobes, ecc.), che hanno in comune un'alta concentrazione di trans-2-esanale, media concentrazione di alcoli ed esteri, e bassa concentrazione di esanale. Il secondo gruppo è formato dalle varietà Leccino, Lechin, Megaritiki e Ogghiaredda che hanno un'alta concentrazione di cis-2-esanale, bassa concentrazione di alcoli, alta concentrazione di esteri, e una concentrazione di esanale simile agli alcoli. Varietà Cornicabra, Empeltre, Hojiblanca, Imperial, Picual, Memecik, Picholine Marocaine e Sourani costituiscono il terzo gruppo, e sono caratterizzate da alta concentrazione di trans-2-esanale ed esteri, e una quantità di esanale maggiore rispetto al trans-2-esanale. Il quarto gruppo, costituito da 12 campioni, è caratterizzato da alta concentrazione di trans-2-esanale ed esanale, media concentrazione di alcoli e bassa concentrazione di esteri.

Il numero di composti volatili che contribuiscono all'aroma varia in funzione delle varietà studiate. Infatti alcuni composti volatili, come il trans-2-esenolo, contribuiscono all'aroma solo in 3 delle varietà; il trans-2-esanale, invece, contribuisce alla formazione dell'aroma in ben 37 delle 39 varietà studiate.

Questi composti sono stati studiati mediante procedure statistiche per verificare se è possibile differenziare gli oli in base alle loro regioni geografiche di origine. I composti selezionati per differenziare oli greci da oli spagnoli sono stati esil acetato, etil benzene e un estere solo parzialmente identificato. Per distinguere oli italiani da quelli spagnoli sono stati i seguenti: 2-metil butil acetato, 2-metil-4-pentenale ed esanolo. Per la distinzione di oli italiani da quelli greci, infine, sono stati identificati il pentan-3-one, cis-3-esenale e un idrocarburo.

L'analisi di regressione ha permesso di classificare gli oli provenienti dalle macro-aree di origine (Spagna, Italia e Grecia) mediante i seguenti composti volatili: esil acetato, etil benzene, 2-metil-4-pentenale, etil furano, trans-2-pentenale, 1,2,3-trimetilbenzene, 3-metil butanolo e un idrocarburo.

Queste ricerche hanno dimostrato che esiste una grande variabilità nelle caratteristiche chimiche e sensoriali degli oli vergini di oliva a causa della diversa varietà di provenienza. Vi è, però, anche una tendenza a raggruppare varietà provenienti dalla stessa area con caratteristiche sensoriali e chimiche simili (Luna *et al.*, 2006).

In oli del nord Italia, la variabilità dei seguenti composti dipende principalmente dalla varietà: etanolo, 2-metilpropanolo, pentanolo, cis 2-pentenolo, cis 3-esenolo e ottanolo (Tura *et al.*, 2008).

Processo produttivo

L'aroma dell'olio al pari di altri alimenti e bevande si forma durante la lavorazione della materia prima, quando reazioni chimiche ed enzimatiche producono un ampio numero di composti odorosi (Breer, 2008).

Una non corretta gestione dei tempi e delle modalità di raccolta dei frutti e di stoccaggio di questi in attesa della lavorazione possono comportare peggioramento della qualità dell'olio. Olive stoccate all'aria aperta in grossi contenitori o in sacchi per tempi prolungati, possono subire l'azione di microorganismi patogeni, oltre ai normali processi interni di senescenza. Questi processi sono accelerati dall'aumento della temperatura causato dalla fermentazione e da danni meccanici subiti dal frutto. La produzione di diversi metaboliti, in relazione al tipo di microorganismi, il cui sviluppo è promosso dalla temperatura raggiunta dalla massa di olive stoccate e dal grado di umidità relativa, dà luogo a diversi difetti sensoriali, evidenziati maggiormente dalla diminuzione dei prodotti della cascata delle lipossigenasi responsabili di attributi positivi (Angerosa *et al.*, 2004).

Lo stoccaggio dei frutti può comportare notevoli alterazioni del profilo aromatico, con comparsa di "off-flavour", a causa della diminuzione di aldeidi ed esteri responsabili delle note positive (Kalua *et al.*, 2007).

L'effetto dei microorganismi sulla qualità e sulle caratteristiche dell'olio di oliva è sempre stato considerato come conseguenza del deterioramento dei frutti durante il periodo di sosta prima della trasformazione delle olive. Solo pochi studi sono disponibili sulla microflora spontanea di olive fresche, essa è costituita principalmente da lieviti, funghi filamentosi e batteri lattici. In un recente studio gli autori hanno verificato l'effetto della microflora delle olive sane sulle caratteristiche dell'olio durante il processo di estrazione, a tale scopo hanno intenzionalmente contaminato le olive con acqua di risulta della fase di lavaggio. L'olio ottenuto dalle olive contaminate presentano un più basso livello di composti volatili C5 derivanti dalla LOX mentre i composti C6 aumentano, tali effetti risultano più pronunciati quando la gramolazione è effettuata a 27°C anziché a 35°C, facendo supporre il coinvolgimento di reazioni enzimatiche favorite dalle differenti temperature. La principale ripercussione di tali fenomeni sul profilo sensoriale è il decremento dell'attributo "verde", possibilmente dovuto alla riduzione del 1-penten-3-one e di altri composti C5, e l'aumento della percezione del fruttato di tipo maturo (Vichi *et al.*, 2011).

Le condizioni tecnologiche durante tutta l'operazione di estrazione influiscono sulla composizione volatile dell'olio (Olias *et al.*, 1993).

La maggior parte dei composti volatili dell'olio extra vergine di oliva è prodotta nella pianta a partire dall'ossidazione enzimatica degli acidi grassi polinsaturi linoleico e linolenico (Angerosa, 2002).

Alcuni composti sono presenti nel tessuto intatto del frutto, mentre altri sono formati durante la rottura del tessuto cellulare, a causa di reazioni enzimatiche in presenza di ossigeno (Baccouri *et al.*, 2008).

La maggior parte degli aromi dell'olio si originano da una serie di reazioni enzimatiche che vanno sotto il nome di "cascata delle lipossigenasi", in conseguenza della rottura della struttura cellulare nella fase di molitura, che consiste nella rottura della parete cellulare e delle membrane mediante azioni meccaniche che provocano con la conseguente fuoriuscita dei succhi cellulari e dell'olio.

Durante questa operazione si verifica la maggior produzione di aromi rispetto a tutte le altre fasi del processo di estrazione dell'olio. Essendo l'ossigeno un co-substrato della cascata della lipossigenasi, la sua concentrazione durante la fase di frangitura influenza tutte le classi di composti volatili. Una concentrazione ridotta di ossigeno potrebbe produrre effetti positivi sulla qualità nutrizionale, attraverso un decremento dell'ossidazione fenolica e dell'alterazione delle proprietà organolettiche dell'olio.

Si è constatato, durante la frangitura, un aumento del contenuto totale di composti volatili all'aumentare della concentrazione di ossigeno fino al 10-15%, valore oltre il quale non si sono osservati ulteriori incrementi. Questo limite è specifico per ogni cultivar e stadio di maturazione, a causa probabilmente del carico di attività del sistema enzimatico lipossigenasi/idroperossido liasi e alla disponibilità di substrato. Ad esempio, ricerche di Sanchez-Ortiz *et al.* (2008) hanno dimostrato che il fattore limitante nella formazione dell'aroma nell'olio di varietà Arbequina è la disponibilità di substrato, mentre nel caso della varietà Picual esso è risultato essere il carico di attività enzimatica (a causa dell'abbondanza di acidi grassi polinsaturi presenti nella seconda cultivar).

Sembra che il solo contenuto di ossigeno disciolto nelle drupe sia sufficiente a scatenare la cascata delle lipossigenasi, con la produzione dei composti aromatici.

La riduzione dell'attività delle ossidoreduttasi endogene durante la lavorazione delle olive sembra essere di grande importanza nella lavorazione dell'oliva per la qualità organolettica e nutrizionale degli oli di oliva vergini. Il processo deve dunque essere gestito accuratamente per evitare perdita del valore nutrizionale dell'olio, ma senza incidere negativamente sulla produzione di aromi poiché, in definitiva, nella fase di frangitura un abbassamento della concentrazione di ossigeno può influenzare negativamente la produzione di aromi (Sanchez-Ortiz *et al.*, 2008).

Il tipo di frangitore influenza la qualità degli oli, modificando la composizione quali-quantitativa di alcuni costituenti minori, con conseguente influenza sulle caratteristiche organolettiche e sulla stabilità del prodotto.

Altri tipologie di frangitore sono quelli metallici di tipo continuo, che hanno maggiore capacità lavorativa e sono caratterizzati da una maggiore frantumazione della drupa. Gli organi frangenti, formati in lega metallica, possono essere a rulli oppure possono essere costituiti da martelli fissi o snodati montati su un disco metallico ruotante ad alta velocità, all'interno di una griglia forata che regola la granulometria della pasta di olive. Tra i frangitori continui, i frangitori a martelli provocano un forte effetto emulsionante sulla pasta di olive ed un incremento della sua temperatura, dovuto a fenomeni di attrito, con svantaggi sulla resa e sulla qualità dell'olio (Sacchi, 2008; Gucci *et al.*, 2004).

Prove di confronto tra frangitori a martelli ed a coltelli e frangitori a basso numero di giri hanno evidenziato un effetto interessante sia nella riduzione delle note di amaro che nella esaltazione delle caratteristiche aromatiche degli oli vergini di oliva (Gucci *et al.*, 2004). I frangitori metallici, data la loro violenza, causano una rottura più spinta delle cellule contenenti olio, che si traduce in un aumento di temperatura delle paste anche di 10 °C rispetto alle molazze (Angerosa, 2002).

Angerosa e Di Giacinto (1995) hanno confrontato il flavour degli oli ottenuti con frangitore a martelli, con frangitore a cono e con le tradizionali molazze. Oli ottenuti con frantoi a molazze risultano più aromatici ed armonici rispetto agli

altri due tipi di frangitori. Il frangitore a dischi, però, porta alla formazione di oli più ricchi in composti fenolici, più amari e più stabili all'ossidazione.

Prezioso *et al.* (2009) hanno verificato che l'impiego del frangitore metallico a coltelli non ha comportato differenze significative riguardo alle caratteristiche qualitative dell'olio rispetto al frangitore a macine di granito. Dal punto di vista organolettico, tutti i campioni di olio sono risultati poco differenziati, relativamente all'intensità delle sensazioni di amaro e di piccante, a conferma del fatto che il frangitore metallico a coltelli mobili con griglia forata potrebbe essere usato in sostituzione del frangitore a molazze.

Secondo le sperimentazioni di Olias *et al.* (1993), invece, il frangitore a molazza fornisce un più alto livello di composti volatili rispetto agli altri frangitori, soprattutto trans-2-esenale, esanale e cis-3-esenolo.

In prove condotte su cultivar Coratina e Oliarola, Servili *et al.* (2002) hanno verificato che il frangitore a coltelli fornisce oli con più alta concentrazione di aldeidi C6, come esanale e trans-2-esenale e alcuni esteri come esil acetato, 3-esenil acetato e cis-4-esenil acetato, rispetto ad oli ottenuti con frangitore a martelli. Le aldeidi citate sono correlate alla nota sensoriale erbacea, mentre gli esteri citati sono correlati alla nota floreale. L'uso di frangitore a coltelli causa anche una diminuzione di alcuni alcoli come esanolo e trans-2-esenolo, che danno una percezione odorosa simile al fieno.

Le condizioni di gramolazione influenzano il flavour dell'olio, a causa del cambiamento della concentrazione sia dei polifenoli che dei composti volatili (Angerosa *et al.*, 2004). Il tempo e la temperatura di gramolazione sono i due parametri che possono essere controllati durante il processo per cambiare potenzialmente il profilo sensoriale dell'olio. Anche il pH potrebbe influenzare la composizione dei composti volatili dell'olio, ma il suo effetto non è stato studiato ampiamente. La neutralizzazione dell'acidità della pasta di olive durante il processo potrebbe aumentare l'attività dell'alcol acetiltransferasi e promuovere la produzione di esteri volatili, responsabili dell'aroma dolce e fruttato (Kalua *et al.*, 2006).

Il contenuto in composti volatili responsabili della "nota verde", derivanti dalla cascata delle lipossigenasi, decresce progressivamente all'aumentare della temperatura di gramolazione, raggiungendo un minimo intorno a 35°C. Questo valore di temperatura è risultato essere critico per i parametri analitici, di tipicità e genuinità.

Il fattore "tempo di gramolazione" è risultato essere positivamente correlato al contenuto totale di composti volatili, ma negativamente correlato alla concentrazione fenolica totale (Ranalli *et al.*, 2001).

Maggiori tempi di gramolazione promuovono l'accumulo di alcoli e altri composti C5, in particolare esanale (Angerosa, 2002).

Tempi di gramolatura crescenti su campioni di olio della cultivar Salella hanno portato a modificazioni significative dei composti presenti nello spazio di testa, con minore percezione del fruttato nel test sensoriale, a causa della riduzione della trans-2-esenale e degli alcoli ed un netto incremento del cis-3-esenil acetato e dell'esenilacetato. L'effetto combinato del tempo di gramolazione e del volume dello spazio di testa (aria) in gramola chiusa giocano un ruolo non sempre significativo sul profilo qualitativo finale dell'olio, ove tali parametri di processo rientrano in intervalli di valori accettabili (Paduano *et al.*, 2009).

Una gramolazione protratta per tempi eccessivamente lunghi potrebbe portare ad incremento della concentrazione di esanolo e trans-2-esenolo, diminuzione notevole di esteri C6 e cis-3-esenolo, accompagnato dall'alto ammontare di 2-metil butanale e 3-metil butanale attraverso l'attivazione del pathway di conversione degli amminoacidi (Angerosa, 2002).

La temperatura di gramolazione è uno dei parametri più importanti che possono essere manipolati nel processo produttivo dell'olio vergine di oliva per ottenere i migliori attributi organolettici.

La concentrazione in composti fenolici varia significativamente in seguito a variazioni di temperature di gramolazione, a causa probabilmente del maggior rilascio di questi composti dai tessuti vegetali (soprattutto a temperature comprese fra 25 e 30 °C). L'incremento di temperatura favorisce l'attivazione di enzimi ossidativi, come polifenolossidasi, lipossigenasi e perossidasi. Quest'ultimo enzima è però quasi completamente inattivata durante la frangitura.

In definitiva, temperature superiori a 30 °C portano all'ottenimento di oli più scadenti dal punto di vista organolettico, poiché si verifica un decremento della “nota verde” e dell'aroma complessivo, a causa della inattivazione dell'idroperossido liasi, che produce composti volatili “verdi” C5 e C6 (Ranalli et al., 2001). L'appiattimento del profilo aromatico in seguito ad alte temperature di gramolazione è dovuta non solo alla perdita di composti volatili, ma anche alla disattivazione degli enzimi implicati nella formazione degli stessi composti odorosi, in particolare l'enzima idroperossido liasi (Sanchez e Harwood, 2002).

Angerosa et al. (2001) hanno studiato l'effetto congiunto del tempo e della temperatura di gramolazione sull'aroma di olio proveniente da frutti delle cv Coratina e Frantoio, evidenziando che la durata della gramolazione influenza negativamente l'ammontare totale dei secoiridoidi. Un innalzamento della temperatura, in genere causa un decremento del livello di composti volatili dalla cascata delle lipossigenasi, in conseguenza dell'inattivazione dell'idroperossido liasi (che porta all'ottenimento di esanale e cis-3-esenale a partire dagli idroperossido linoleico e linolenico, rispettivamente). Più recentemente, Kalua *et al.* (2006) hanno correlato il tempo e la temperatura di gramolazione sia alla concentrazione dei composti fenolici che ai principali composti volatili presenti nella pasta di oliva. Alcuni composti fenolici, come il tirosolo, non subiscono modificazioni a causa del tempo di gramolazione, ma risentono solo della temperatura adottata. Opposto andamento è stato dimostrato per il 3,4-DHPEA-DEDA, che mostra la massima concentrazione a tempi di gramolazione brevi.

I composti volatili sono le variabili più utilizzate per discriminare fra diversi tempi e temperature di gramolazione. È stato dimostrato che alcuni composti volatili a catena carboniosa crescente possono essere usati quali marcatori della temperatura di gramolazione: 1-penten-3-olo, cis-3-esenale e ottano possono discriminare temperature di 15, 30 e 45 °C, rispettivamente.

Il tempo di gramolazione, invece, è stato correlato a una diminuzione della lunghezza della catena: composti volatili C6 (come l'esanale) discriminano tempi più brevi (30-60 minuti), mentre composti C5 (trans-2-pentenolo) discriminano tempi più lunghi (90-120 minuti). L'esanale si può formare durante la gramolazione attraverso due vie, come dimostrato da Kalua *et al.* (2006): una via enzimatica (con alte temperature e tempi brevi) e una via non-enzimatica (a basse temperature e per tempi lunghi). Questi autori hanno ipotizzato che la formazione di esanale ad alte temperature non avviene per attività enzimatica perché a temperature così alte gli enzimi vengono disattivati. L'aumento della temperatura di gramolazione causa un decremento considerevole di esteri C6, cis-3-esenolo e metaboliti C5, ma anche un incremento in esanolo e trans-2-esenolo (Angerosa *et al.*, 2001). Un prolungamento del tempo di gramolazione causa, come precedentemente esposto, un innalzamento della quantità di esanale, uno dei componenti più importanti nella definizione dell'aroma, a causa della sua bassa soglia di percezione. La formazione di esteri C6 dal linoleico e linolenico, che contribuiscono alla percezione del “fruttato”, è influenzata più dalla temperatura che dal tempo di gramolazione.

Lo stesso comportamento si è evidenziato per i composti C5: importanti perdite si riscontrano soprattutto per il penten-3-one, legato alle sensazioni di amaro e piccante. Perciò alte temperature, soprattutto se associate a prolungata gramolazione, possono influenzare negativamente la percezione di amaro, piccante e foglia. Esse provocano anche un decremento del penten-3-one, associato alla percezione di “pomodoro”. Scarsa influenza hanno invece questi parametri

sulla sensazione di “fruttato”, in quanto la concentrazione di *cis*-2-pentenolo non subisce variazioni significative (Angerosa *et al.*, 2001).

Riassumendo, la temperatura di gramolazione è responsabile di: 1) appiattimento del profilo aromatico, 2) perdita considerevole di composti secoiridoidi, 3) diminuzione della concentrazione di esteri C6 e di *cis*-3-esenolo, 4) aumento di esanolo e *trans*-2-esenolo, 5) produzione di alte quantità di 2-metil butanale e 3-metil butanale attraverso l'attivazione della cascata di conversione degli amminoacidi (Angerosa *et al.*, 2001).

Anche la fase di estrazione può modificare l'aroma di un olio vergine di oliva, poiché durante la separazione dell'olio dal mosto oleoso può verificarsi la perdita o la modificazione di alcuni composti volatili, a seconda dell'interazione fra olio e pasta di olive (reazioni enzimatiche e chimiche) e fra olio e acque di vegetazione. Con sistemi di separazione a pressione si ottengono oli tendenzialmente più fruttati e con elevato tenore in alcoli, ma sono possibili fenomeni di fermentazione e/o degradazione dei residui sui fiscoli, che possono originare il difetto di “avvinato” o “riscaldo”(Angerosa, 2002; Sacchi, 2011).

Il sistema per percolamento fornisce oli molto aromatici e caratterizzati da elevata dotazione di aldeidi ed alcoli, mentre il più utilizzato sistema, quello a centrifuga, porta ad ottenimento di oli con minor tenore in alcoli e dal fruttato meno intenso ed armonico (Sacchi, 2011). E' stato riportato che l'utilizzo di centrifuga a due fasi, rispetto a quella a tre fasi, consente l'ottenimento di oli maggiore a concentrazione di *trans*-2-esenale e maggior contenuto aromatico totale, ma con minor tenore in pigmenti, alcoli alifatici e triterpenici, steroli e cere (Aparicio & Luna, 2002).

Gucci *et al.* (2004) hanno osservato che questi nuovi sistemi di estrazione consentono la produzione di oli simili a quelli ottenibili usando il sistema tradizionale per pressione che, se ben gestito, rappresenta ancora uno standard di riferimento nei riguardi della qualità dell'olio. Infatti è stato riportato che l'uso di centrifuga a tre fasi, probabilmente a causa dell'aggiunta di acqua calda, provoca diminuzione del contenuto di aldeidi C6, esanolo e *trans*-2-esenolo, rispetto all'estrazione per pressione (Angerosa *et al.*, 2004).

1.3 QUALITÀ E TIPICITÀ DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA

Ci sono diversi modi per definire il concetto di “qualità” di un alimento, e probabilmente non esiste un'unica definizione che soddisfa adeguatamente tutte le situazioni. In generale, la qualità è definita come “la combinazione di attributi o caratteristiche di un prodotto che ha significato nella determinazione del grado di accettabilità di quel prodotto da parte del consumatore”. La qualità di un alimento è definito dalle norme UNI-ISO 8402 come “l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite dei consumatori”. Alla base del concetto di qualità si pone la suscettibilità degli standard qualitativi, cioè la possibilità di oggettivazione e quantificazione tramite precisi metodi analitici (Cimato *et al.*, 2001).

La qualità dell'olio di oliva può essere definita sulla base di una serie di caratteri dal punto di vista commerciale, nutrizionale e organolettico. Quest'ultimo aspetto è basato sulla percezione, da parte del consumatore, dell'aroma, del gusto e del colore. L'importanza della qualità organolettica degli oli extravergine di oliva è legata alla sua unicità fra gli oli vegetali in quanto ha la peculiarità di presentare, grazie ad un processo estrattivo puramente fisico-meccanico, attributi sensoriali caratteristici, primo fra tutti la sensazione detta di “fruttato”, definito come l'insieme delle sensazioni che ricordano il frutto sano e fresco.

La normativa dell'Unione Europea (Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche l'ultima delle quali è il Reg. CE 61/2011) ha fissato gli standard qualitativi minimi che l'olio deve presentare per poter essere commercializzato con la dicitura *vergine* o *extra vergine*.

Parametri analitici non ufficiali che consentono una migliore caratterizzazione degli oli da un punto di vista qualitativo sono:

- profilo in composti volatili, responsabili del *flavour* dell'olio;
- contenuto e composizione di tocoferoli, ad azione antiossidante e vitaminica;
- contenuto e composizione di composti fenolici, che influenzano il profilo
- organolettico, la stabilità all'ossidazione, la qualità nutrizionale dell'olio;
- contenuto di pigmenti, responsabili del colore dell'olio ed in parte coinvolti nei meccanismi ossidativi.

Nel settore degli oli di oliva negli ultimi anni le problematiche legate alla qualità, genuinità e tipicità hanno acquisito un interesse crescente.

Con il termine “tipicità” si ci riferisce a un prodotto che presenta attributi propri che permangono costanti in tutti gli esemplari, e che lo rendono facilmente riconoscibile e distinguibile dagli altri.

Un prodotto tipico, inoltre, è tradizionalmente legato ad un territorio, cioè all'area geografica in cui è da tempo coltivato e trasformato secondo processi artigianali tramandati nei secoli.

Un prodotto agro-alimentare è “tipico” quando, oltre ad essere tradizionalmente legato ad un territorio e ad una materia prima particolare, presenta caratteri compositivi e sensoriali nettamente distinguibili rispetto a prodotti simili.

Per tutelare e promuovere i prodotti alimentari tipici il Regolamento CE 2081/92 ha creato il sistema noto come Denominazione di Origine Protetta (DOP), attualmente regolamentato dal Reg. CE 510/2006.

Nel panorama degli oli extravergini italiani, alla definizione di “prodotto tipico” rispondono le produzioni a Denominazione di Origine Protetta (DOP) ma anche diversi oli monovarietali la cui composizione varietale e le cui condizioni pedoclimatiche sono sufficientemente caratterizzate.

1.3.1 Composti volatili e qualità sensoriale

La valutazione della frazione volatile degli oli vergini di oliva si pone l'obiettivo di identificare e quantificare i composti chimici responsabili degli aromi mediante approccio analitico.

Negli ultimi anni c'è stata una continua evoluzione delle metodiche di estrazione della frazione volatile degli oli (**Tab. 1.2**) (Escuderos *et al.*, 2007). Attualmente le metodiche con le migliori *performances* risultano essere le tecniche che studiano i composti volatili presenti nello spazio di testa, ovvero nel volume di aria che si trova al di sopra della fase oleosa: lo spazio di testa dinamico mediante “*purge and trap*” (DHS-P/T) e lo spazio di testa statico accoppiato alla microestrazione in fase solida (SHS-SPME). La separazione dei singoli composti viene in genere effettuata mediante gas-cromatografia ad alta risoluzione (HRGC), spesso accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS) che ne consente l'identificazione.

Tabella 1.2 Evoluzione delle metodiche di estrazione della frazione volatile degli oli (Escuderos *et al.*, 2007)

Year	VOOC extraction technique	Aim of the work
1988	High-vacuum cold finger distillation	VOOC in heated olive oils
1989	Octadecyl extraction column	Bitter compounds in virgin olive oil
1993	DHS (Tenax TA)	VOOC of European olive oil varieties
1993	P/T (activated charcoal)	VOOC that contribute to green odor notes of virgin olive oil aroma
1993	DHS (Tenax TA)	Optimization of chromatographic data analysis
1995	DHS (Tenax TA)	Sensory attributes in virgin olive oil matrix and its VOOC using multidimensional scaling (MDS)
1996	DHS (Tenax TA)	Sensory attributes in virgin olive oil matrix and its VOOC using statistical sensory wheel (SSW)
1996	P/T (activated charcoal)	VOOC in musty olive oils and its evaluation during storage
1996	P/T (activated charcoal)	Effects of mixing leaves with olive fruits on the olive oil chemical and organoleptic properties
1997	DHS (Tenax TA)	Olive oil VOOC that possess organoleptic properties
1997	DHS (Tenax TA)	Sensory and chemical authentication of virgin olive oil varieties
1997	DHS (Tenax TA)	Olive oil sensory characteristics during oxidation
1998	P/T (activated charcoal)	VOOC formed in crushing and in malaxation process
1998	SFE and DHS (Tenax TA)	Selective extraction of volatile compounds directly from olive fruits and virgin olive oil
1998	P/T (activated charcoal)	Seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils
1998	DHS (Tenax TA)	Adulterations of hazelnut oil in olive oil by reversed-phase LC to GC analysis
1999	DHS (Tenax TA and ThermoTrap)	Temperature and time factors during malaxation process on the production of C ₅ and C ₆ olive oil VOOC
1999	P/T (activated charcoal)	Virgin olive oils composition of first and second extraction
1999	DHS	Varietal factors that affect the composition of olive oil C ₆ compounds from the lipoxygenase pathway
2000	P/T (activated charcoal)	Relationships between green attributes of virgin olive oil and volatile compounds
2001	SHS-SPME	Olive oil flavor analysis
2002	SHS autosampler coupled to a mass spectrometer	Discrimination of non-adulterated olive oil samples from adulterated ones
2002	SHS coupled to a mass spectrometer	Mono-varietal olive oil characterization
2003	SHS autosampler SPME (PDMS, CAR-PDMS, CW-DVB, DVB/CAR/PDMS) HSSE (PDMS fiber)	Different extraction methods for the characterization of volatile and semi-volatile compounds from virgin olive oils
2003	SHS-SPME (PDMS, CAR-PDMS, PDMS-DVB and DVB/CAR/PDMS)	SPME for the qualitative and semi-quantitative analysis of virgin olive oil aroma
2003	SHS-SPME (PDMS fiber)	VOOC from leaves, fruits and virgin olive oil
2004	SHS-SPME (50/30- μ m DVB/CAR/PDMS fiber)	Lampante virgin olive oil detection by coupling SPME and SAW sensors in tandem
2004	SHS-SPME (100- μ m PDMS fiber)	SPME for defective olive oil detection using a limited compound number related with rancidity

Tabella 1.2 *continua*

Year	VOOC extraction technique	Aim of the work
2004	SHS-SPME (50/30- μ m of DVB/CAR/PDMS fiber)	French and Spanish olive oil sample characterization by their volatile compounds
2004	DHS (Tedlar bag)	Volatile compounds produced by a virgin olive oil and "olive oil" heated to 180 and 240 °C
2004	DHS	Lampante olive oil sample detection on the grounds of the global concentration or BTEXS
2004	SHS-SPME (100- μ m PDMS)	Volatile profile of Australian virgin olive oils
2004	Gerstel TDS2 thermal extraction	Volatile composition of olive oils by a direct thermal extraction method
2005	SHS-SPME (65- μ m PDMS/DVB fiber)	Quantitative determination of the VOOC composition
2005	DHS (Carbotrap-300 and Tenax TA) SHS-SPME (100- μ m PDMS and 65- μ m PDMS/DVB fibers)	DHS thermal desorption and SPME analytical techniques for olive oil VOOC analysis
2005	P/T (activated charcoal)	VOOC from Tunisian olive cultivars
2005	DHS (Tenax TA)	Virgin olive oil sensory defects
2006	DHS (Tenax TA)	Varietal virgin olive oil characterization by quantification of its VOOC
2006	SHS-SPME (75- μ m PDMS/DVB fiber)	SHS-SPME-GC technique to discriminate between "tree-picked" and "ground-picked" olive oils
2006	SHS-SPME (50/30- μ m PDMS/CAR//DVB fiber)	SHS-SPME-GC method for monitoring VOOC in extended time-course experiments of olive oil
2006	SHS-SPME (50/30- μ m DVB/CAR/PDMS fiber)	Olive oil aroma by a sensor system based on SAW with a pre-concentration of VOOC by SPME

Poiché la valutazione della sola concentrazione delle molecole volatili non considera le complesse interazioni che possono aver luogo nel sistema olfattivo o tra il sistema olfattivo e gustativo, risulta difficile correlare i composti volatili alle percezioni sensoriali.

Indicazioni sull'intensità e identità dell'odore possono essere ricavate mediante la cosiddetta "gas-cromatografia olfattometrica" (GC-O), che necessita di un operatore addestrato a percepire le molecole odorose che vengono separate dallo strumento. Diversi autori riportano i descrittori organolettici definiti per via olfattometrica dei composti volatili rilevati negli oli di oliva (**Tab.1.3** e **Tab. 1.4**) (Angerosa *et al.*, 2004; Tura *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2005).

Tabella 1.3 Relazione tra le percezioni sensoriali e i composti volatili presenti negli oli vergini di oliva trovati da diversi autori (Tura *et al.*, 2008)

Descriptor	Chemical compound
Green notes	2-Methyl propan-1-ol; cis-2-penten-1-ol; 2-hexen-1-ol; 3-hexen-1-ol 2-Pentenal; hexanal; 2-hexenal; 3-hexenal; trans-2-octenal Pentan-3-one; 4-methyl-pentan-2-one; nonan-2-one Methyl acetate; buthyl acetate; hexyl acetate; 3-hexenyl acetate; ethyl propionate; methyl decanoate 1-Octene; ethyl furano
Olive fruity	Pentan-1-ol; 4-methyl-1-penten-3-ol; hexan-1-ol 3-methyl-butanal; 2-methyl-2-butenal; cis-2-pentenal; cis-2-hexenal; trans-3-hexenal; 2,4-hexadienal Butan-2-one; eptan-2-one; 6-methyl-5-epten-2-one; octan-2-one; nonan-2-one 3-Methyl-butyl acetate; hexyl acetate; 3-hexenyl acetate; 2-methyl-buthyl propionate; ethyl-methyl butirrate; 3,4-dimethyl-3-pentenyl furano; ethyl cyclohexanoate; methyl benzene; ethyl benzene
Apple	trans-2-Pentenal; hexanal; 3-hexenal Butan-2-one; nonan-2-one; ethyl propinate; 2-methyl-buthyl propionate
Flowers	trans-3-Hexenal
Artichoke	trans-3-Hexenal
Almond	2-Hexenal
Hay	2-Methyl-4-pentenal
Banana	cis-2-Penten-1-ol; cis-3-hexen-1-ol; 3-methyl-buthyl acetate; 3-hexenyl acetate
Sweet	4-Methyl-1-penten-3-ol; 3-methyl-butanal; hexanal Pentan-3-one; 1-penten-3-one; 4-methyl-pentan-2-one; nonan-2-one Ethyl acetate; buthyl acetate; hexyl acetate; ethyl propionate; ethyl furano
Bitter	2-Methyl-3-buten-1-ol; trans-3-hexen-1-ol; 2-methyl-4-pentenal; 2-hexenal 6-Methyl-5-hepten-2-one; 3-methyl-buthyl acetate; 2-methyl-buthyl propionate; methyl decanoate Dodecene; tridecene; ethyl benzene; phenols
Pungent	Pentan-1-ol; 2-methyl-4-pentenal; buthyl acetate; phenols

Tabella 1.4 Descrittori sensoriali di alcuni composti volatili presenti negli oli vergini di oliva trovati da diversi autori mediante tecniche olfattometriche (Angerosa *et al*, 2004)

Compound	Odour quality	Compound	Odour quality
Aldehydes		Esters	
Acetaldehyde	Pungent, sweet, floral	Methyl acetate	Ester
Propanal	Sweet, pungent, floral	Butyl acetate	Green, pungent, sweet
2-Methyl-propanal	Cooked, caramel	Ethyl acetate	Sweet, aromatic
Hexanal	Green, apple, cut grass	Ethyl propanoate	Sweet, strawberry, apple
Heptanal	Fatty	Ethyl butyrate	Cheesy, fruity
Octanal	Citrus-like, soapy	Ethyl isobutyrate	Fruity
Nonanal	Soapy, citrus-like	Ethyl 2-methylbutyrate	Fruity
Decanal	Soapy, citrus-like	Ethyl 3-methylbutyrate	Fruity
2-Methyl butanal	Malty	<i>cis</i> -3-Hexenyl acetate	Green-banana, fruity, Green, green leaves, floral, ester
3-Methyl butanal	Sweet, fruity, malty	Hexyl acetate	Sweet, fruity, floral
2-Methyl-2-butenal	Apple	3-Methylbutyl acetate	Banana
<i>trans</i> -2-Pentenal	Green, apple, floral	Methyl 2-methylbutyrate	Fruity
<i>cis</i> -2-Pentenal	Green, pleasant	Methyl decanoate	Fresh
<i>trans</i> -2-Hexenal	Bitter, almonds, green, green apple-like, fatty, bitter almond like, cut grass	Methyl nonanoate	Fruity, sweet, floral
<i>cis</i> -2-Hexenal	Green, fruity, sweet	Acids	
<i>trans</i> -3-Hexenal	Artichoke, green, floral	Acetic acid	Pungent, like acetic acid
<i>cis</i> -3-Hexenal	Green leaves, grassy, green, apple-like, leaf-like, cut grass	Propanoic acid	Aromatic, pungent
2-Octenal	Fruity, soap, fatty	Butanoic acid	Buttery, rancid
<i>cis</i> -2-Nonenal	Green, fatty	Pentanoic acid	Sweaty, pungent, putrid
<i>trans</i> -2-Nonenal	Paperlike, fatty, sharp, cut grass	Hexanoic acid	Sweaty, pungent
2-Decenal	Fatty	3-Methylbutyric	Sweaty
2,4-Hexadienal	Cut grass	2-Methylbutyric	Sweaty
2,4-Heptadienal	Fatty, nutty	Others	
2,4-Nonadienal	Deep-fried	Methylbenzene	Glue, solvent-like
2,6-Nonadienal	Cucumber-like	Ethylbenzene	Strong
2,4-Decadienal	Deep-fried	Ethylfuran	Sweet, rancid
Benzaldehyde	Almond	Dimethyl sulfide	Organic, wet earth
Phenylacetaldehyde	Pungent, phenolic	Dipropyl disulfide	Cooked meat
Ketones		Cyclopropane	Musk
Pentan-3-one	Sweet		
1-Penten-3-one	Sweet, strawberry, sharp, Pungent, green, metallic		
1-Octen-3-one	Mushroom-like		
Alcohols			
Ethanol	Alcoholic, ripe apple, floral		
Pentan-1-ol	Pungent		
Hexan-1-ol	Fruity, aromatic, soft, cut grass		
2-Methyl-propan-1-ol	Ethyl acetate-like		
2-Methylbutan-1-ol	Fish oil		
<i>cis</i> -2-Penten-1-ol	Banana		
<i>trans</i> -3-Hexen-1-ol	Fruity, fatty, pungent, cut grass		
<i>cis</i> -3-Hexen-1-ol	Banana, leaf-like, green-fruity, pungent		
<i>trans</i> -2-Hexen-1-ol	Green, grassy, fruity, fatty, pungent		
<i>cis</i> -2-Hexen-1-ol	Green fruit, green-fruity		
1-Penten-3-ol	Wet earth		

Si potrebbe anche notare che i composti volatili presenti in alte concentrazioni non sono sempre quelli che contribuiscono maggiormente all'aroma dell'olio. Infatti, c'è da dire che l'intensità di uno stimolo olfattivo è legato non solo alla concentrazione di una molecola, ma soprattutto alla sua soglia di percezione. Si parla, infatti, di *odour threshold value* (OTV) ossia della minima concentrazione di un composto capace di generare una sensazione olfattiva.

Vari fattori influenzano l'intensità della sensazione olfattiva: la volatilità, il carattere idrofobico, la forma, la struttura conformazionale delle molecole, la lunghezza della catena, l'isomeria cis-trans (gli isomeri cis mostrano un più basso *odour threshold*), la posizione dei doppi legami, il tipo e la posizione dei gruppi funzionali. A parità di concentrazione, in una miscela di composti volatili, all'olfatto sarà percepito di più il composto con OTV più basso. Il calcolo dell'OAV

è utile per identificare i composti che contribuiscono maggiormente all'aroma dell'olio. Ad esempio, il *cis*-3-esenale sembra contribuire maggiormente del *trans*-2-esenale alle “note verdi” a causa della sua più bassa soglia di percezione, nonostante sia presente in concentrazione di molto inferiore. I composti volatili che effettivamente contribuiscono all'aroma dell'olio sono quelli con un OAV>1 (**Tab. 1.5**) (Garcia-Gonzales *et al.*, 2008).

Tuttavia, la comparazione fra *threshold* odorosi è difficoltosa, in quanto per uno stesso composto volatile possono essere riscontrati diversi valori (**Tab. 1.6**) (Tura *et al.*, 2008). Queste differenze sono attribuite a diverse condizioni sperimentali, e in particolare a variazioni della matrice usata per il campionamento (Kalua *et al.*, 2007). Inoltre, la sola quantificazione dei singoli composti volatili non è sufficiente a definire il *flavour* nel suo complesso, infatti la sensazione complessiva percepita potrà risultare anche molto diversa da quella percepita dai singoli composti puri assaggiati singolarmente. Il *flavour* complessivo potrà essere caratterizzato da diverse sensazioni da ricondurre a singole molecole o gruppi di esse in certe proporzioni e concentrazioni.

Tabella 1.5 Composti volatili riscontrati nell'olio di oliva con un OAV>1 (Garcia-Gonzales *et al.*, 2008)

Sensory perception	Volatile compounds
Green fruity	<i>Z</i> -3-Hexen-1-ol, <i>Z</i> -3-hexenal, hexyl acetate, 3-hexenyl acetate, hexanal
Bitter, astringent	<i>E</i> -2-Hexenal
Green banana	2-Penten-1-ol
Almond	<i>E</i> -2-Hexenal [§]
Butter	3-Methyl-2-butanal, 2-methyl-butanal
Sweet tomato	3-Pentanone, 1-penten-3-one, ethyl propanoate
Green tomato	2-Heptanone, 2-nonanone, 1-hexanol, <i>E</i> -2-pentenal
Artichoke	<i>E</i> -3-Hexenal
Rancid	Octane, pentanal, hexanal, heptanal, <i>E</i> -2-hexenal, <i>E</i> -2-heptenal, octanal, 6-methyl-5-hepten-2-one, nonanal, <i>E</i> -2-octenal, <i>E</i> -2-decenal, nonanol; acetic, butanoic, hexanoic and heptanoic acids
Winey-vinegary	Octane, ethyl acetate, hexanal, butan-2-ol, <i>E</i> -2-hexenal, 2-methyl butan-1-ol, 3-methyl butan-1-ol; acetic, propanoic, butanoic, pentanoic and hexanoic acids
Fusty	Octane, ethyl propanoate, butyl acetate, ethyl-butanoate, hexanal, propyl butanoate, <i>E</i> -2-hexenal, 3-methyl butan-1-ol; acetic, propanoic, butanoic, pentanoic and heptanoic acids
Mustiness-humidity	Hexanal, 1-octen-3-one, 3-methyl butan-1-ol, <i>E</i> -2-heptenal, heptan-2-ol, 1-octen-3-ol

Tabella 1.6 Relazione tra le percezioni sensoriali e i composti volatili presenti negli oli vergini di oliva trovati da diversi autori e relativi *threshold* (Tura *et al.*, 2008)

Chemical compound	Sensory descriptor	Odor/taste thresholds (mg/kg)
<i>Alcohols</i>		
Ethanol	Alcohol, apple, sweet, winery	30/n.f.
2-Methyl-propan-1-ol	Green	-
3-Methyl-butan-1-ol	Sweet, undesirable, whiskey, woody, yeast	0.1/n.f.
Pentan-1-ol	Balsamic, fruity, pungent, ripe fruit, sticky, strong	0.47-3/n.f.
1-Penten-3-ol	Butter, fruity, green, hay, lawn, soft green, undesirable, wet earth	0.4/15
cis-2-Penten-1-ol	Almond, banana, fruity, grass, green	0.25/n.f.
Hexan-1-ol	Banana, fruity, soft, tomato, undesirable ^a	0.4/n.f.
trans-2-Hexen-1-ol	Apple, flowers, fruity, grass, green, leaves, sweet, undesirable ^a	5-8/30
cis-3-Hexen-1-ol	Apple, banana, fresh, grass, green, leaf	0.070-1.1-6/30
Octan-1-ol	Green, fusty, musty, sweet, waxy	0.042-0.480/2
<i>Aldehydes</i>		
2-Methyl-butanal	Apple, malty, pungent	0.0052/n.f.
3-Methyl-butanal	Apple, fruity, malty, ripe fruit, sweet	0.0054/n.f.
trans-2-Pentenal	Almond, apple, bitter, fruity, green, ripe fruit, soft fruit	0.0015-0.3/20
Hexanal	Apple, banana, grass, green, green fruit, sweet	0.004-0.02-0.08-0.4/n.f.
trans-2-Hexenal	Almond, apple, astringent, bitter, fruity, green, lawn, leaf, sweet	0.030-0.42-1.125/10
<i>Ketones</i>		
Pentan-3-one	Fruity, green, sweet	70/n.f.
1-Penten-3-one	Bitter, green, mustard, pungent, strawberry, sweet, tomato	0.001-0.013-0.050/n.f.
<i>Others</i>		
Ethyl acetate	Aromatic, bitter, fruity, pleasant, pungent, sticky, sweet, undesirable	0.005-0.94-5/100
n-Octane	Butter, sweet	0.94/n.f.
Acetic acid	Pungent, sour, strong, vinegary	0.124-0.5-10-60-522/n.f.
Phenols	Astringency, bitter, pungent, strong, sweet, walnut husk	5.5/n.f.

n.f., threshold not found.

^a An high concentration of chemical compound gives an undesirable sensory note.

Alcuni composti odorosi possono influenzare la percezione di sensazioni gustative, probabilmente a causa della confusione fra sensazioni olfattive e gustative contemporanee. Caporale *et al.* (2004) hanno infatti dimostrato l'interazione tra la percezione di amaro-piccante ed il composto chimico responsabile della nota di erba fresca appena tagliata, *cis-3-esen-1-olo*. La percezione della nota amara sembra intensificata per effetto della contemporanea presenza di odori che ricordano l'erba.

I metodi analitici non sono in grado di valutare le interazioni e i sinergismi che scaturiscono dall'interazione di più tipi di recettori. Questa limitazione può essere superata mediante l'utilizzo di metodi statistici che, ad esempio, hanno evidenziato come la concentrazione di esanale influisce fortemente sull'attributo "verde" (Angerosa *et al.*, 2004).

Al fine di correlare i composti volatili e gli attributi sensoriali, tra le analisi statistiche più utilizzate rientrano l'analisi dei componenti principali (PCA), l'analisi di regressione lineare (LRA) e l'analisi dei minimi quadrati parziali (PLS) (Angerosa, 2002; Angerosa *et al.*, 2004; Tura *et al.*, 2008).

La valutazione sensoriale per identificare e quantificare gli attributi sensoriali dell'olio è condotta in accordo con il protocollo standardizzato dal COI (Consiglio Oleicolo Internazionale) e recepito dai regolamenti comunitari in materia. Tale metodo si basa sul giudizio espresso da un gruppo (panel) di assaggiatori addestrati (8-12 giudici). Il Panel Test secondo il metodo COI è il metodo internazionale di valutazione delle caratteristiche sensoriali dell'olio di oliva vergine applicabile per la classificazione degli oli in funzione dell'intensità del "fruttato" e dell'eventuale presenza di difetti (riscaldo/morchia, muffa, avvinato, rancido, ecc). Si svolge in modo che ogni assaggiatore possa esprimere il proprio giudizio in modo indipendente compilando un "foglio di profilo" con scale non strutturate per ogni attributo secondo un vocabolario specifico. I dati ottenuti sono elaborati statisticamente dal capo panel ricavandone la mediana del fruttato e degli eventuali difetti utile per la classificazione dell'olio. Per la classificazione di un olio extravergine di oliva la mediana dei difetti deve essere pari a zero e la mediana del fruttato deve essere superiore a zero. Condizioni essenziali per l'affidabilità e la ripetibilità dei risultati sono la normalizzazione delle condizioni di assaggio e l'addestramento degli assaggiatori. Dal momento che la finalità del metodo COI è la classificazione merceologica dell'olio, questo tipo di panel test è incentrato sulla definizione degli attributi negativi (difetti); tra gli attributi positivi sono considerati

esclusivamente il fruttato, l'amaro ed il piccante, quindi, non è applicabile nei casi in cui l'obiettivo dell'analisi sensoriale sia la valutazione dei profili di tipicità. Generalmente in questi casi il foglio di profilo utilizzato dagli assaggiatori riporta un maggior numero di descrittori positivi (Ambrosino, 2006).

1.3.2 Marcatori di tipicità

L'aumentata consapevolezza dei consumatori per una maggiore qualità sensoriale ed una chiara identità geografica ha favorito lo sviluppo di prodotti con caratteristiche specifiche di tipicità; si tratta di oli di alcune regioni caratterizzati da differenti attributi sensoriali basati su oli monovarietali o con una specifica composizione varietale e una dichiarata origine geografica (DOP). In tale contesto, la possibilità di definire in modo oggettivo, non solo la genuinità ma anche la tipicità degli oli di pregio, è sempre di più una necessità sentita sia dai consumatori che dal mondo produttivo.

È un obiettivo non facile da realizzare in quanto la composizione e la concentrazione dei composti studiati nell'ambito dell'origine botanica o della varietà di olive sono spesso influenzati da diversi fattori che rendono difficoltosa l'interpretazione dei risultati. Per tale ragione, fino ad ora, sono stati considerati, per la tracciabilità dell'olio d'oliva, numerosi parametri diversi con potenziale potere discriminante. Composti che fanno parte della composizione degli oli di oliva sono considerati marker compositivi. Sono differenziati in componenti principali (acidi grassi e trigliceridi) e componenti minori (steroli, composti fenolici, composti volatili, pigmenti, idrocarburi e tocoferoli) in base alla loro presenza in oli di oliva.

I componenti maggiormente utilizzati fino ad oggi come marcatori per l'origine botanica e varietale degli oli di oliva sono stati raggruppati in **Tabella 1.7** (Montealegre *et al*, 2010).

Dal momento che un marker compositivo unico non consente la differenziazione degli oli di oliva in base alla loro origine botanica, gli indicatori compositivi più rilevanti (componenti più utili e più usati fino ad oggi) per stabilire l'origine botanica degli oli di oliva sono gli acidi grassi come oleico (O), palmitico (P), e linoleico (L); trigliceridi come POO, OOO, e OLL; steroli come sitosterolo e avenasterolo; composti fenolici come tirosolo e idrossitirosolo, composti volatili come (E)-hex-2-enale; pigmenti come luteina e β -carotene; idrocarburi C22, C25, C28, C30 e tocoferoli come α -tocopherolo. Questi marcatori compositivi hanno mostrato diversa potenzialità discriminante. In particolare, acidi grassi, trigliceridi e steroli hanno consentito la differenziazione degli oli di oliva quando analizzati mediante strumenti chemiometrici. Composti volatili, pigmenti, o composti fenolici hanno dimostrato di essere individualmente più utili per la differenziazione degli oli di oliva in base alla varietà. Tuttavia, il contenuto e la composizione di questi marcatori sono molto influenzati dalle condizioni ambientali, dal grado di maturazione dei frutti e dalla tecnologia di estrazione. Per questo motivo, nella maggior parte dei casi, sono stati utilizzati diversi parametri per ottenere la discriminazione tra gli oli di oliva a seconda della varietà. Per selezionare i parametri più utili che consentono la differenziazione degli oli di oliva in base alla loro origine sono stati utilizzati diversi strumenti chemiometrici quali *principal component analysis* (PCA), *Hierarchical clustering analysis* (HCA), *discriminant function analysis* (DA), *linear discriminant analysis* (LDA), *multivariate analysis of variance* (MANOVA), *stepwise linear discriminant analysis* (SLDA), *partial least squares-discriminant analysis* (PLS-DA), *multidimensional scaling* (MDS), *canonical discrimination analysis* (CDA), *soft independent modeling class analogy* (SIMCA), *artificial neural networks* (ANN), e *multivariate statistical analyses* (MSA). Oltre ai marcatori compositivi, dalla scoperta del DNA amplificabile dall'olio d'oliva, sono stati utilizzati diversi marcatori genetici nel tentativo di riconoscere la cultivar impiegata per la produzione. I marcatori genetici focalizzati sull'analisi del DNA hanno un migliore potere discriminante, tuttavia, questa procedura ha alcune limitazioni in quanto il DNA dell'olio è altamente degradato ed

esistono molte interferenze ed è, quindi, più difficile da estrarre dagli oli in quantità sufficiente e con alta qualità (Montealegre *et al*, 2010).

Tabella 1.7 Marcatori per l'origine botanica e varietale degli oli di oliva (Montealegre *et al*, 2010)

Marker	Compounds mainly studied	Chemical structure	Analytical technique	Chemometric treatment	Number of varieties analyzed	Geographical area of origin	Information obtained
Fatty acids	Oleic acid, O (C18:1)		GC-FID	PCA, DA, and LDA	4	Maghrebian and Peloritana areas (Sicily, Italy)	Fatty acid composition is capable to differentiate olive oils according to botanical origin and geographical area
			GC-FID	SLDA	5	PDO Nyons and PDO Vallée des Baux (France)	Construction of a data bank using fatty acid and triglyceride composition of French virgin olive oils to identify their origin
	Palmitoleic acid, Po (C16:1)		GC-FID	PCA, ANOVA, and LDA	22	Different areas of Sicily (Italy)	Qualitative similarity exists on fatty acid composition among olive oils of different olive variety
			GC-FID	DA	7	Different areas of Extremadura (Spain)	Fatty acid contents vary among monovarietal olive oils
	Palmitic acid, P (C16:0)		GC-FID	MANOVA, PCA, HCA, MSA, and LDA	4	Sicily (Italy)	Fatty acid composition is related with some cultivars grown in a well-limited geographical region
			GC-FID	LDA, PCA, and ANN	5	Sabina, Lazio (Italy)	Olive oil differentiation according to their olive variety is achieved using some fatty acids and sterols analyzed
	Linoleic acid, L (C18:2)		GC-FID	ANOVA	2	Five different areas of Chania region (Crete)	Fatty acid composition shows significant potential for olive oil classification according to botanical origin and location
			GC-FID	MANOVA, PCA, and HCA	3	Tras-os-Montes PDO (Portugal)	Fatty acid composition allows differentiation of three olive varieties of a specific PDO oil
	Linolenic acid, Ln (C18:3)		GC-FID	ANOVA, PCA, and DA	4	Montes de Toledo PDO (Castilla-La Mancha) and others (not specified)	Total fatty acids and several combinations of triglycerides are selected for satisfactory classification of four Spanish virgin olive oil varieties studied
			GC-FID	LDA	3	Beira Baixa Region (Portugal)	Stearic acid, campesterol, total sterol and oxidative stability are the most discriminating variables in an olive oil
	Stearic acid, S (C18:0)		GC-FID	PCA and ANOVA	7	Sardinia (Italy) and Corsica (France)	The ratio between oleic and linoleic acid shows the most variation among the different monovarietal olive oils
			GC-FID	PCA and ANOVA	5	Tunisia and Sicily (Italy)	Fatty acid composition change according to the olive variety and the ripening degree of the olives
	Eicosenoic acid, E (C20:1)		GC-FID	Not used	14	Sfax (Tunisia)	Fatty acid composition are useful for distinguish the monovarietal olive oils belonging to particular cultivars
			GC-FID and ¹³ C-NMR	PCA, HCA, DA, and ANOVA	4	Apulia region (Italy)	Fatty acid and triglyceride composition allow to distinguish olive varieties in olive oils better than sterols composition
MS			LDA	3	Different regions of Spain	Fatty acid and phenolic composition variables allow to predict the olive variety in olive oils	
Triglycerides		HPLC-RID	SLDA	5	PDO Nyons and PDO Vallée des Baux (France)	Construction of a data bank using fatty acid and triglyceride composition of French virgin olive oils to identify their botanical origin	
		HPLC-RID	ANOVA, PCA, and DA	4	Montes de Toledo PDO (Spain) and others (not specified)	Several combinations of triglycerides and total fatty acids variables are selected for a satisfactory classification of four Spanish monovarietal olive oils studied	
		HPLC-RID	PCA and ANOVA	7	Sardinia (Italy) and Corsica (France)	Triglyceride composition is particularly useful in discriminating monovarietal olive oils	
		HPLC-RID	Not used	14	Sfax (Tunisia)	Triglyceride profile helps to classify and characterize monovarietal olive oils. Triglyceride composition shows variations among samples from different monovarietal olive oils.	
		HPLC-RID	Not used	4	Tataouine region (Tunisia)	Triglyceride composition is an useful parameter to discriminate between olive varieties in olive oils	
		HPLC-RID	ANOVA and LDA	7	Different areas of Extremadura (Spain)	Some triglyceride contents allow the differentiation among olive varieties in olive oils	
		HPLC-RID	ANOVA, PCA and CDA	2	Different areas of Chania region (Crete)	Triglyceride composition allows the differentiation of the two olive varieties examined	
		HPLC-RID	PCA and SIMCA	2	Cáceres (Spain)	Triglyceride composition, better than sterol composition, makes possible the characterization of olive oils obtained from a specific type of olives	
		HPLC-RID and ¹³ C-NMR	PCA, HCA, DA, and ANOVA	4	Apulia region (Italy)	Fatty acid and triglyceride composition allows to distinguish olive varieties in olive oils better than the sterol composition	
		HPLC-ELSD	PCA and ANOVA	5	Tunisia and Sicily (Italy)	Triglyceride content shows variations among monovarietal olive oils from different cultivars	
		HPLC-MS	PCA, DA, and LDA	3	Sicily (Italy), Umbria (Italy), Toscana (Italy), and Greece	Triglyceride and sterol composition allows to predict/classify olive oils with different botanical origin	

Tabella 1.7 continua

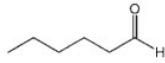
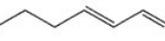
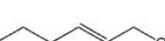
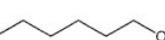
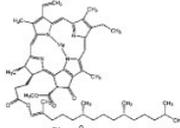
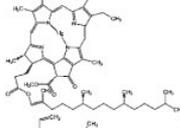
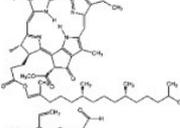
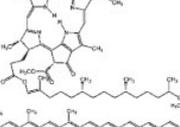
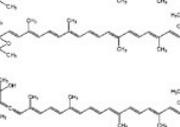
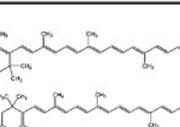
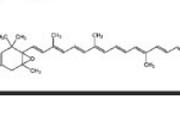
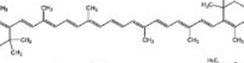
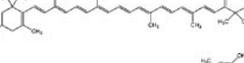
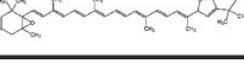
Marker	Compounds mainly studied	Chemical structure	Analytical technique	Chemometric treatment	Number of varieties analyzed	Geographical area of origin	Information obtained
Volatile compounds	Hexanal		GC-FID	Not used	7	Spain and Greece	Oils from some varieties cultivated in Spain and Greece show contents of volatiles very similar to those detected in the oils of the same varieties cultivated in Italy
			GC-FID	SLDA and PCA	2	Different regions of Tunisia	Hexyl acetate, hexanal, and (<i>E</i>)-hex-2-enal concentrations and the total concentration of ketones allow the correct classification of olive oils according to their olive variety
	(<i>E</i>)-Hex-2-enal		GC-FID	Test Kolmogorov-Smirnov and HCA	18	Garda lake (Italy)	Olive oils with genetic similarity present similar volatile profile
	(E)-Hex-2-enol		GC-FID	SLDA and HCA	9	Different producers countries	Volatile compounds cluster varieties native to the same country but this is not enough to qualify all the oils from a country
			GC-FID and GC-MS	ANOVA and PCA	4	Tataouine region (Tunisia)	The level of (<i>E</i>)-hex-2-enal shows variability from one variety to another grown in the same environmental conditions
	Hexanol		GC-FID and GC-MS	ANOVA and PCA	6	Tunisia, Greece, Spain, Italy, and Algeria varieties planted in Sfax (Tunisia)	Monovarietal olive oils tested show different volatile profiles
			GC-FID and GC-MS	PCA	11	Tunisia and France	The percentage of volatile compounds from oils of different varieties is different and genetic factors and the geographic region also influence the volatile production
			GCxGC-MS	ANOVA, PCA, and statistical image treatment	3	Portugal	Volatile composition allows the identification of olive varieties as well as the extraction technologies used to produce olive oils
Pigments	Chlorophyll a		HPLC-DAD	ANOVA, MSA, and AD	5	Different regions of Spain	Pigment composition allows classification of oils according to their monovarietal origin, the degree of ripeness, and the oil storage
	Chlorophyll b		HPLC-DAD	Not used	3	Sicily (Italy)	The ratio of lutein/ β -carotene allows differentiation of monovarietal olive oils
	Pheophytin a		HPLC-DAD	Not used	2	Catalonia (Spain)	The pigment content and pigment retention is different with respect to the olive variety. All the pigments in the fruit are transferred to the oils
	Pheophytin b						
	Lutein		HPLC-DAD	ANOVA and PCA	6	Different regions of Italy	The composition of the pigment fractions shows significant quantitative differences in different monovarietal olive oils
	Violaxanthin						
	Neoxanthin						
Pigments	β -Carotene		HPLC-UV and HPLC-LIF	PCA and HCA	12	Different regions, not specified	Pigment composition allows the distinction of olive varieties in olive oils
	β -Cryptoxanthin		UV-Vis spectrophotometry	PCA and ANOVA	7	Sardinia (Italy) and Corsica (France)	Carotenoid and chlorophyll content determined by spectrophotometry does not contribute to discriminate oils produced from different olive varieties
	Luteoxanthin						

Tabella 1.7 *continua*

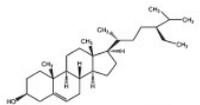
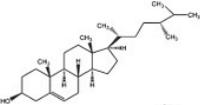
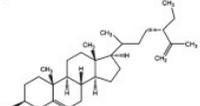
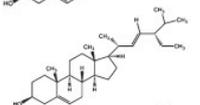
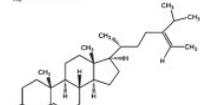
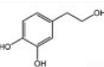
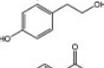
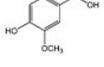
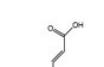
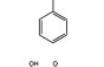
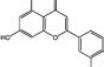
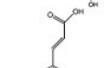
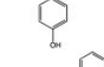
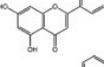
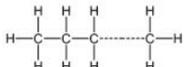
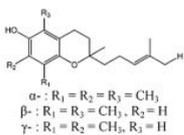
Marker	Compounds mainly studied	Chemical structure	Analytical technique	Chemometric treatment	Number of varieties analyzed	Geographical area of origin	Information obtained
Sterols	β -Sitosterol		GC-FID	LDA, PCA, and ANN	5	Sabina, Lazio (Italy)	Olive oil differentiation according to its olive variety is achieved using some fatty acids and sterols analyzed
	Campesterol		GC-FID	MANOVA, PCA, and HCA	3	Tras-os-Montes PDO (Portugal)	Sterol composition allows a significant differentiation of olive varieties of a specific PDO oil although is worse than with other chemical parameters such as fatty acids
			GC-FID	LDA	3	Beira Baixa Region (Portugal)	Stearic acid, campesterol, total sterol and oxidative stability are the most discriminating variables in an olive oil
	Clerosterol		GC-FID	PCA, HCA, DA, and ANOVA	4	Apulia region (Italy)	Sterol composition is worse than triglyceride and fatty acid composition to differentiate olive varieties in olive oils
	Stigmasterol		GC-FID	PCA and SIMCA	2	Cáceres (Spain)	Sterol composition is worse than triglyceride composition to differentiate olive oils obtained from specific olives
	Δ^5 -Avenasterol		HPLC-MS	PCA, DA, and LDA	3	Sicily (Italy), Umbria (Italy), Toscana (Italy), and Greece	Triglyceride and sterol composition allows to predict/classify olive oils with different botanical origin
Phenolic compounds	Hydroxytyrosol		HPLC-DAD	LDA	4	Different regions of Spain	Some phenolic compounds contents allow to classify monovarietal Spanish virgin olive oils
	Tyrosol						
	Vanillic acid						
	Cinnamic acid						
	Luteolin						
	p-Coumaric acid						
	Apigenin						
	Pinoresinol						
	Oleuropein						
		HPLC-DAD	LDA	4	Toledo and Ciudad Real (Spain)	Concentrations of many phenolic compounds differed significantly among the main Spanish virgin olive oil varieties	
		HPLC-DAD	ANOVA, PCA, SIMCA, and PLS-DA	6	Izmir (Turkey)	Distribution of phenols allow to differentiate olive cultivars when the harvest season is well established	
		HPLC-DAD and HPLC-MS	PCA and ANOVA	7	Sardinia (Italy) and Corsica (France)	Monovarietal olive oils are not differentiated by minor components such as tocopherols, phenolic compounds, and pigments.	
		HPLC-DAD and HPLC-MS	PCA and ANOVA	5	Tunisia and Sicily (Italy)	Variation in the concentration of phenolic compounds in monovarietal olive oils could be a consequence of different irrigation conditions	
		-	Not used	14	Sfax (Tunisia)	Triglycerides, fatty acids, phenolic compounds, and tocopherol composition allow the differentiation among olive oils from different varieties cultivated in the same pedoclimatic conditions	
		HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS/MS	Not used	18	Different areas of Portugal	Phenolic profiles are characteristic of some olive varieties in olive oils, when olive fruits are examined, even with different maturation degree and geographical origin	
		MS	LDA	3	Different regions of Spain	The fatty acid and phenolic composition variables allow to predict the olive variety in olive oils	

Tabella 1.7 *continua*

Marker	Compounds mainly studied	Chemical structure	Analytical technique	Chemometric treatment	Number of varieties analyzed	Geographical area of origin	Information obtained
Hydrocarbons	n-Alkanes: C21 – C35 (C30, C28, C25, C22)		CG-FID	PCA and ANOVA	5	Tunisia and Sicily (Italy)	Squalene is the major olive oil hydrocarbon and its content depends on the olive variety
			GC-FID	MANOVA and DA	7	Different regions of Extremadura (Spain)	Some hydrocarbon contents (n-alkanes, n-alkenes, and sesquiterpenes) are capable of differentiating olive varieties in olive oils
			GC-FID	LDA and ANOVA	3	Istria (Croatia)	The n-alkane profile allows olive variety identification in olive oils depending on the year of production
Tocopherols	α -, β -, γ - Tocopherol	 α -: R ₁ = R ₂ = R ₃ = CH ₃ β -: R ₁ = R ₃ = CH ₃ , R ₂ = H γ -: R ₁ = R ₂ = CH ₃ , R ₃ = H	HPLC-DAD and HPLC-FLD	MANOVA, PCA, and HCA	3	Tras-os-Montes PDO (Portugal)	The total tocopherol content and the α - and γ - tocopherol individual content allow the differentiation of the varieties present in the olive oils
			HPLC-FLD	PCA and ANOVA	7	Sardinia (Italy) and Corsica (France)	α -Tocopherol content does not appear to be dependent on the varietal origin of oils
			HPLC-DAD	PCA and ANOVA	5	Tunisia and Sicily (Italy)	Five monovarietal olive oils analyzed behave differently according to the variety, irrigation time, and olive ripening
			HPLC-DAD	Not used	14	Sfax (Tunisia)	Triglycerides, fatty acids, phenolic compounds, and tocopherol composition allow the differentiation among olive oils from different varieties cultivated in the same pedoclimatic conditions
			HPLC-LIF	LDA	4	Different regions of Spain	The α -tocopherol content is very similar for all the olive varieties studied, except for Arbequina variety

Tecniche innovative, come la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare protonica (¹H-NMR) unita ad analisi statistica multivariata, sono state applicate per la prima volta da Sacchi *et al.* (1998) allo scopo di caratterizzare oli extravergine di oliva provenienti da diverse regioni italiane.

Anche la spettroscopia ¹³C-NMR è stata applicata agli oli vergini di oliva per discriminare le cultivar e l'area geografica di origine. Vlahov *et al.* (2003) hanno usato questa tecnica per classificare oli provenienti da tre aree della Puglia a denominazione di origine protetta (Terra di Bari, Colline di Brindisi e Dauno), dimostrando la correttezza dell'assegnazione dei campioni ai loro rispettivi gruppi, tranne che per la DOP Dauno. Gli oli DOP Dauno sono stati classificati non correttamente a causa della composizione varietale simile a quelli Terra di Bari, dimostrando una forte dipendenza della classificazione dai fattori colturali.

Il profilo sensoriale è di certo una caratteristica tipizzante: le note di amaro e piccante, determinate dalla componente biofenolica dell'oliva, i diversi sentori vegetali (erbaceo, pomodoro, carciofo, erbe aromatiche, mandorla) influenzati dalla composizione delle molecole volatili di impatto sensoriale originate dal metabolismo primario e secondario dell'oliva. Le biogenesi dei diversi componenti di impatto sensoriale dell'olio extra vergine sono da attribuire all'oliva che li produce in diverse situazioni ambientali, di stress biotico e abiotico e in diverse condizioni agronomiche: l'individuare quindi questi marcatori molecolari della tipicità potrebbe fornire un utile strumento di difesa delle produzioni nazionali di pregio affiancando all'analisi sensoriale metodiche strumentali di misura oggettiva della qualità-provenienza dell'olio (<http://www.teatronaturale.it>; Sacchi *et al.*, 2010).

Profili compositivi capaci di consentire una rintracciabilità di alcune produzioni a DOP italiane, con particolare riferimento alle molecole volatili di forte impatto sensoriale, risultano, ad esempio, quelli caratterizzanti le tipiche note di rosmarino-erbe aromatiche degli oli della "Penisola Sorrentina" ottenuti dalla varietà Minucciola, o di erba-pomodoro verde caratteristiche degli oli Irpini ottenuti dalla tradizionale varietà Ravece (Sacchi *et al.*, 2010). Tura *et al.* (2008) da uno studio condotto su 18 cv del lago di Garda, hanno evidenziato che gli attributi sensoriali principalmente dipendenti dalla cultivar sono il "fruttato", "floreale", "banana", "mela", "noce", "fieno", "dolce".

Oli provenienti da regioni diverse mostrano differente concentrazione di composti volatili: uno studio su oli extravergini italiani, spagnoli e marocchini ha confermato la ricchezza in composti volatili C6 degli oli italiani, ma ha mostrato che essi sono poveri in esteri che danno la nota "fruttata". Questi ultimi, etil isobutirrato, etil butirrato, etil 2-metilbutirrato, etil 3-metilbutirrato ed etil cicloesilcarbossilato, sono molto presenti in oli provenienti dal Marocco (Kalua *et al.*, 2007).

Terpeni quali marcatori di tipicità

Tramite l'analisi HS-SPME/GCMS della frazione volatile sono stati identificati nell'olio alcuni idrocarburi monoterprenici e sesquiterprenici. Sebbene presenti in minime quantità nell'olio extravergine di oliva, essi mostrano un'alta differenziazione dipendente dalla varietà e dall'area geografica di produzione (Vichi *et al.*, 2006).

A differenza di altri composti volatili presenti negli oli vergine di oliva, che possono essere influenzati da fattori tecnologici durante la lavorazione delle olive, la presenza di idrocarburi terpenici è condizionata essenzialmente dalla varietà e dalle condizioni di coltivazione dell'olivo. La presenza di alcuni composti terpenici, come α -copaene ed α -murolene, possono essere considerati come "tipici" per oli provenienti dalla macroarea Italia (Zunin *et al.*, 2005).

In oli ottenuti da olive della varietà Chetoui, coltivate in Tunisia, Temime *et al.* (2006) hanno identificato tra i maggiori composti volatili, oltre alle aldeidi, alcoli, chetoni ed esteri, anche idrocarburi mono- e sesqui-terpenici.

Il ruolo di questi composti nella definizione dell'aroma dell'olio non è ancora chiaro, ma secondo alcuni autori potrebbero importanza nel suo profumo (Vichi *et al.*, 2003). Le dimostrate capacità antimicrobiche verso molti microorganismi (Kubo *et al.*, 1995) fanno però ipotizzare un ruolo significativo nella difesa contro alcuni agenti patogeni. Questi risultati non sono importanti solo per la possibilità di sviluppare nuove tecniche di lotta biologica o di definire nuovi principi attivi che interagiscano sul riconoscimento pianta-insetto, ma possono essere utili anche per la comprensione dei meccanismi evolutivi delle piante, che hanno sviluppato differenti composti volatili in relazione alla pressione selettiva dell'ambiente.

Una pianta cresciuta ed evolutesi in un areale ben definito, possiede un corredo di composti organici volatili differente da piante coltivate nei secoli o millenni in altri luoghi.

Con particolare riferimento all'olivo, si potrebbe ipotizzare che la differenza in composti volatili fra cultivar diverse sia da attribuire all'interazione della pianta con gli agenti biotici e abiotici che si sono co-evoluti con essa. Ad esempio, una maggiore o minore presenza di composti fenolici potrebbe essere risultato di maggiore o minore disponibilità idrica in quell'areale, come anche la maggiore o minore presenza della mosca olearia o dei suoi nemici naturali, ecc. L'allele che fa esprimere un particolare composto chimico volatile, e che ha effetto di richiamo verso i parassitoidi nemici naturali della mosca, potrebbe essersi fissato nella progenie a causa del suo vantaggio evolutivo rispetto alle altre piante, portando alla conseguente formazione di una nuova varietà da cui si ricava un olio con un profilo aromatico dell'olio ben riconoscibile (tipico).

1.4 L'OLIO NELLE PREPARAZIONI ALIMENTARI

Nel corso degli anni le numerose evidenze di fattori addizionali alla base della relazione esistente fra nutrizione e malattie croniche invalidanti hanno portato gli studiosi a ricercare il modello di alimentazione più idoneo al mantenimento di un buono stato di salute. E' ben noto, infatti, che l'alimentazione è in grado di modificare sostanzialmente il profilo di rischio di un soggetto in prevenzione primaria e/o secondaria. Diversi modelli di dieta si sono imposti all'attenzione pubblica, ma quella che ha ottenuto più interesse è sicuramente la Dieta Mediterranea.

Il concetto di dieta Mediterranea risale agli anni '60, quando il nutrizionista americano Ancel Keys coniò questo termine in seguito ai risultati del *Seven Countries Study* che dimostrarono che le popolazioni (Italia e Grecia) che si affacciavano nel bacino del Mediterraneo presentavano una ridotta incidenza di malattie cardiovascolari e tumorali in confronto con le altre popolazioni studiate. Si sono poi succeduti numerosissimi studi epidemiologici sulla Dieta Mediterranea condotti in tutte le parti del mondo e da molti organismi scientifici di diversa natura.

Sofi *et al.* (2008) hanno condotto la prima meta-analisi presente in letteratura che ha preso in considerazione la possibile associazione tra aderenza alla dieta Mediterranea, calcolata attraverso uno specifico punteggio, ed eventi clinici maggiori come mortalità e incidenza di patologie cronico-degenerative.

Lo scopo dello studio è stato quello di effettuare una revisione sistematica di tutti gli studi prospettici che hanno valutato la relazione tra l'aderenza alla dieta Mediterranea attraverso e lo stato di salute. Dall'analisi e l'integrazione delle informazioni derivanti dai 12 studi più significativi e robusti dal punto di vista epidemiologico (6 su popolazioni Mediterranee, 5 su popolazioni Nord Americane, 1 su una popolazione Australiana), è stato dimostrato come la maggiore aderenza alla dieta mediterranea è associata ad un significativo miglioramento dello stato di salute, in particolare riduce significativamente la mortalità generale (9%), la mortalità per malattie cardiovascolari (9%), l'incidenza di o la mortalità per tumore (6%), l'incidenza del morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer (13%) (Sofi *et al.*, 2008).

Numerosi studi hanno evidenziato che l'olio extravergine di oliva (VOO) è il principale fattore responsabile degli effetti benefici nutrizionali e salutistici della Dieta Mediterranea (Garcia-Gonzales *et al.*, 2008; Frankel, 2011).

Il modello alimentare della dieta mediterranea rappresenta un insieme di competenze, conoscenze, pratiche e tradizioni che vanno dal paesaggio alla tavola, includendo le colture, la raccolta, la pesca, la conservazione, la trasformazione, la preparazione e, in particolare, il consumo di cibo. Nel 2010, a seguito della candidatura proposta congiuntamente da Spagna, Grecia, Italia e Marocco, è stata incisa nella Lista Rappresentativa del patrimonio culturale immateriale dell'umanità dell'UNESCO. La dieta mediterranea è caratterizzata da un modello nutrizionale che è rimasto costante nel tempo e nello spazio, costituito principalmente da olio di oliva, cereali, frutta fresca o secca e verdure, una moderata quantità di pesce, latticini e carne, e molti condimenti e spezie, tutto accompagnato da vino o infusi, sempre in rispetto alle tradizioni di ogni comunità (www.unesco.it).

Un consumo regolare di olio d'oliva, come nella tradizionale dieta mediterranea, ha proprietà terapeutiche; noti fin dall'antichità sono inoltre i suoi usi a livello topico e come nutraceutico.

Molto è stato detto circa l'effetto protettivo di olio d'oliva sulle malattie cardiovascolari. Oggi, i risultati di studi che riguardano la bassa incidenza di queste malattie e l'assunzione giornaliera di olio di oliva sono più che evidenti. Inoltre, dal momento che sono state messe in evidenza le proprietà antiossidanti e la biodisponibilità dei suoi micro-costituenti, sono state ampiamente studiate ulteriori proprietà salutari. Gli studi attuali sono incentrati sulla relazione tra consumo di olio d'oliva e malattie come il cancro, il diabete o il declino cognitivo (Tab. 1.6) (Garcia-Gonzales, 2008).

Evidenze scientifiche dimostrano veri e propri effetti di tipo farmacologico di alcuni componenti dell'olio di oliva ad azione anti-infiammatoria, antitumorale, anticolesterolo, antiartritica, antitrombotica, ipotensiva, digestiva, neuroprotettiva (**Tab.1.8**) (Garcia-Gonzales *et al.*, 2008).

Tabella 1.8 Effetti benefici sulla salute in relazione alla dieta ricca in olio di oliva (García-Gonzales *et al*, 2008)

Facts
Epidemiological studies relate olive oil and primary prevention of cardiovascular diseases.
It has been proven to reduce plasma TAG and increase HDL-cholesterol levels.
It has been proven to improve the postprandial lipoprotein metabolism. An endothelial-dependent vasodilatation and inflammatory response has been demonstrated.
It has been proven to reduce blood pressure and the risk of hypertension.
The anti-carcinogenic effect of olive oil has been proven in animal models and in human cell lines.
There is experimental evidence on the beneficial effect of olive oil in different steps of carcinogenesis.
The diet does not promote obesity while it increases the lipolytic activity in adipose tissue.
There is evidence that olive oil prevents age-related cognitive decline and dementia.
Evidence suggests an increase in survival and overall longevity with a diet rich in oleic acid.
Olive oil phenols are bioavailable in humans.

L'olio extravergine d'oliva trova impiego in molte preparazioni alimentari contribuendo in modo considerevole a definirne i caratteri qualitativi, nutrizionali e sensoriali (Fig.1.6).

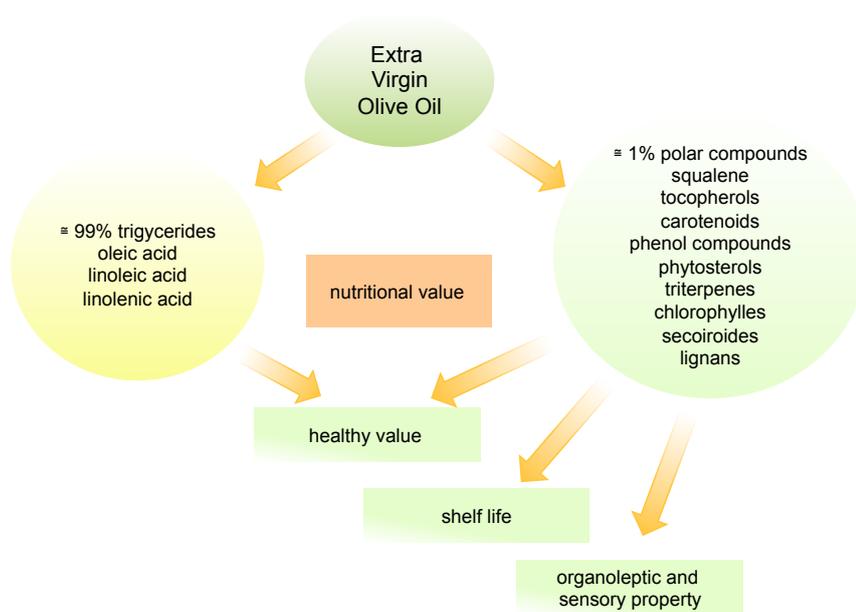


Figura 1.6 Caratteri dell'olio di oliva (AA.VV., 2009)

Tali effetti sono dovuti alla sua composizione lipidica particolarmente equilibrata tra acidi grassi insaturi e saturi, in cui l'acido grasso prevalente è un acido grasso monoinsaturo (l'acido oleico) e con un appropriato contenuto in acidi grassi polinsaturi essenziali (acido linoleico e linolenico), ma anche alla sua composizione in composti minori derivante dal frutto dell'olivo e che si ritrovano nell'olio grazie alla tecnica estrattiva esclusivamente meccanica ed a basse temperature (Fig 1.7). Alcune di queste sono sostanze a spiccata attività antiossidante, come gli orto-difenoli, i tocoferoli, i carotenoidi e lo squalene. Per tutti questi motivi è l'olio vegetale più stabile all'ossidazione, è idoneo sia

nelle preparazioni a crudo che in cottura e, grazie al suo contenuto in sostanze che possono esplicare importanti funzioni metaboliche, può essere considerato un vero e proprio *functional food* (Sacchi, 2008; Stark & Madar, 2002).

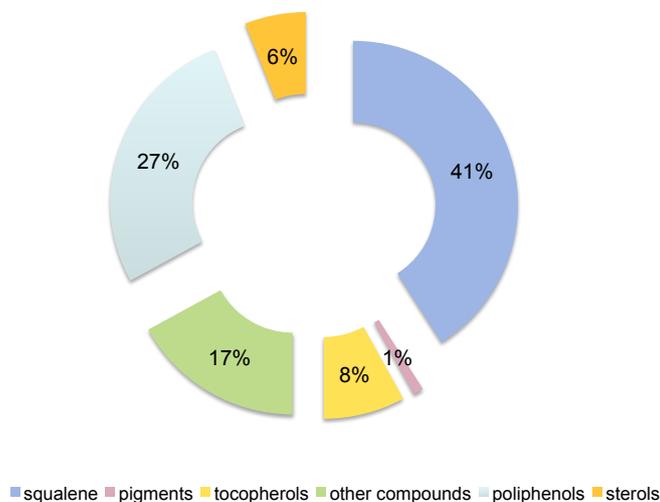


Figura 1.7 Composizione percentuale dei composti minori dell'olio extravergine di oliva

L'olio extravergine di oliva, oltre ad essere considerato un condimento di grande pregio nutrizionale, è anche un prodotto alimentare dai connotati edonistici particolarmente importanti ricco di carica sensoriale, caratteristiche queste che lo rendono unico tra gli oli vegetali. Il primo impatto del nostro organismo con un alimento è legato, infatti, alle sue caratteristiche organolettiche: colore, odore, e in seguito, sapore. Questo è valido anche per l'olio di oliva extravergine, soprattutto se si pensa che l'olio contribuisce al patrimonio organolettico di una preparazione gastronomica e influisce, positivamente o negativamente, sulla sua accettabilità globale (Gasparoli & Fedeli, 1997; Giomo, 1999).

Grazie al suo contenuto in sostanze a forte impatto sensoriale sia sull'olfatto che sul gusto (aromi, composti fenolici), che contribuiscono alla complessità olfatto-gustativa delle preparazioni gastronomiche, può essere definito un vero e proprio "profumo alimentare" (Sacchi, 2008). L'aroma è composto da diverse classi di sostanze chimiche naturali (aldeidi, alcoli, esteri, chetoni, terpeni, ecc.) che, nel loro complesso e nel loro equilibrio, danno luogo alle sensazioni olfattive identificate con i termini di fruttato, erbaceo, vegetale, floreale, mandorlato, ecc. percepite con varia intensità. L'olio extravergine è caratterizzato da un tipico gusto amaro e da una sensazione piccante-pungente più o meno pronunciati dovuti principalmente ai composti fenolici antiossidanti tipici dell'oliva (secoridoidi, derivanti dall'oleuropeina) ma anche da alcuni composti volatili che interagiscono con i recettori del gusto e le terminazioni del nervo trigemino localizzate all'interno della cavità boccale (Sacchi, 2008).

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi sulle interazioni olio/alimento che si verificano nel corso della preparazione di un prodotto alimentare. In particolare, ricerche focalizzate sul ruolo della componente ad attività antiossidante hanno evidenziato come queste possono perdersi in parte o del tutto con il riscaldamento, soprattutto se prolungato, o interagire con gli altri ingredienti esplicando la loro funzione protettiva nei confronti di stress termici ed ossidativi. Gli antiossidanti fenolici tendono a migrare dall'olio verso la fase acquosa della matrice alimentare, in tale azione si modificano in maniera progressiva esplicando fino ad esaurimento l'azione protettiva contro l'ossigeno ed i radicali liberi contenendo la degradazione degli altri componenti del sistema. Ad esempio, è stato verificato che tale effetto in tonno in scatola sott'olio extravergine di oliva protegge gli acidi grassi polinsaturi del pesce (acidi grassi

omega-3) dall'ossidazione (Sacchi *et al.*, 2002); è stato dimostrato che arrostitire la carne con un velo di olio extravergine di oliva (carne marinata) protegge le proteine della carne impedendo che si degradino dando origine a prodotti potenzialmente tossici e cancerogeni (ammine eterocicliche) (Monti *et al.*, 2001); recenti studi hanno dimostrato come vi sia, soprattutto nel corso della cottura olio/pomodoro, uno scambio di sostanze benefiche (antiossidanti) tra le due matrici aumentandone l'attività antiossidante e la biodisponibilità (Pernice *et al.*, 2007).

Le conserve sono fra i più tradizionali e tipici prodotti in cui l'uso dell'olio extravergine d'oliva come liquido di copertura determina una trasformazione del prodotto, ciò che si ottiene è un matrice alimentare complessa diversa dalle singole componenti originarie. Un ulteriore impiego è nella produzione dei "gourmet oils" (oli aromatizzati) usati come condimento o esaltatori di sapidità ottenuti da erbe e spezie mediterranee aggiunte ad una base oleosa.

1.4.1 Le conserve vegetali sott'olio

La conservazione degli alimenti, è sempre stata fin dall'antichità, una delle maggiori preoccupazioni dell'uomo, per riuscire a conservare i cibi più a lungo nel tempo e quindi di averli sempre a disposizione anche a distanza di diversi mesi, o anni dal suo reperimento, fossero essi prodotti animali, come le carni ed il pesce o vegetali, come le verdure e la frutta.

Le più svariate tecniche di conservazione hanno lo scopo finale di ritardare o impedire ad enzimi e batteri di crescere e di iniziare processi di deterioramento del cibo.

Ortaggi e frutta costituiscono per l'uomo una ricca fonte di zuccheri prontamente assimilabili, sali minerali, vitamine, microelementi e devono pertanto rappresentare una quota importante della dieta alimentare. Una delle maggiori problematiche legate a questa tipologia di alimenti è il mantenimento nel tempo delle loro preziose caratteristiche nutrizionali e organolettiche, essendo di per sé, nella maggior parte dei casi, prodotti che a temperatura ambiente, una volta acquistati, hanno una conservabilità relativamente ridotta.

La finalità principale dell'industria delle conserve è quello di mettere a disposizione del consumatore, in ogni luogo e in ogni stagione, degli alimenti la cui produzione è localizzata nello spazio e nel tempo (stagionalità di alcuni prodotti); permettere la regolazione su più anni dell'approvvigionamento dei mercati per quegli alimenti la cui produzione è irregolare da un anno all'altro, rispondere alle esigenze della vita moderna offrendo al consumatore prodotti pronti all'uso o consumabili con un minimo dispendio di tempo (Sinelli N., 2008).

Lo scopo principale di produrre una conserva vegetale è pertanto quello di allungare il tempo di conservazione di un alimento che allo stato naturale (verdura o frutta fresca) è abbastanza relativo.

In sostanza l'uomo ha da sempre avuto la necessità di ottenere alimenti *stabili* nel tempo, tanto che oggi si parla di "stabilizzazione degli alimenti". Un alimento sottoposto a un trattamento stabilizzante mantiene inalterate per un determinato periodo di tempo, e a determinate condizioni di conservazione, le caratteristiche chimiche, fisiche, nutrizionali e microbiologiche presenti nel prodotto appena ottenuto. Le tecniche di conservazione hanno quindi lo scopo di prevenire e/o rallentare i cambiamenti della struttura, delle caratteristiche sensoriali e del valore nutritivo dei cibi.

Nel corso del tempo si è passati da metodi di conservazione empirici a tecniche sempre più avvalorate da conoscenze scientifiche, man mano che la microbiologia e la tecnologia alimentare prendevano sviluppo.

Attualmente, le tecnologie alimentari mettono a disposizione del produttore diversi mezzi per aumentare la conservabilità degli alimenti.

Nel settore degli alimenti vegetali tali tecniche si possono ottenere con:

mezzi fisici: basati sull'azione del calore (per esempio, vegetali al naturale in scatola), sull'applicazione delle basse temperature (per esempio, verdure surgelate), sulla riduzione controllata del contenuto di acqua libera (per esempio, verdure/frutta essiccate o liofilizzate);

per fermentazione/acidificazione: con la fermentazione naturale, grazie allo sviluppo di vari tipi di microrganismi favorevoli, si ottiene la formazione di acidi organici o di alcol etilico (per esempio, crauti, olive fermentate). L'abbassamento del pH dell'alimento si ottiene anche mediante aggiunta diretta di sostanze acide come l'acido acetico e citrico (per esempio, sottaceti). In sostanza con queste tecniche si riduce la possibilità di sviluppo di microrganismi patogeni e produttori di tossine. Tale metodo determina anche una notevole trasformazione della materia prima, tanto che le caratteristiche del prodotto finito possono essere sostanzialmente diverse;

con aggiunta di conservanti chimici: aggiunta di molecole chimiche che prolungano il periodo di validità dei prodotti alimentari proteggendoli dal deterioramento provocato dai microrganismi. Oggi si tende sempre più a ridurre l'applicazione di tali tecniche per evitare l'impiego di molecole chimiche estranee all'alimento sulle quali aleggia sempre il sospetto di tossicità. Anche la conservazione sotto sale o salamoia (per esempio, olive, capperi), zucchero e mediante affumicatura rientrano in questa classe perché vengono sfruttati gli effetti antimicrobici prodotti dal sale e da alcuni componenti chimici del fumo.

Una precisazione da fare è la distinzione fra conserve e semiconserve che differiscono fra loro sia per il trattamento termico che subiscono, sia per la modalità di successiva conservazione, sia per la durata di vita conservativa (Migliorini, 2004; Sinelli, 2008).

Si definisce *conserva* un prodotto trattato a temperatura di sterilizzazione dopo essere stato rinchiuso in un recipiente a chiusura ermetica. Il trattamento termico utilizzato determina l'uccisione di tutte le forme vegetative o di spore microbiologiche (patogeni e non) e degli enzimi, purchè la conserva rimanga ermeticamente chiusa al fine di evitare il re inquinamento. Questi prodotti hanno una durata di conservazione molto lunga, ma non realisticamente illimitata, sono altamente stabili e possono essere conservati a temperatura ambiente (conserve vegetali appertizzate).

Si definisce *semiconserva* un prodotto che per la sua natura non può essere trattato a temperatura di sterilizzazione, ma a temperatura che per lo meno distruggono forme microbiche vegetative (fra cui le spore) ed enzimi. Questi prodotti non sono sterili e contengono un numero variabile di microrganismi che sono però tenuti sotto controllo, ossia ne viene impedito il moltiplicarsi mediante l'applicazione di ulteriori tecnologie basate su: fattori fisici, quali basse temperature, mantenute costantemente durante la conservazione; fattori chimici, come uso di additivi con proprietà batteriostatiche; tecniche che hanno lo scopo di creare ambienti sfavorevoli allo sviluppo microbico. Le semiconserve hanno una conservabilità limitata nel tempo e spesso devono essere conservate a temperatura controllata (Migliorini, 2004).

Nelle conserve acide ($\text{pH} < 4,5$) e non acide ($\text{pH} > 4,5$) possono svilupparsi varie specie microbiche, anche se i maggiori responsabili delle alterazioni sono i batteri sporigeni. Questi infatti, grazie alle loro forme di resistenza, le spore, possono sopravvivere ai trattamenti termici di sterilizzazione commerciale e, con il passare del tempo, provocare alterazioni al prodotto finito. Tra i germi alteranti più frequenti vi sono dei bacilli (*Bacillus coagulans* e *polymyxa*) e clostridi (*Clostridium thermosaccharolyticum*, *pasteurianum* e *butyricum*) responsabili della fermentazione butirrica. Questi germi riescono a svilupparsi in condizione di assenza di ossigeno (tipica delle conserve) e a valori di acidità bassi e medi. Il difetto alterativo è dato dalla produzione di gas che tendono a far gonfiare il contenitore (bombaggio), alla comparsa di cattivi odori e talvolta anche da alterazioni della consistenza del prodotto. In altri casi si ha come effetto solo l'inacidimento del prodotto (*flat sour*) senza la comparsa del bombaggio; in questo caso i maggiori responsabili sono batteri sporigeni termofili che possono sopravvivere alle temperature in cui la spora del *Clostridium botulinum* viene normalmente distrutta (*Bacillus stearothermophilus* e *thermoacidurans*). Un altro difetto è

l'annerimento del prodotto provocato dalla reazione con il ferro del contenitore con un prodotto a base di zolfo prodotto dal germe alterante *Desulfotomaculum nigrificans*. Un'altra alterazione a cui possono andare incontro polpa, succhi di pomodoro e frutta è una deacidificazione provocata da muffe (in presenza di ossigeno) e lieviti o batteri (in assenza di ossigeno) che utilizzano gli acidi organici presenti nel prodotto e determinano l'innalzamento del pH in prodotti normalmente acidi. Questo può essere molto pericoloso quando viene usato il fattore pH come solo elemento di controllo del *Clostridium botulinum*.

Nelle conserve vegetali sottoposte a trattamenti termici particolarmente intensi possono avere luogo alterazioni che ne determinano la riduzione del potere nutritivo e la modifica delle caratteristiche organolettiche del prodotto finale come la perdita di vitamine ed enzimi; degradazione delle proteine; reazioni di imbrunimento non enzimatico (reazioni di Maillard) che provocano la produzione di composti chimici di colore bruno a carico di zuccheri e proteine, rendendo pertanto il prodotto di colore scuro e riducendone il valore nutritivo. Appare pertanto fondamentale trovare sempre il giusto equilibrio fra l'energia del trattamento termico e il mantenimento delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto finito (Migliorini, 2004).

Le conserve sott'olio costituiscono fra i più tradizionali e tipici prodotti italiani legati alle risorse agricole del territorio e frequentemente preparati a livello domestico; le produzioni industriali stanno conoscendo un periodo di crescita, sia per la quantità lavorate, sia per il pregio commerciale.

A riguardo del prodotto confezionato, ciò è dovuto al fatto che si prestano al consumo di un pubblico affezionato alla buona tavola, ma con poco tempo da dedicare alla cucina; l'impiego come antipasti, condimenti per pasta e riso, contorni per secondi e come ingredienti per piatti innovativi, ne hanno decretato l'appezzamento commerciale (De Giorgi *et al.*, 2000).

Le caratteristiche di qualità di una conserva sott'olio dipendono da :

- qualità della matrice vegetale e di quelle dell'olio di copertura e loro interazione nel tempo,
- tipo di trattamento termico applicato per la stabilizzazione microbiologica,
- entità delle reazioni di degradazione ossidativa,
- durata della conservazione
- condizioni di magazzinaggio (temperatura ed esposizione alla luce).

La tradizionale procedura di conservazione che prevede la sistemazione sott'olio degli alimenti non deve intendersi come tecnica di conservazione vera e propria. Infatti, la preparazione nell'olio di molti prodotti orticoli (pomodori, melanzane, peperoni, ecc.) di per se non ne assicura la salubrità e la conservazione nel tempo. L'aggiunta dell'olio serve piuttosto ad isolare il prodotto dal contatto con l'aria creando un ambiente parzialmente anaerobico che previene lo sviluppo dei microrganismi aerobi. Sia la produzione industriale che casalinga delle conserve sott'olio sono caratterizzate dalla combinazione di differenti fattori che mostrano un effetto cumulativo positivo sulla conservabilità, la cosiddetta "hurdle technology" (Leistner, 2000). La sistemazione dei vegetali sott'olio è pertanto preceduta da trattamenti in grado di inibire lo sviluppo batterico (scottatura in aceto, essiccazione) e seguita dalla sterilizzazione/pastorizzazione, per assicurarsi l'eliminazione delle forme sporigene e degli enzimi.

Questo metodo di conservazione determina dunque una trasformazione del prodotto, ottenendo una matrice alimentare diversa dalle singole componenti, quali olio e vegetale, di cui l'olio di copertura è parte integrante contribuendo a renderne più gradevole il sapore.

Uno dei fenomeni alterativi a cui possono andare incontro le conserve vegetali sottolio è l'irrancidimento ossidativo degli acidi grassi insaturi che compongono l'olio, con alterazione del gusto e dell'odore del prodotto finito. Il processo di ossidazione inizialmente genera idroperossidi, i quali in seguito danno origine principalmente ad alcoli, aldeidi,

chetoni ed acidi carbossilici: tale processo è la causa più importante di deterioramento. L'idrolisi chimica e/o enzimatica dei trigliceridi comporta un aumento del contenuto di acidi liberi e svolge un'aspetto sinergico sull'ossidazione. L'entità del processo di degradazione ossidativa è la risultante della contemporanea presenza sia di fattori che favoriscono l'ossidazione (concentrazione di ossigeno, grado di insaturazione degli acidi grassi, presenza di metalli che catalizzano il processo, grado di esposizione alla luce e al calore), sia di fattori che l'ostacolano (tocoferoli, carotenoidi, composti fenolici, etc.). La stabilità nel corso della conservazione del sistema olio/vegetale e la qualità nutrizionale del prodotto dipendono fortemente dalla qualità delle materie prime, in particolare dalla tipologia di olio utilizzata.

Benché sia potenzialmente il più adatto (per le sue proprietà sensoriali, il contenuto in antiossidanti e la composizione lipidica) l'olio extravergine di oliva è in genere il meno utilizzato come olio di copertura nelle conserve vegetali industriali, rispetto ad altri oli come gli oli di semi e l'olio di oliva. Rientra, invece, generalmente nella formulazione delle ricette tradizionali.

Nell'ambito delle conserve vegetali più tipiche del Sud dell'Italia troviamo i pomodori essiccati e conservati sott'olio extravergine di oliva.

Le conserve di pomodoro vengono sottoposte alla pastorizzazione, piuttosto che alla sterilizzazione, grazie alle proprietà del pomodoro stesso: essendo una matrice alimentare naturalmente acida ($\text{pH} \leq 4.5$), la normativa consente un trattamento termico blando poiché in queste condizioni vengono inibite le forme microbiche patogene e sporigene, sfruttando l'azione sinergica dei fattori pH, colmatura con olio (condizioni di anaerobiosi) e temperatura.

Pur non intervenendo con temperature elevate, si può supporre che comunque il trattamento termico di pastorizzazione comporti profonde modificazioni al sistema olio/pomodoro, in particolare ad alcuni componenti minori sia dell'olio (fenoli) che del pomodoro (carotenoidi).

OLIO. Per quanto riguarda i *phytochemicals* dell'olio d'oliva, la concentrazione totale dei composti fenolici è il risultato di interazioni complesse tra diversi fattori, inclusi cultivar, fase di maturazione, clima e processo di estrazione, ma la quantità finale dei suddetti composti è anche influenzata dalle modificazioni ossidative ed idrolitiche durante la conservazione (Della Medaglia *et al.*, 1996). L'elevato potere antiossidante di questi composti fenolici è attribuito alla presenza di 2 gruppi idrossilici vicinali (in posizione 3 e 4), confermando l'elevato potere antiossidante del gruppo di composti fenolici individuato come orto-difenoli. In uno studio condotto da Fogliano *et al.* (1999) è stato dimostrato che l'idrossitirosolo e il suo estere contribuiscono, in maniera significativa, all'efficienza antiossidante dei sistemi micellari degli alimenti: in particolare, in questo tipo di sistema è stata rilevata una maggiore efficienza dell'estere dell'idrossitirosolo; ciò è stato spiegato in base al suo coefficiente di ripartizione, essendo l'OHTy-EDA più lipofilo dell'OHTy. Poiché il compartimento occupato dalle sostanze antiossidanti è fondamentale per le ripercussioni che determina sull'efficienza degli antiossidanti stessi, molti studi si sono concentrati sulla misura del coefficiente di ripartizione di diversi antiossidanti, in differenti tipi di emulsioni ed è stato confermato che: maggiore è la polarità dell'antiossidante, minore risulta la sua efficienza nel contrastare l'ossidazione lipidica (Huang *et al.*, 1996).

POMODORO. Il contenuto di flavonoidi (precursori dei carotenoidi) nelle piante, dipende dalle condizioni di crescita (Herrmann, 1998; Kuhnau, 1976). Per esempio la concentrazione di flavonoli e flavanoni è maggiore sulla superficie dei prodotti cresciuti in ambienti aridi o semiaridi. Comunque, il contenuto di flavonoidi è anche influenzato dall'irrigazione, dalla maturità alla raccolta, dallo stoccaggio, dal metodo di coltivazione (Andersen e Markham, 2006). I prodotti trattati industrialmente presentano una significativa differenza di livelli di flavonoidi rispetto al prodotto fresco. Il trattamento termico e la conservazione possono esporre i prodotti freschi a un possibile danno ossidativo e l'attivazione di enzimi ossidativi come la polifenolossidasi.

Il principale flavonoide del pomodoro è la naringenina che si accumula esclusivamente nella buccia e si forma in corrispondenza della colorazione del frutto. Inoltre la rutina si accumula per lo più durante la maturazione della buccia del pomodoro (Muir *et al.*, 2001). Si pensa che i flavonoidi abbiano proprietà salutari, probabilmente dovuti all'elevata capacità antiossidante (Pietta, 2000). Studi svolti da Duthie & Crozier (2000) hanno dimostrato che le quantità di flavonoidi estraibili sono maggiori negli alimenti contenenti pomodori sottoposti a cottura.

OLIO-POMODORO. La matrice lipidica ha due effetti positivi sulla biodisponibilità dei carotenoidi: nello stomaco favorisce l'estrazione dei carotenoidi dalle matrici alimentari, ma soprattutto la presenza di olio stimola la secrezione degli acidi biliari e dunque l'assorbimento di tutti i *phytochemicals* lipofili. La biodisponibilità dei carotenoidi di pomodori riscaldati in presenza di grasso aumenta, ma è importante sottolineare che la composizione del grasso può influenzare questo effetto. In proposito, Lee *et al.* (2000) hanno condotto uno studio per valutare l'effetto della cottura dei pomodori con olio; il risultato ha mostrato che l'aggiunta di olio ai prodotti a base di pomodoro, induce un aumento dei livelli di licopene nel sangue. Questo risultato è strettamente legato alla sorprendente integrazione tra la componente antiossidante dell'olio d'oliva e quella del pomodoro; recenti studi hanno dimostrato come vi sia, soprattutto nel corso della cottura olio/pomodoro uno scambio di sostanze benefiche (antiossidanti) tra le due matrici, in particolare lo scambio di fenoli e carotenoidi (licopene) tra olio extravergine e pomodoro, in presenza dei composti derivanti dalla reazione di Maillard, ne aumentano l'attività antiossidante e la biodisponibilità (Pernice *et al.*, 2007). È noto che la formazione di prodotti di imbrunimento non enzimatico ad attività antiossidante è favorita dal trattamento termico (per esempio le melanoidine) (Lingnert *et al.*, 1980; Anese *et al.*, 1999).

1.4.2 Gli oli aromatizzati

Un "olio di oliva aromatizzato" può essere definito come un olio di oliva (in genere un olio di oliva extravergine) che è stato elaborato con vegetali, erbe, spezie o frutti al fine di migliorarne il valore nutrizionale, arricchirne le caratteristiche sensoriali e/o aumentarne la shelf-life. Sono anche definiti "*gourmet olive oils*" a significare che sono identificati come prodotti con una qualità organolettica superiore (Baiano *et al.*, 2010).

Secondo gli standard del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI), "oli aromatizzati" sono considerati condimenti e quindi non possono essere denominati "olio d'oliva o vergine o extra vergine di oliva aromatizzato con ...". Invece, tali prodotti possono essere chiamati "condimento a base di olio d'oliva e aromi, spezie o erbe"

e l'elenco degli ingredienti può indicare la categoria di olio di oliva utilizzato e gli aromi presenti secondo il Codex generale standard per l'etichettatura dei cibi pre-confezionati (CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991, modificato nel 2001).

La preparazione di infusi di erbe o fiori in olio è una pratica antica nata nel Bacino del Mediterraneo quando vegetali ed erbe essiccati erano immersi in olio d'oliva al fine di prevenire, empiricamente, reazioni di degradazione. Gli oli aromatizzati si arricchiscono degli aromi dei vegetali ed erbe aggiunti e sono stati utilizzati come condimenti in vari tipi di preparazioni culinarie (pasta, insalata, salse) o semplicemente come bagno per il pane. Ogni Paese Mediterraneo è caratterizzato dai propri oli aromatizzati tradizionali votati ad usi specifici. Ad esempio, in Italia, infusi di erbe in olio di oliva sono particolarmente utilizzati su pane, in Portogallo, l'olio d'oliva è infuso con minuscoli peperoncini rossi, grani di pepe nero, aglio e, a volte, brandy, in Spagna sono impiegati principalmente peperoncino rosso ed erbe aromatiche. Gli oli aromatizzati rappresentano anche una pratica antica eseguita durante tradizionale estrazione dell'olio d'oliva al fine di pulire la pressa e per rendere meno sgradevoli gli oli ottenuti da olive stramature o conservate in maniera sbagliata (Baiano *et al.*, 2010).

La considerazione di olio alimentare pregiato, che l'olio d'oliva ha sempre avuto presso i consumatori del bacino del Mediterraneo, oggi si sta diffondendo praticamente in tutto il mondo tra i consumatori non tradizionali che pongono particolare attenzione alla possibilità di prevenire le malattie attraverso una dieta sana: questi potenziali consumatori, pur non essendo tradizionalmente aperti a tutti gli utilizzi dell'olio di oliva, sono disposti ad acquistare preparazioni già pronte di olio di oliva arricchito con ingredienti appartenenti sempre alla Dieta Mediterranea, i cosiddetti “*gourmet oils*” (Antoun & Tsimidou, 1997). Per tutti questi motivi, gli oli aromatizzati sono diventati alcuni tra i condimenti più popolari usati sia da *chefs gourmet* che gente comune. La loro versatilità, facilità d'uso, e una vasta gamma di gusti li hanno resi ingredienti base tra consumatori tradizionali e non tradizionali in molti Paesi del mondo. Le applicazioni per le quali questo tipo di prodotto è largamente diffuso sono il condimento di insalata, verdure arrosto e pasta, salse e marinate, preparazioni a base di carne ed anche per le patate fritte. Altre applicazioni includono frutta secca e snack, che possono essere irrorate con l'olio prima della cottura, così come impasti, salse e impanature (Baiano *et al.*, 2010).

Da una parte tali prodotti potrebbero incrementare l'utilizzo di olio di oliva nei consumatori non tradizionali, favorendo anche il loro approccio al nuovo prodotto, dall'altra conferire un valore aggiunto all'olio vergine di oliva.

Erbe e spezie mediterranee sono i principali ingredienti che vengono usati per la produzione dei “*gourmet oils*”. Le erbe e spezie vengono usualmente addizionate in cottura o a crudo alle pietanze della Dieta Mediterranea per arricchirne il gusto e l'aroma dei vari cibi (Antoun & Tsimidou, 1997); ad esse è inoltre riconosciuto anche il merito di esaltare il valore nutrizionale del cibo ed aumentarne la conservabilità e quindi la *shelf-life* (ad esempio nei prodotti sott'olio).

I “*gourmet oil*” preparati con l'aggiunta di varie erbe potrebbero quindi non solo soddisfare i requisiti organolettici dei consumatori, ma anche presentare ulteriori caratteristiche qualitative apprezzate dal mercato dei prodotti agroalimentari, come la migliore conservabilità rispetto a quella dell'olio tradizionale o l'arricchimento di molecole nutraceutiche con elevata biodisponibilità.

Numerosi tipi di olio aromatizzato sono disponibili sul mercato. L'assortimento è molto ampio, dato che è possibile scegliere tra oli aromatizzati con:

- verdure (aglio, cipolla, pepe, peperoncino, pomodori secchi);
- erbe aromatiche (rosmarino, origano, basilico, salvia, timo, finocchio, ginepro, dragoncello);
- spezie (chiodo di garofano, noce moscata, zenzero);
- funghi (tartufi);
- frutta (limoni, arance, mandarini, mele, banane);
- frutta secca (mandorle, nocciole, pinoli);
- aromi (ad esempio, oli aromatizzati alla vaniglia).

Piante aromatiche e frutti sono stati utilizzati nel corso dei secoli in molti campi (alimentare, farmaceutico, cosmetico e in profumeria) a causa al loro contenuto di oli essenziali e altri composti di cui sono riconosciute le proprietà antimicrobiche e antiossidanti. Le sostanze ad attività biologica e con proprietà sensoriali presenti nei prodotti vegetali usati sono principalmente terpenoidi, biofenoli, carotenoidi, alcoli alifatici, aldeidi, chetoni etc. (Baiano *et al.*, 2010; USDA, 2007).

Gli aspetti sensoriali degli oli aromatizzati sono fortemente influenzati dalla diversa composizione di tali composti in vegetali, spezie e frutti più comunemente utilizzati nel condimento olio. Diversi studi riportano che l'aggiunta di erbe e spezie migliorano le caratteristiche sensoriali dell'olio originario aumentandone l'accettabilità in relazione al proprio profilo aromatico e dalla quantità aggiunta (Antoun & Tsimidou, 1997; Gambacorta *et al.*, 2007).

Per la sua particolare composizione l'olio extra vergine di oliva è fortemente dotato di sostanze dagli effetti salutari: acido oleico, altri acidi grassi insaturi e antiossidanti naturali tra clorofilla, carotenoidi, α -tocoferolo e composti fenolici

come pinosinololo, oleuropeina derivati (hydrotyrosol, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA) e lignostrosidi derivati (tirosole, p-HPEA-EDA, p-HPEA-EA). Interessanti proprietà antiossidanti sono di solito assegnati a composti estratti da piante aromatiche. Di conseguenza, l'aggiunta di parti di questi ad olio esalta le sue proprietà nutrizionali e effetti benefici soprattutto in termini di prevenzione dell'ossidazione (Baiano *et al.*, 2010). Origano e rosmarino sono tradizionalmente conosciuti per le loro proprietà mediche, terapeutiche e antiinfiammatorie, e risultano efficaci nel ritardare l'alterazione dei cibi causata dai microrganismi. Anche l'aglio grazie alla presenza di molecole biologicamente attive, con proprietà antibatteriche e antibiotiche, che lo rende attivo contro funghi, virus e batteri (Antoun & Tsimidou, 1997). È stato inoltre dimostrata l'efficacia dell'uso del peperoncino (*Capsicum annuum* L.), aggiunto come antiossidante nei cibi, nella riduzione dell'incidenza delle trombosi e nella diminuzione dei livelli di glucosio nel plasma (Ahindra, 2000).

Molti studi sono stati condotti allo scopo di verificare la stabilità ossidativa di oli di oliva arricchiti con origano, rosmarino ed aglio per verificarne l'effetto sulla *shelf life* dell'olio di oliva stesso: da tali studi è emerso un effetto stabilizzante di tali spezie sulla conservazione del prodotto (Antoun & Tsimidou, 1997). Anche dalle prove di conservazione riguardanti l'aggiunta di polvere di peperoncino all'olio di semi di lino, è stato dimostrato l'effetto ritardante sull'ossidazione dei gliceridi, attribuito al contenuto in composti fenolici antiossidanti, del peperoncino (Ahindra, 2000).

Sono disponibili diversi metodi di aromatizzazione dell'olio e la scelta è molto importante in quanto il metodo di estrazione influenza sia l'accettabilità che la stabilità all'ossidazione dell'olio aromatizzato (Baiano *et al.*, 2010).

L'infusione è il metodo tradizionale di aromatizzazione dell'olio. Il materiale vegetale è in genere macinato e miscelato con l'olio, la miscela viene lasciata a temperatura ambiente per un tempo definito e con agitazione periodica. La miscela viene poi filtrata per rimuovere le parti solide ed è pronto all'uso. Quando eseguita a temperatura ambiente, l'infusione può richiedere molto tempo (ore, ma anche giorni e mesi). Al fine di accelerare il processo, i possibili cambiamenti di questo metodo di aromatizzazione comprendono l'infusione in condizioni di vuoto o in atmosfera di azoto e il riscaldamento a temperatura moderata o l'estrazione assistita in forno a microonde. Per evitare la presenza di problemi di torbidità e di dosaggio, l'alternativa all'infusione classica è la preparazione di estratti concentrati, che sono poi diluiti all'occorrenza con olio puro in modo da ottenere l'olio aromatizzato vero e proprio secondo le caratteristiche desiderate (Baiano *et al.*, 2010).

Un metodo sicuro per ottenere un olio aromatizzato con un determinato *flavour* è rappresentato dall'aggiunta delle spezie erbe o vegetali (in genere frutti come gli agrumi) direttamente alle olive al momento del processo di estrazione dell'olio. In questo modo i sapori dagli agenti aromatizzanti sono molto ben assorbiti dall'olio, il residuo di ingrediente aromatizzante è separato dall'olio insieme ai residui solidi dell'oliva (sansa) e la parte acquosa viene rimossa con l'acqua di vegetazione. Così, alla fine del processo si ottiene direttamente l'olio aromatizzato; il problema di tale procedimento è il giusto bilanciamento delle due matrici (olive e ingrediente aromatizzante) (Baiano *et al.*, 2010).

L'uso delle metodiche fin qui descritte hanno come effetto indesiderato la co-estrazione di composti indesiderati come cere e composti amari, modificando, in questo modo, le caratteristiche sensoriali e la stabilità durante la *shelf life* del prodotto. Per evitare questi problemi, un possibile approccio è l'uso degli oli essenziali o estratti vegetali come agenti aromatizzanti. Gli oli essenziali possono essere ottenuti mediante estrazione con solvente, distillazione in corrente di vapore e estrazione con CO₂ supercritica (Baiano *et al.*, 2010). Gli aromi impiegati nella maggior parte dei casi sono comunque di origine naturale, in alcuni casi si utilizzano aromi ottenuti per via sintetica, altri creati chimicamente a partire da composti naturali.

Dall'analisi del ciclo di vita delle diverse tipologie di oli presenti sul mercato si rileva uno stato di complessiva maturità dei prodotti, soprattutto con riferimento a quelli poco differenziati, come l'olio di oliva, l'extravergine, l'olio di sansa e semi vari. Alla luce di questo, alla fase di rivitalizzazione potrà manifestarsi solo per mezzo di una differenziazione del prodotto tradizionale, come nel caso dell'extravergine, il quale sempre più spesso offre varianti diverse in base alle tipologie di gusto, di cultivar utilizzate, di metodi di produzione adottati, origine geografica e tipicità. I prodotti che stanno invece vivendo una fase di sviluppo sono soprattutto gli oli vitaminizzati e aromatizzati, seguiti dai biologici e Dop-Igp; tipologie di oli che meglio soddisfano le attese di un consumatore sempre più esigente rispetto alle peculiarità di un prodotto rivelatosi fondamentale nell'alimentazione (**Fig. 1.8**) (Biondi *et al.*, 2008).



Figura 1.8 Vita commerciale degli oli

L'olio aromatizzato al peperoncino

Il peperoncino rosso piccante (fam. *Solanaceae* gen. *Capsicum*) è la spezia più conosciuta in molte parti del mondo, valutato per i suoi attributi sensoriali di colore, piccantezza ed aroma. I peperoncini sono economicamente importanti grazie all'enorme quantità e alle diverse varietà usate. L'industria alimentare è la più grande utilizzatrice di peperoncini piccanti, dove la spezia è usata come agente colorante ed aromatizzante in salse, zuppe, carni trattate, snacks, soft drinks e bibite alcoliche o nella forma in polvere o come oleoresina (estratto concentrato) (Korel *et al.*, 2002). Ma viene usato anche come materia prima nell'industria farmaceutica (Duarte *et al.*, 2004). Le cultivar del genere *Capsicum* sono state identificate come i vegetali probabilmente con la più alta capacità antiossidante (Hasler, 1998), ottima fonte di vitamina A, C ed E, flavonoidi e carotenoidi.

La specie *Capsicum annum* include la maggior parte dei peperoncini che si trovano in commercio e più comunemente presenti in Italia. Il sapore piccante dei frutti di alcune specie del genere *Capsicum*, è principalmente dovuto ad una classe di composti chiamata capsaicinoidi; la proprietà piccante rende questa specie importante dal punto di vista economico, ampiamente utilizzata nell'industria alimentare come spezia, ma anche come pianta medicinale (Iorizzi *et al.*, 2001).

La capsaicina è il prototipo della classe di composti detti appunto capsaicinoidi (Nicita, 2007). Chimicamente sono tutti amidi di acidi a C9 o C11 e della vanillilamina. Le maggiori differenze fra i diversi capsaicinoidi sono nella lunghezza della catena laterale, nella presenza o meno di doppi legami, nel punto di ramificazione e nella piccantezza (**Fig. 1.9**).

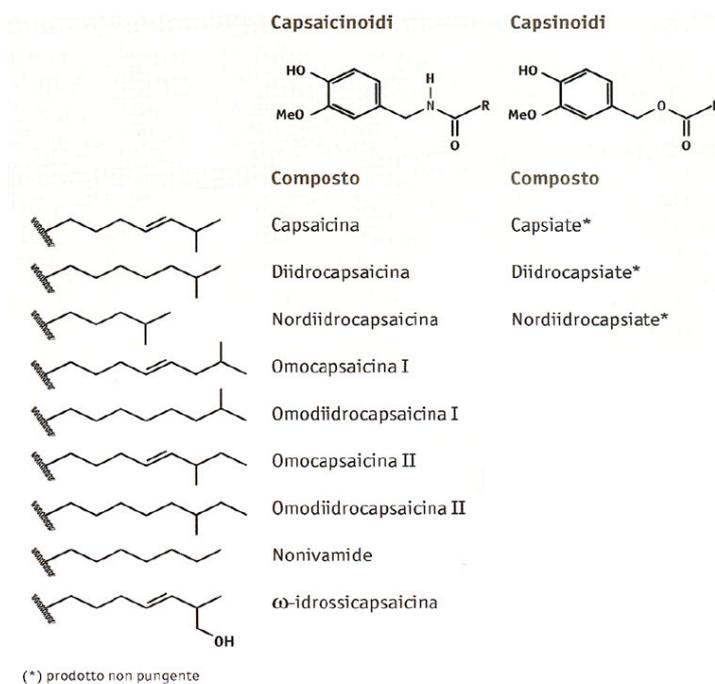


Figura 1.9 Capsaicinoidi e Capsinoidi identificati nel peperoncino

Molti di loro sono pungenti, ma ci sono anche capsaicinoidi non piccanti come la ω-idrossicapsaicina. Inoltre è stato trovato un gruppo di sostanze non piccanti capsaicinoidi-simili, chiamati capsinoidi. I capsinoidi hanno la stessa catena laterale dei capsaicinoidi, ma la parte aromatica è derivata dall'alcol vanillico invece che dalla vanillilamina, sono quindi degli esteri. I principali responsabili del sapore piccante sono la capsaicina [(E)-N-4-idrossi-3-metossibenzil-8-metil-6-nonenamide] e la diidrocapsaicina (6,7-diidroderivato della capsaicina) (Kobata *et al.*, 1998). La capsaicina è poco solubile in acqua ma molto solubile in grassi e alcoli. Capsaicina e diidrocapsaicina insieme costituiscono l'80-90% dei capsaicinoidi totali del peperoncino. Nel *Capsicum annuum* il contenuto totale di capsaicinoidi varia tra lo 0,1% e l'1% in peso ed il rapporto capsaicina/diidrocapsaicina è 1:1. Nel *Capsicum frutescens* il contenuto è dello 0,4-1% ed il rapporto è di 2:1. I capsaicinoidi sono localizzati per la maggior parte nelle vescicole o vacuoli delle cellule epidermiche della placenta. I semi non sono fonte di capsaicinoidi, essi assorbono la capsaicina a causa della loro vicinanza alla placenta. Nessun'altra parte della pianta produce capsaicinoidi (Ishikawa *et al.*, 1998)

La sensazione pungente è causata dall'interazione della capsaicina e dei suoi analoghi con le cellule dei nervi della pelle e con le membrane delle mucose presenti nella bocca, nello stomaco e nella zona rettale provocando la sensazione di calore (Zachariah & Gobinath, 2008). La capsaicina stimola l'organismo a produrre endorfine (con struttura simile alle morfine), correlate, oltre che a sensazioni di piacere, felicità e soddisfazione, a quelle di dolore percepite nella cavità orale al momento del contatto con l'alcaloide.

Una soluzione che contiene 10 ppm di capsaicina quando posta sulla lingua, produce una sensazione di bruciore persistente ma è percepibile anche a concentrazioni più basse. L'intensa pungenza è conferita dalla lunga catena idrocarboniosa, che lega fortemente le catene lipoproteiche dei recettori. La catena alchilica permette inoltre alla molecola di «slittare» nelle membrane cellulari rendendo la sensazione di bruciore ulteriormente persistente (Poggi, 2002).

Nel 1912, Wilbur Scoville, farmacista di Detroit, ideò il test organolettico (SOT, Scoville Organoleptic Test) per valutare il grado di piccantezza del peperoncino: "La Scala di Scoville". I gradi di questa scala, indicano il rapporto di

diluizione in acqua zuccherata necessario a far perdere la piccantezza al peperoncino analizzato, che viene testato da un insieme di assaggiatori (generalmente 5), partendo dal presupposto che un peperone dolce, che non contiene capsaicina, ha un valore pari a 0. In **Tabella 1.10** è riportata una valutazione secondo l'indice di Scoville dei diversi capsaicinoidi. In **Tabella 1.11** è riportata una classificazione delle principali varietà di peperoncino secondo l'indice di Scoville (Zachariah & Gobinath, 2008).

Tabella 1.10. Valutazione secondo l'indice di Scoville dei diversi capsaicinoidi.

Composto	Indice di Scoville
Omocapsaicina	8.600.000
Omodiidrocapsaicina	8.600.000
Nordiidrocapsaicina	9.100.000
Diidrocapsaicina	16.000.000
Capsaicina	16.000.000

Tabella 1.11. Indice di Scoville delle principali varietà di peperoncino.

Varietà di Peperoncino	Indice di Scoville(SHU)
Bell/sweet	0–100
New Mexican	500–1.000
Espanola	1.000–1.500
Ancho & Pasilla	1.000–2.000
Cascabel & Cherry	1.000–2.500
Jalapeno & Mirasol	2.500–5.000
Serrano	5.000–15.000
De Arbol	15.000–30.000
Cayenne & Tabasco	30.000–50.000
Chiltepin	50.000–100.000
Scotch Bonnet & Thai	100.000–350.000
Habanero	200.000–350.000
Nagarhari (Assam)	855.000

La capsaicina è un alcaloide o più precisamente un proto alcaloide. Numerose sono le proprietà mediche e farmacologiche della capsaicina. Diversi autori si sono occupati dello studio delle sue proprietà antitumorali, antinfiammatorie e antiossidanti in modelli animali e in diverse linee cellulari (Kogure, 2002; Lee, 1995; Lee, 2004; Surh, 2002). Sono certamente ipotizzabili, quindi, effetti nutraceutici di alimenti contenenti la capsaicina, come l'olio aromatizzato al peperoncino tenendo però presente che la capsaicina pura è una sostanza tossica che può provocare la morte per arresto respiratorio se assunta in dosi eccessive (13g) ed in modo diretto.

La capsaicina è poco solubile in acqua ma molto solubile in grassi e alcoli, in tal senso l'olio è un ottimo solvente di estrazione.

Per quanto riguarda la produzione dell'olio aromatizzato al peperoncino, in linea di principio le fasi del processo di produzione dell'olio aromatizzato al peperoncino prevede la preparazione del concentrato Olio/Peperoncino, che con successive diluizioni permette di ottenere un prodotto finale con le caratteristiche organolettiche ed il grado di piccantezza richieste dal mercato. Da una piccola indagine effettuata presso alcune aziende olearie è emersa una grande variabilità di metodi per la preparazione dell'olio aromatizzato al peperoncino, essendo diversa la materia prima, sia per quanto riguarda l'olio, che può essere extravergine (con un profilo aromatico poco accentuato), di oliva, ma anche di semi, che per quanto riguarda il peperoncino che può essere in polvere o in scaglie. Variano, inoltre, anche le

percentuali di peperoncino utilizzato ed i tempi di infusione. Il prodotto finito necessita di standardizzazione per quanto riguarda colore, aspetto, odore e gusto. E di analisi chimico-fisiche: acidità, numero di perossidi, assorbimento UV, composizione in acidi grassi, analisi della componente volatile.

L'olio aromatizzato alla liquirizia

La radice di liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*) è usata in tutto il mondo come dolcificante naturale e, in alcuni casi, come additivo nella preparazione di caramelle e specialità gastronomiche. In Italia, ad esempio, in particolare in Calabria, dov'è concentrata la produzione, è usata per preparare un liquore tradizionale. Inoltre, la radice di liquirizia in polvere è comunemente impiegato come farmaco a base di erbe nella formulazione di ayurvedico e le medicine cinesi, e secondo come riferito possiede anti-spasmodiche, antidiabetici, anti-depressivi, epatoprotettivi, espettorante e attività che favoriscono la memoria (Montoro *et al.*, 2011). Tra i componenti minori, il costituente principale della radice di liquirizia è l'acido glicirrizico o glicirrizina che presenta proprietà anti-infiammatorie, anti-virali, anti-allergeniche, anti-ulceranti ed anti-ossidanti, oltre ad attività chemio-preventiva contro il cancro e l'AIDS. D'altra parte, l'assunzione di livelli elevati di estratto di liquirizia sono noti per aumentare la pressione sanguigna, un effetto causato principalmente dalla presenza di proprio della glicirrizina. Circa altri 400 composti secondari sono stati rilevati e/o isolati da *G. glabra* e da specie affini. La maggior parte di questi componenti sono flavonoidi o saponine triterpeniche minori, considerati responsabili, insieme alla glicirrizina, della maggior parte delle attività terapeutiche della pianta (Montoro *et al.*, 2011).

La composizione dei principali composti minori può essere così schematizzata (Fig. 1.10):

Glicosidi triterpenici (saponine triterpenoidi pentacicliche). Principalmente glicirrizina (GL - sinonimi: acido glicirrizico e acido glicirrizinico), presente come sali K e Ca [6-14%], idrolizzata dalla flora intestinale ad acido glucuronico ed acido glicirretinico (GA - sinonimo: acido glicirritico). La GL è il 3-O-diglucoronide del GA [D-glucuronato-D-glucuronato-O-3-GA], che è presente con gli stereoisomeri 18-a e 18-b, anche se la forma 18-b conta per più del 95% del totale. Sono presenti altre 13 saponine minori.

Flavonoidi e isoflavonoidi. Includono: flavononi come liquiritigenina, la sua 4'-O-glucoside liquiritina e glabrolo, glucoliquiritinapioside; flavoni e flavanoni come prenyllicoflavone A e shinflavone ;calconi come isoliquiritigenina e varie glicosidi come il 4'-O-glucoside isoliquiritina; licocalconi A e B; glabridina e glabrene; isoflavoni come formononetina e glabrone.

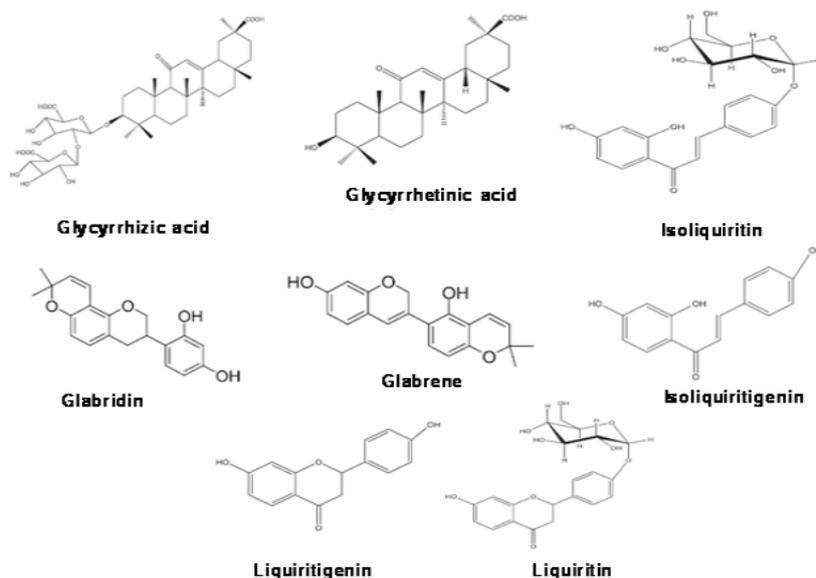


Figura 1.10 Principali flavonoidi e saponine in radice di liquirizia

Alcune saponine della liquirizia, comunque, dar luogo a effetti collaterali negativi tra cui la ritenzione salina e l'ipertensione (Montoro *et al.*, 2011). Il contenuto di glicirrizina varia nei vari stadi di crescita della pianta, queste variazioni sono meno sensibili nelle zone dove la temperatura presenta minori cambiamenti, bisogna infatti ricordare che la glicirrizina è da considerarsi, per la pianta, un materiale di riserva, per cui risulta notevolmente influenzato dai fattori ecologici, tra i quali, in particolare, la temperatura ambiente. Infatti studi recenti (Montoro *et al.*, 2011) hanno dimostrato come radici di liquirizia provenienti da diverse aree geografiche presentino una diversa concentrazione di saponine e flavonoidi, e che siano influenzati anche da diversi fattori come: maturità della pianta, condizioni ambientali, di raccolta e di processo. La radice di liquirizia si utilizza essiccata tal quale come semplice bastoncino di legno grezzo, oppure subisce un processo di estrazione dal quale si ottiene la liquirizia pura in polvere e/o in bacchette (Fig. 1.11).

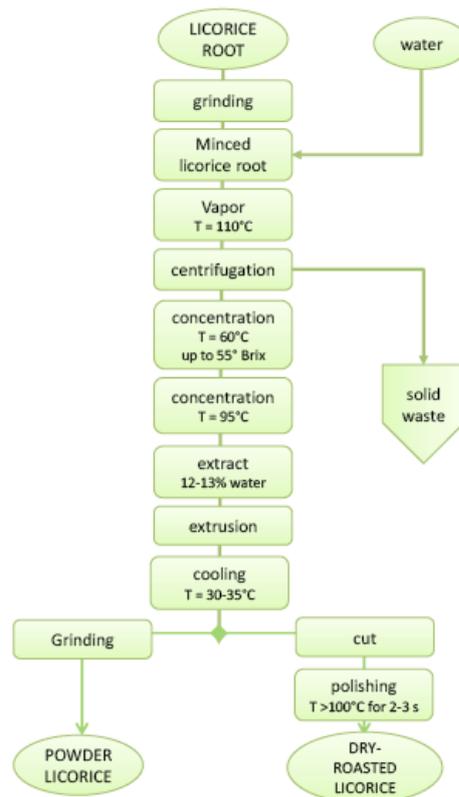


Figura 1.11 Diagramma del processo di estrazione della liquirizia

Il processo prevede l'estrazione acquosa, con l'ausilio di vapore, della radice da cui si ottiene un liquido scuro che è la base per la produzione di liquirizia nera (la cosiddetta liquirizia pura). Il liquido è successivamente concentrato e di nuovo estratto; dall'estratto si ottengono dei panetti che possono rappresentare il prodotto finale, oppure l'estratto viene estruso e poi tagliato a seconda del formato desiderato oppure ridotto in polvere. In tali condizioni di lavorazione il danno termico è una conseguenza della parziale denaturazione dei componenti più sensibili alle alte temperature; per esempio il cambio di colore da giallo, tipico delle radici, a marrone scuro della soluzione finale è dovuto all'ossidazione di alcuni componenti contenuti nella materia greggia (Francesconi, 2005).

Per la preparazione dell'olio aromatizzato alla liquirizia può essere utilizzato sia la radice essiccata che la liquirizia pura. Il processo non è propriamente definito, infatti è prodotto generalmente in modo del tutto artigianale mediante infusione.

II. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Le tematiche affrontate nel presente lavoro di tesi rientrano nei seguenti obiettivi:

- Studio delle molecole volatili quali potenziali marcatori della tipicità sensoriale e dell'origine dell'olio
- Studio della componente aromatica e della frazione antiossidante di preparazioni alimentari a base di olio:
 - *Conserve sottolio*
 - *Oli aromatizzati*

III. RISULTATI E DISCUSSIONE*LE MOLECOLE VOLATILI: POTENZIALI MARCATORI DELLA TIPICITÀ SENSORIALE E DELL'OLIO*

Al fine di studiare le molecole volatili quali potenziali marcatori della tipicità sensoriale e dell'origine dell'olio, campioni di olio extravergine di oliva a Denominazione di Origine Protetta (DOP) e oli di oliva di varietà tradizionali italiane, sono stati analizzati per la componente volatile e sensoriale.

3.1.1. Materiali e metodi

3.1.1.1 Campionamento

I campioni extravergini di oliva oggetto dello studio sono stati collezionati nel corso delle annualità 2007/2008, 2008/09, 2009/10 e 2010/2011.

A seguito del reperimento, i campioni sono stati subito valutati per la componente sensoriale e si è provveduto al prelievo dell'aliquota necessaria per l'analisi della componente volatile. Dopo il prelievo sono stati conservati a -18°C fino al momento dell'analisi.

In **Tabella 3.1.1** si riporta l'elenco dei campioni con l'indicazione della varietà, della zona di provenienza e dell'annata di produzione.

Tabella 3.1.1. Elenco dei campioni

N	Sigla	Varietà	Zona di provenienza		Annata di produzione
1	R1	ravece	Irpinia	Campania	2007/2008
2	R2	ravece	Irpinia	Campania	2007/2008
3	R3	ravece	Irpinia	Campania	2007/2008
4	R4	ravece	Irpinia	Campania	2007/2008
5	R5	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
6	R6	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
7	R7	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
8	R8	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
9	R9	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
10	R10	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
11	R11	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
12	R12	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
13	R13	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
14	R14	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
15	R15	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
16	R16	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
17	R17	ravece	Irpinia	Campania	2009/2010
18	R/ogl	ravece/oglierola	Irpinia	Campania	2007/2008
19	R/mix1	ravece/mix	Irpinia	Campania	2007/2008
20	R/mix2	ravece/mix	Irpinia	Campania	2007/2008
21	R/mix3	ravece/mix	Irpinia	Campania	2007/2008
22	O1	ortice	Sannio	Campania	2007/2008
23	O2	ortice	Sannio	Campania	2007/2008
24	O3	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
25	O4	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
26	O5	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
27	O6	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
28	O7	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
29	O8	ortice	Sannio	Campania	2010/2011
30	O/mix	ortice/mix	Sannio	Campania	2007/2008
31	Ort/mix	ortolana/mix	Sannio	Campania	2007/2008
32	Rot1	rotondella	Colline Salernitane	Campania	2007/2008
33	Rot2	rotondella	Colline Salernitane	Campania	2007/2008
34	Rot/mix1	rotondella/mix	Colline Salernitane	Campania	2007/2008
35	Rot/mix2	rotondella/carp	Colline Salernitane	Campania	2007/2008
36	Sal/mix1	salella/mix	Cilento	Campania	2007/2008
37	Sal/mix2	salella/mix	Cilento	Campania	2007/2008
38	Lec/mix	leccino/mix	Avellino	Campania	2007/2008
39	Mar/mix	marinese/ravece	Irpinia	Campania	2007/2008
40	F/Carp	frantoio/carp	Salerno	Campania	2007/2008
41	Lec/mix	leccino/mix	Napoli	Campania	2007/2008
42	F/mix	frantoio/mix	Salerno	Campania	2007/2008
43	Carp/mix	carpellese/mix	Cilento	Campania	2007/2008
44	Fs17/mix	fs17/mix	Avellino	Campania	2007/2008
45	Ses/mix	sessana/mix	Terre Aurunche	Campania	2007/2008
46	Ses	sessanella	Caserta	Campania	2007/2008
47	T	tonda	Caserta	Campania	2007/2008
48	Cor	corniola	Caserta	Campania	2007/2008
49	Cai/mix	caiazana/mix	Caserta	Campania	2007/2008
50	M1	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
51	M2	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
52	M3	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
53	M4	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
54	M5	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
55	M6	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2007/2008
56	M7	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2008/2009
57	M8	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2008/2009
58	M9	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2008/2009
59	M10	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
60	M11	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
61	M12	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
62	M13	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
63	M14	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
64	M15	minucciola	Penisola Sorrentina	Campania	2009/2010
65	ott-01	ottobratica	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
66	ott-02	ottobratica	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
67	Car	carolea	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
68	Rog	roggianella	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
69	Cas1	cassanese	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
70	Cas2	cassanese	Reggio Calabria	Calabria	2009/2010
71	Ros	rossanese	Bruzio	Calabria	2007/2008
72	B	biancolilla	Siracusa	Sicilia	2007/2008
73	C	coratina	Bari	Puglia	2007/2008

3.1.1.2 Valutazione Sensoriale

La caratterizzazione sensoriale dei campioni di olio è stata effettuata da un panel (giuria) di assaggiatori addestrati secondo quanto previsto dal Reg. CEE 2568/91 e succ. mod. Gli assaggiatori, allenati in sedute periodiche a riconoscere le sensazioni caratteristiche dell'olio ed a valutarne l'intensità, hanno esaminato il profilo sensoriale di ciascun campione. Le sedute di assaggio dei campioni sono state guidate dal capo-panel che ha avuto il compito di coordinare le diverse sedute e di elaborare i risultati delle schede di assaggio che ogni assaggiatore è stato tenuto a compilare per ciascun olio degustato. Agli assaggiatori è stato chiesto di quantificare gli attributi riscontrati nei vari campioni di olio, utilizzando una scala non strutturata di 10 centimetri. La scheda utilizzata per la valutazione sensoriale è stata appositamente predisposta sulla base di quanto previsto dal metodo COI/T.20/Doc. n. 22, ampliata mediante l'introduzione di descrittori tipici (erba, foglia, mela, mandorla, pomodoro, erbe aromatiche, ecc.) in aggiunta agli attributi positivi già presenti (fruttato, amaro, piccante) (Analisti Sensoriali Associati) (**Figura 3.1.1**). In tal modo è stato possibile valutare eventuali note caratteristiche. L'intensità dei vari attributi è stata espressa come media dei punteggi di ogni singolo assaggiatore.



Analisti Sensoriali Associati



LOG
Laboratorio di ricerca sugli Oli e Grassi

FOGLIO DEL PROFILO - PRODOTTO: Olio di oliva

	INTENSITA'
PERCEZIONE DEI DIFETTI:	
Riscaldo	_____
Muffa	_____
Avvinato-inacetito-acido-agro	_____
Morchia	_____
Metallico	_____
Rancido	_____
Altro.....	_____
Altro.....	_____
PERCEZIONE DEGLI ATTRIBUTI POSITIVI:	
Fruttato di oliva verde	_____
Fruttato di oliva maturo	_____
Mela	_____
Altra frutta matura	_____
Verde di foglia	_____
Verde di erba	_____
Amaro	_____
Piccante	_____
Dolce	_____
Mandorla	_____
Pomodoro verde	_____
Pomodoro maturo	_____
Carciofo	_____
Altro.....	_____
Altro.....	_____
Luogo e data	
Assaggiatore.....	Campione.....

ASA/DOC 01/25/09/03

Figura 3.1.1. Scheda di valutazione sensoriale

3.1.1.3 Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) - GC/MS

Per analizzare la frazione volatile dell'olio vergine di oliva è stata utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME) come metodo di pre-concentrazione precedente all'analisi GC/MS.

Il pre-arricchimento del campione prima dell'analisi cromatografia mediante Microestrazione in Fase Solida dello spazio di testa statico (HS-SPME) è una tecnica sviluppata nei primi anni '90 da Arthur e Pawliszyn per studiare gli inquinanti nelle acque ed estesa, in seguito, all'analisi del flavour degli alimenti. La tecnica prevede una prima fase di concentrazione/estrazione dei componenti volatili mediante l'esposizione allo spazio di testa di una fibra in silice fusa rivestita da un film relativamente sottile di fase stazionaria polimerica. Durante questa fase si stabilisce un equilibrio tra le concentrazioni degli analiti presenti nello spazio di testa del campione e il rivestimento polimerico della fibra. Dopo un opportuno tempo di estrazione, la fibra viene ritirata nell'ago e rimossa dalla vial contenente il campione per essere inserita direttamente nell'iniettore del GC per la successiva fase di desorbimento. L'analisi mediante SPME presenta numerosi vantaggi come la semplicità, la rapidità, l'eliminazione di solventi, l'alta sensibilità, l'utilizzo di piccole quantità di campione e il basso costo.

Nel presente studio i campioni di olio sono stati analizzati mediante la tecnica SPME impiegando una fibra di Divinilbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS) (Supelco Bellofonte, USA) secondo il principio di adsorbimento-desorbimento illustrato in **Figura 3.1.2**.

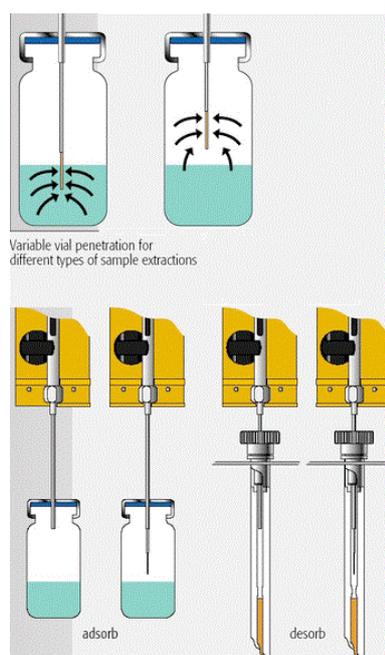


Figura 3.1.2. Procedimento di concentrazione/estrazione della frazione volatile mediante analisi HS/SPME e successivo desorbimento/analisi mediante analisi gas-cromatografica.

L'analisi è stata effettuata ponendo una quantità pari a 3 ml di olio in una vial da 20 ml, addizionata di 3 μ l di una soluzione 2000 ppm di standard interno (isobutile acetato) disciolto in olio rettificato. In tal modo si è ottenuta una concentrazione finale di standard interno nel campione pari a 2000 ppb. Per favorire il trasferimento dei composti volatili nello spazio di testa della vial, il campione è stato posto su un agitatore termico ad una temperatura di 40°C per un tempo di dieci minuti. Successivamente la fibra immersa nello spazio di testa è stata esposta per 30 minuti

mantenendo le suddette condizioni di termoagitazione. Dopo tale periodo di tempo di adsorbimento dei composti volatili sulla fibra, è stata effettuata l'iniezione nel GC-MS (Vichi *et al.*, 2003).

Per l'analisi è stato utilizzato un gascromatografo associato ad uno spettrometro di massa SHIMADZU (mod. QP5050A); software di acquisizione GC-MS Solution vers. 1.2 (Shimadzu Italia, Milano) dotato di una colonna capillare polare in silice fusa mod. SUPELCOWAXTM 10 di 60 m di lunghezza, 0,32 mm di diametro interno e 0,50 µm di film thickness di glicole polietilenico (Supelco, Bellefonte, USA).

Lo spettrometro di massa impiegato è dotato di una sorgente ad impatto elettronico di 70 eV. La temperatura della sorgente è stata di 200°C, la temperatura dell'interfaccia di 250°C, il programma di scansione va da 30 a 250 uma e il tempo di scansione di 0,4 secondi.

Per l'analisi gas-cromatografica sono state adottate le seguenti condizioni operative:

a) camera mantenuta a 40°C per 4 minuti e successivo incremento termico di 3,5°C/min fino ad una temperatura di 240°C mantenuta per 3 min;

b) temperatura iniettore: 230°C; gas di trasporto: elio; gas; flusso di elio in colonna: 1,4 ml/min; rapporto di splittaggio: 1/20.

L'identificazione dei picchi, corrispondenti alle sostanze volatili presenti nello spazio di testa, è stata effettuata mediante il confronto degli spettri di massa e dei tempi di ritenzione (R.T.) delle differenti sostanze volatili con i tempi di ritenzione di standards puri iniettati nelle stesse condizioni operative. Per gli altri composti l'identificazione è stata effettuata utilizzando le librerie (NIST 27, NIST 147, SZTERP) presenti nel software di acquisizione. Per l'identificazione delle principali sostanze volatili sono stati utilizzati i seguenti composti standard per GC: ottano (anidro) 99%, ottene 98%, etilacetato 99,8%, 3-metil-butanale 97%, 3-pentanone 99%, 1-penten-3one ≥ 97%, 2 metil-1-propanolo ≥ 99,9%, 2-eptanone ≥ 99,9%, 1-eptanale ≥ 95%, 2-ottanone ≥ 99,5%, 1-ottanale 99%, cis-3-esenil acetato 98%, *trans*-2-eptenale 98%, nonanale 95%, *cis*-2-esenolo 95%, *trans*-2-ottenale ≥ 99,9%, 1-ottanolo 99%, *trans*-2-decenale~97%, 1-nonanolo ≥ 99,5%, *trans*-2-pentanale 95%, 3-metil-1-butanolo +99%, *trans*-2-esenale 98%, 1-pentanolo ~99%, esilacetato 99%, esanolo 99%, *trans*-3-esen-1-olo 98%, *trans*-2-esen-1-olo 96%, cis-3-esen-1-olo 95%, cis-2-pentenolo 98%, benzaldeide ≥ 99,5 %, 1-penten-3-olo 98%, esanale 95%, pentanale 97%, toluene 99,9% (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germania). Le soluzioni degli standards sono state preparate in olio vegetale rettificato fresco.

Come standard interno (SI) per l'analisi quantitativa è stato utilizzato l'isobutilacetato purissimo ≥ 99,8%, (SIGMA-Aldrich, Steinheim, Germania). La quantità di ciascun analita è stata determinata paragonando l'area del picco ad esso corrispondente con quella del picco dello standard interno, aggiunto ad ogni campione in concentrazione nota (2000 ppb). Le concentrazioni degli analiti sono state espresse in ppb (µg di analita/l di olio). L'analisi è stata effettuata in duplicato.

In **Figura 3.1.3** si riporta un esempio di profilo dei composti volatili analizzati mediante SPME-GC/MS. L'identificazione dei picchi è riportata in **Tabella 3.1.2**.

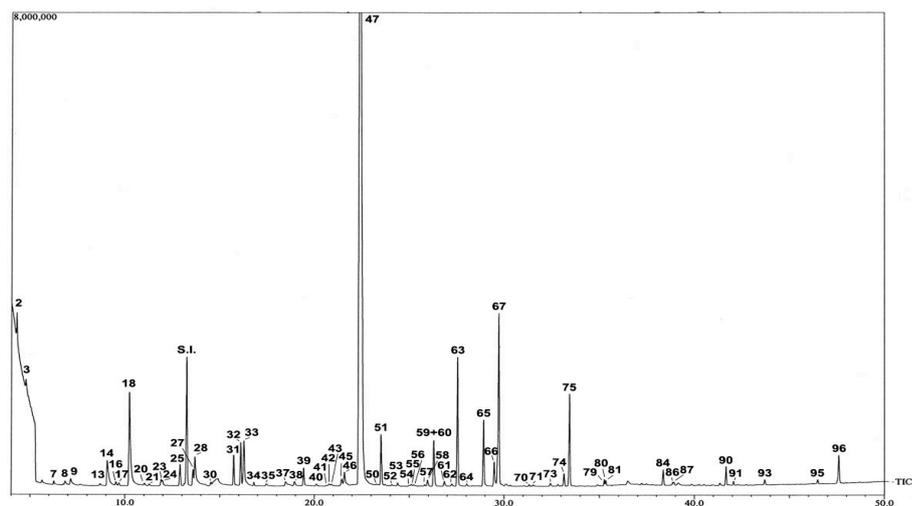


Figura 3.1.3. Cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) di un olio extra vergine (var. *Coratina*) di oliva analizzato mediante SPME-GC/MS. Identificazione dei picchi come in **Tabella 3.1.2.**

Tabella 3.1.2. Composti volatili presenti nell'olio della varietà *Coratina* rilevati mediante analisi SPME GC/MS.

N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto	N° Picco	Tempo di ritenzione	Composto
1	4.015	Pentano	49	22.842	Beta ocimene (cis)
2	4.287	Esano	50	23.268	1-Pentano
3	4.773	1,4 o 1,3 -pentadiene	51	23.487	Beta ocimene (trans)
4	4.891	1,4 o 1,3 -pentadiene	52	24.019	Stirene
5	4.939	Eptano	53	24.392	n-Esilaacetato
6	5.068	Acetaldeide	54	25.020	2-Ottanone
7	6.270	Ottano	55	25.054	1,2,4 Trimetilbenzene
8	6.850	Acetone	56	25.193	Ottanale
9	7.140	Metilacetato	57	25.765	4,8 dimetil-1,3,7-nonatriene
10	7.247	Ottene	58	25.917	2-Pentenolo (trans)
11	7.928	Tetraidrofurano	59	26.267	2-Pentenolo (cis)
12	8.401	Butanale	60	26.294	3-Esenilacetato (cis)
13	8.691	Etilacetato	61	26.898	2-Eptanale (trans)
14	9.064	Metanolo	62	27.186	6-metil-5-epten-2-one
15	9.120	2-Butanone	63	27.578	Esanolo
16	9.526	2-Metilbutanale	64	27.993	3-Esenolo (trans)
17	9.698	3-Metilbutanale	65	28.908	3-Esenolo (cis)
18	10.246	Etanolo	66	29.485	Nonanale
19	10.662	1 Metossi-esano	67	29.702	2-Esenolo (trans)
20	11.025	1,5-esadiene, 3,4-dietil	68	30.049	2-Esenolo (cis)
21	11.286	1,5-esadiene, 3,4-dietil	69	31.044	2-Ottenale (trans)
22	11.363	Etilisobutirrato	70	31.281	3-Ottenolo
23	11.862	3-Pentanone	71	31.593	Eptanolo
24	11.944	Pentanale	72	32.030	Alfabcubebene
25	12.841	1,5-ottadiene, 3-etil	73	32.505	2,4-Eptadienale
26	13.027	1-metossi-3-esene (cis)	74	33.209	Ciclosativene
27	13.586	1,5-ottadiene, 3-etil	75	33.434	Alfa copaene
28	13.626	1-Penten-3-one	76	33.517	Decanale
29	14.261	1 Propanolo	77	33.609	2-4-Eptadienale (trans,trans)
30	14.477	Toluene	78	34.203	Alchene n.i.
31	15.673	3,7-decadiene	79	34.870	Benzaldeide
32	16.045	3,7-decadiene	80	34.980	2-Nonenale (trans)
33	16.217	Esanale	81	35.386	Ottanolo
34	16.469	2 Metil propanolo	82	36.749	Alfbergamontene
35	17.395	2-Pentanale (cis)	83	37.340	Undecanale
36	17.889	Isoamilacetato	84	38.360	Metilbenzoato
37	18.441	2-Pentanale (trans)	85	38.823	Beta farnesene
38	18.898	Xilene (meta o para)	86	38.827	2-Decenale (trans)
39	19.388	3-Pentenolo	87	38.896	Nonanolo
40	20.112	3-metil-2-butenolo	88	40.940	2-4-Nonadienale (trans,trans)
41	20.595	2-Eptanone	89	41.391	Terpene n.i.
42	20.749	Eptanale	90	41.720	Alfa murolene
43	20.913	Xilene (orto o para)	91	42.113	Alfa farnesene
44	21.310	Limonene	92	43.107	Beta sesquifellandrene
45	21.416	3-Metilbutanolo	93	43.651	Metilsalicilato
46	21.569	3-Esenale (cis)	94	44.470	2-4-decadienale (trans,trans)
47	22.379	2-Esenale (trans)	95	46.439	Benzil alcol
48	22.548	Alchene	96	47.645	2-Feniletanolo

3.1.1.4 Analisi statistica

Per l'elaborazione dei dati sono state applicate metodiche di analisi statistica multivariata utilizzando il software XISTAT Addinsoft version 6.1 (Parigi, Francia). In particolare sono state applicate la PCA (Principal Component Analysis) e la PLS (Partial Least Square regression).

La PCA consente di esplorare le possibili relazioni intercorrenti tra variabili, rendendo agevole la descrizione e la rappresentazione di fenomeni multidimensionali. La PLS è un metodo statistico usato per trovare le relazioni fondamentali tra due matrici (X e Y), e consiste in uno sviluppo ulteriore della PCA, in quanto le componenti utilizzate sono derivate non solo dal set di predittori, ma anche dall'insieme delle risposte. In questo modo è possibile massimizzare la varianza non solo delle "X" del nostro sistema, ma anche delle "Y". Così facendo la scelta dei fattori (componenti principali), da impiegare per fare la regressione è fatta in modo ancora più mirato ed efficace. La PLS si differenzia dalla PCA perché utilizza il set di dati delle risposte in modo attivo durante l'analisi statistica, ciò permette di bilanciare meglio l'informazione contenuta nelle "X" e nelle "Y", riducendo l'effetto di grandi ma irrilevanti variazioni dei predittori, ai fini della modellizzazione del fenomeno. In generale, a fronte di una più complicata operatività, la PLS fornisce comunque modelli più semplici di quelli costruibili con la PCA ed è in grado di dare risposte esaurienti anche in presenza di dati poco precisi, casi in cui la PCA può fallire.

Nella PLS effettuata in questo lavoro di tesi il parametro "X" corrisponde agli attributi sensoriali ottenuti dal panel test mentre il parametro "Y" ai principali composti volatili ritrovati nei campioni di olio oggetto di studio.

3.1.2. Risultati e Discussione

I profili sensoriali di oli extra vergini di oliva prodotti in zone geografiche corrispondenti ad alcune Denominazioni di Origine Protetta (DOP) e di oli monovarietali ottenuti da varietà di oliva tradizionali italiane hanno mostrato alcune note sensoriali tipiche come 'pomodoro', 'erbe' ('rosmarino', 'origano', ecc), 'mandorla amara', 'carciofo'.

In **Figura 3.1.4** si riportano esempi di profili sensoriali e relativi cromatogrammi SPME GC/MS di campioni caratterizzati da note tipiche. Tra i vari profili GC/MS riportati si possono osservare marcate differenze per molte aldeidi, alcoli e terpenoidi.

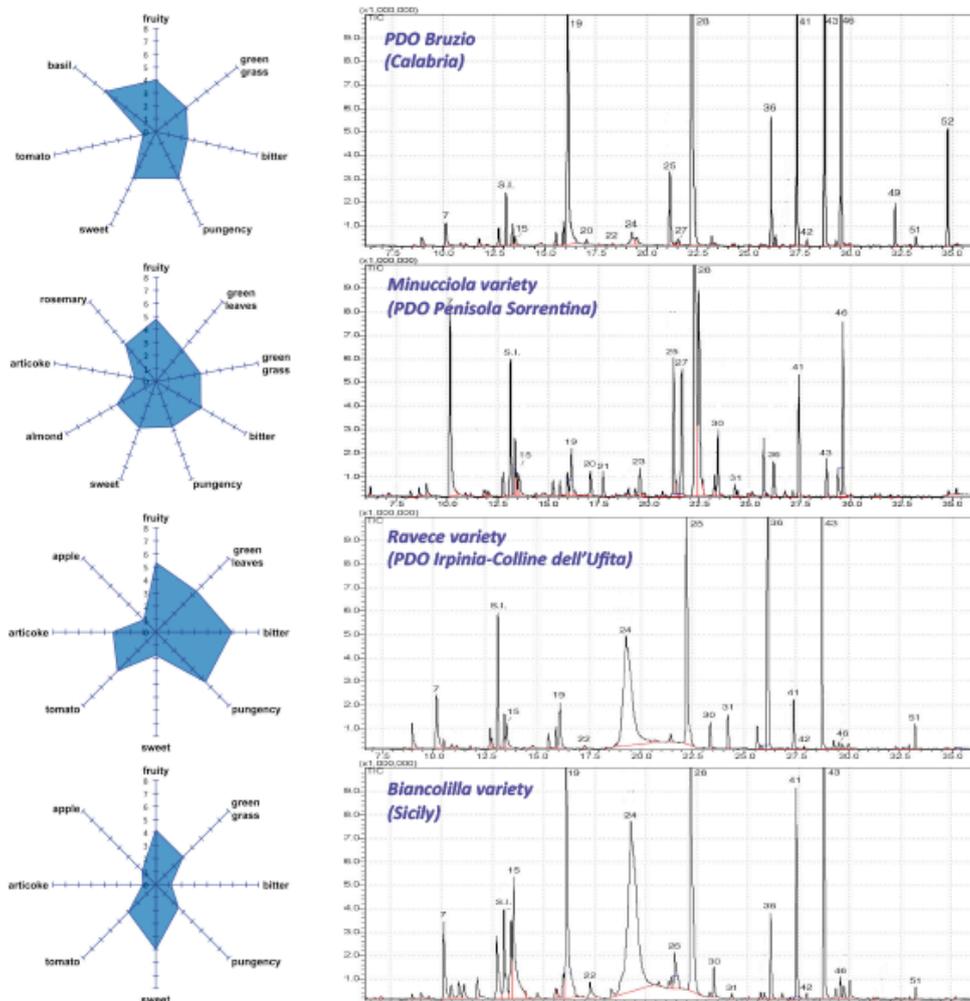


Figura 3.1.4. Profili sensoriali e relativi cromatogrammi SPME GC/MS di oli di diverse cultivar italiane. **Identificazione dei picchi:** 7) etanol, 15) 3 pentenone, 19) hexanal, 20) beta-pinene, 21) beta-phellandrene, 22) *trans*-2-pentenal, 23) beta-myrcene, 24) *cis*-3-hexenal, 25) D-limonene, 26) 3-methyl butanol, 27) Eucalyptol, 28) *trans*-2-hexenal, 30) beta-ocimene, 31) n-hexyl acetate, 36) *cis*-3-hexenyl acetate, 41) hexanol, 42) *trans*-3-hexenol, 43) *cis*-3-hexenol, 46) *trans*-3-hexenol, 52) beta-linalool.

Il campione di olio extravergine di oliva DOP 'Bruzio' (varietà Rossanese), caratterizzato da una tipica nota di basilico, mostra una grande varietà di alcoli C6 (hexanol e *trans*-2-hexenol) e la rilevante presenza di beta-linalolo. La DOP 'Penisola Sorrentina', ottenuto dalla varietà Minucciola e caratterizzato dalla nota sensoriale di 'spezie', è principalmente differenziata dalla presenza di limonene, eucaliptolo e altri terpenoidi. Oli caratterizzati dalla nota sensoriale di 'pomodoro' (provenienti dalle varietà Ravece e Biancolilla) mostrano una maggiore quantità di *cis*-3-esenale.

I profili sensoriali e dei principali componenti volatili rilevati via SPME-GC/MS su 73 campioni di oli extravergini di diverse varietà e provenienza geografica (**tabella 3.1.1**) sono stati analizzate mediante tecniche statistiche multivariate al fine di individuare le correlazioni tra gli attributi sensoriali e le componenti volatili che potrebbero essere utilizzate come possibili marcatori oggettivi della provenienza varietale e/o geografica.

A tale scopo, la matrice di dati, costituita da 73 osservazioni (campioni di olio) associata all'intensità delle percezioni di 8 descrittori sensoriali olfatto-gustativi (matrice X) ed a 16 componenti volatili (matrice Y) è stata preliminarmente studiata mediante analisi delle componenti principali (PCA) (**Figura 3.1.5**).

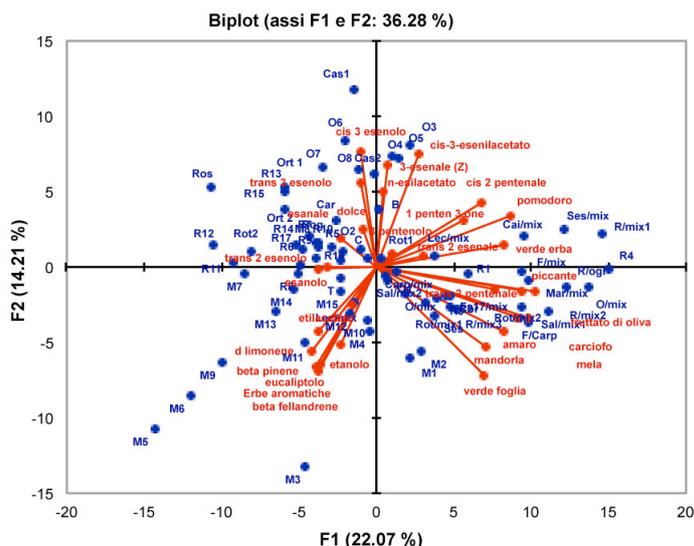


Figura 3.1.5. BiPlot (varianza spiegata del 36,28%) ottenuta dalla Analisi delle Componenti Principali (ACP) degli oli campionati, effettuata su i principali composti volatili ed il risultato dell'analisi organolettica.

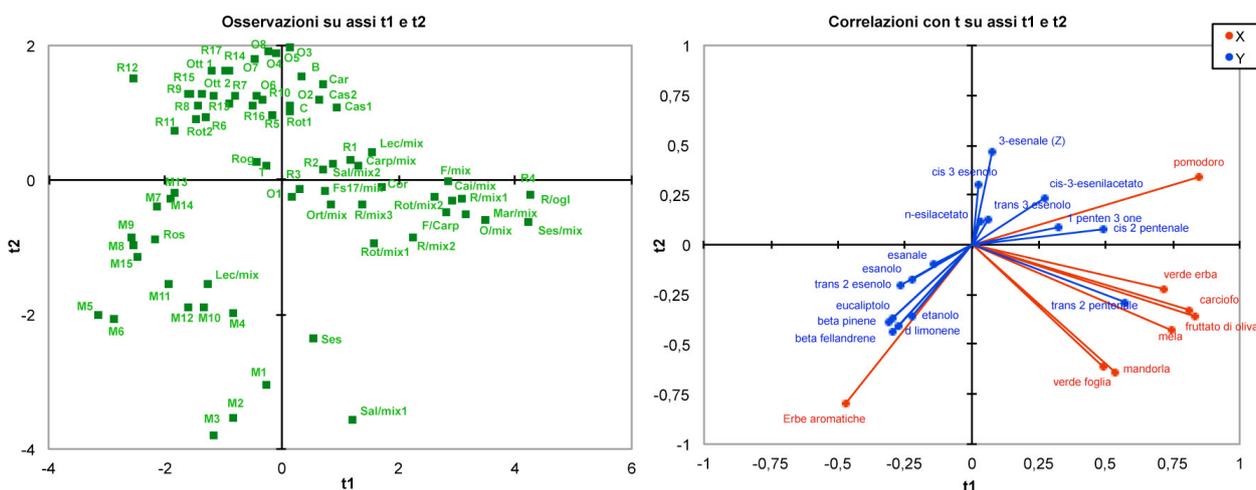


Figura 3.1.6. PLS (Partial Least Square, PLS) eseguita sui dati ottenuti dalla valutazione sensoriale e dall'analisi delle sostanze volatili di oli vergini di oliva ottenuti dalle varietà Ravece, Ortime, Rotondella, Coratina, Munucciola Cassanese e Tonda.

Nella PCA le prime due componenti principali (F1 e F2), pur spiegando solo il 36,28% della variabilità, mostrano una grande dispersione dei dati.

Alcuni campioni di oli monovarietali, quali quelli provenienti dalla varietà Minucciola (M) della penisola Sorrentina e Ortime (O) beneventana e Ravece (R) irpina sono discriminati abbastanza chiaramente dalla F2. La F1 appare invece correlata all'intensità del fruttato di oliva ed alle note verdi ed erbacee.

Correlazioni possono essere poi evidenziate tra alcune variabili sensoriali e strumentali. In particolare, le molecole di natura terpenica risultano correlate con l'attributo sensoriale di erbe aromatiche, tipiche dell'olio della varietà Minucciola, mentre diverse molecole derivanti dalla via delle LOX (*trans*-2 esenale, 1-penten-3-one, pentenolo, *cis*-2-pentenale) con le note verdi, erbacee, e l'intensità del fruttato di oliva. L'attributo di "pomodoro" appare correlato sia con la *trans*-2-esenale che con i composti C5 della via delle LOX (1-penten-3-one, *cis*-2-pentenale).

Altre molecole C6 della via delle LOX (*cis*-3-esenolo, *trans*-3-esenolo, *cis*-3-esenilacetato, *cis*-3-esenale, *n*-esilacetato) discriminano lungo la F2 gli oli delle varietà Ortime e Cassanese.

Successivamente le matrici dei dati X e Y sono state sottoposte ad una analisi PLS (*Partial Least Square*) in modo da valutare con più specificità le correlazioni tra i singoli attributi sensoriali (X) ed i componenti volatili (Y) (**Figura 3.1.6**). Come si osserva si ottiene un migliore raggruppamento delle varietà Minucciola e Ortime/Ravece, che risultano chiaramente distinte tra di loro sull'asse t2, e dagli altri oli ottenuti da mix varietali, sull'asse t1. Considerando solo gli oli monovarietali di Minucciola e Ortime/Ravece (**Figura 3.1.7**) si osserva l'influenza delle caratteristiche sensoriali che permette di separarle lungo l'asse t1.

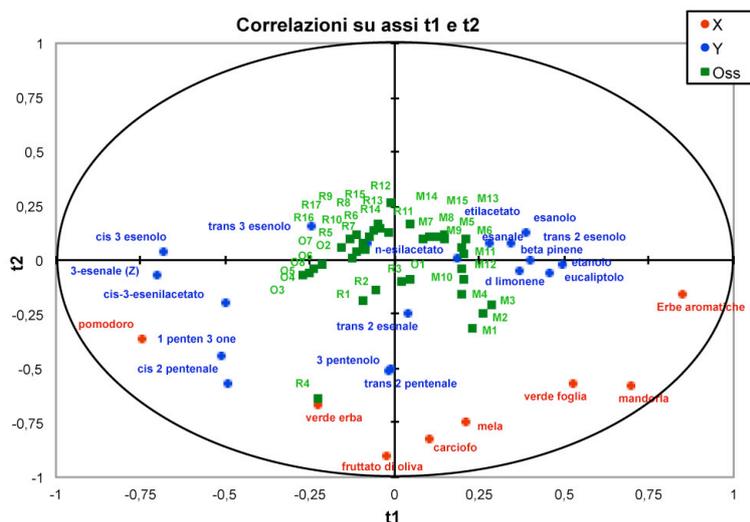


Figura 3.1.7. PLS (Partial Least Square, PLS) eseguita sui dati ottenuti dalla valutazione sensoriale e dall'analisi delle sostanze volatili di oli vergini di oliva ottenuti dalle varietà Ravece, Ortime, Minucciola.

3.1.3. Conclusioni

I risultati fanno ipotizzare che l'analisi sensoriale e i dati GC/MS possono consentire di trovare alcune possibili marcatori molecolari di tipicità di oli extra vergine di oliva a Denominazioni di Origine Protetta (DOP). L'identificazione delle molecole chiave legate ai peculiari attributi sensoriali potrebbero permettere anche di migliorare alcuni aromi caratteristici dell'olio attraverso la modulazione delle pratiche agronomiche e tecnologiche per ottenere un prodotto con migliori qualità sensoriali.

Inoltre, è possibile intravedere un'ipotesi più suggestiva da queste osservazioni preliminari. È noto che le piante rispondono agli attacchi di artropodi, con una emissione indotta di sostanze volatili (Mumm *et al*, 2008). Questi volatili della pianta indotti dall'attacco di erbivori possono attrarre predatori e parassiti, in grado di attivare le difese inducibili delle piante. La combinazione di studi eco-fisiologiche e sensoriali, potrebbe contribuire a comprendere non solo le funzioni di difesa indiretta delle piante e le interazioni tra condizioni di varietà e l'ambiente, ma anche la base della tipicità sensoriale di alimenti vegetali.

3.2 CARATTERIZZAZIONE DI CONSERVE SOTT'OLIO

Per verificare l'effetto dell'olio extravergine di oliva come olio di copertura nelle conserve vegetali si è valutato la qualità sensoriale di pomodorini parzialmente essiccati (semi-dry) preparati sott'olio con diversi oli alimentari (olio extravergine di oliva, olio di oliva e olio di girasole) stimandone l'accettabilità sensoriale e studiando le modifiche del profilo aromatico degli oli di copertura dopo stabilizzazione delle conserve per 6 mesi e conservazione fino a 12 mesi.

3.2.1 Materiali e metodi

3.2.1.1 Campionamento

I campioni analizzati sono stati prodotti utilizzando pomodorini del tipo "cherry" parzialmente disidratati (semi-dry), addizionati di olio di copertura in contenitori di vetro e sottoposti a trattamento termico di stabilizzazione (pastorizzazione) seguito da raffreddamento.

Il processo produttivo è stato completamente realizzato presso l'Azienda "DE CARLO s.r.l.", Bitritto (BA).

Gli oli utilizzati come liquido di copertura sono stati *Olio Extra Vergine d'Oliva* "DE CARLO s.r.l."; *Olio d'Oliva e Olio di Semi di Girasole* "AUCHAN".

Sono stati prodotti, per ogni tipo di olio, 10 vasetti di vetro dal peso netto di 1Kg/cdu seguendo tale proporzione: 660 g di pomodorini semi-dry + 330 g di olio. I campioni sono stati analizzati previa stabilizzazione delle conserve per 6 mesi.

In **Figura 3.2.1** si riporta il diagramma produttivo effettuato dall'Azienda. Si precisa che, per evitare interferenze nella realizzazione delle prove e nell'interpretazione dei risultati, non sono state aggiunte spezie.

In **Figura 3.2.2** si riporta il disegno sperimentale seguito nel corso della caratterizzazione delle conserve. Le analisi svolte hanno riguardato gli oli tal quali e di copertura delle conserve prelevati dopo 6 mesi e un anno dalla loro data di produzione e confezionamento. I dati relativi alla valutazione qualitativa degli oli non sono riportati nel presente lavoro di tesi (Ascione, 2010; Russo, 2011). È stato valutato il profilo sensoriale dei pomodorini sott'olio ed è stato, inoltre, condotto un Preference Test con un gruppo di consumatori.

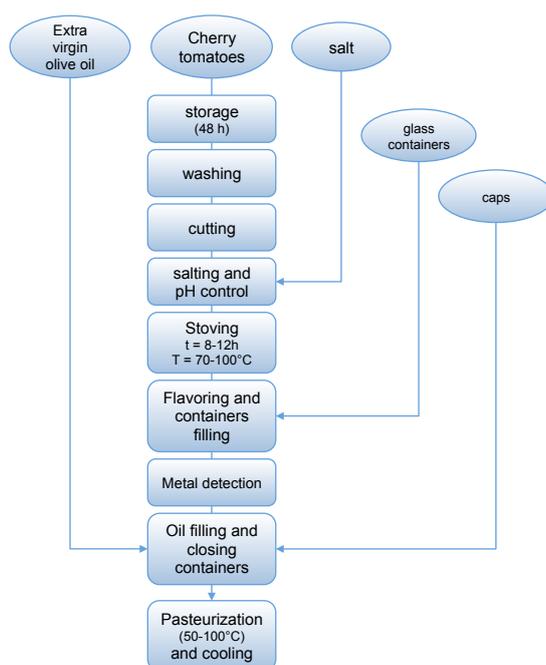


Figura 3.2.1 Diagramma produttivo seguito Presso l'Azienda "De Carlo"

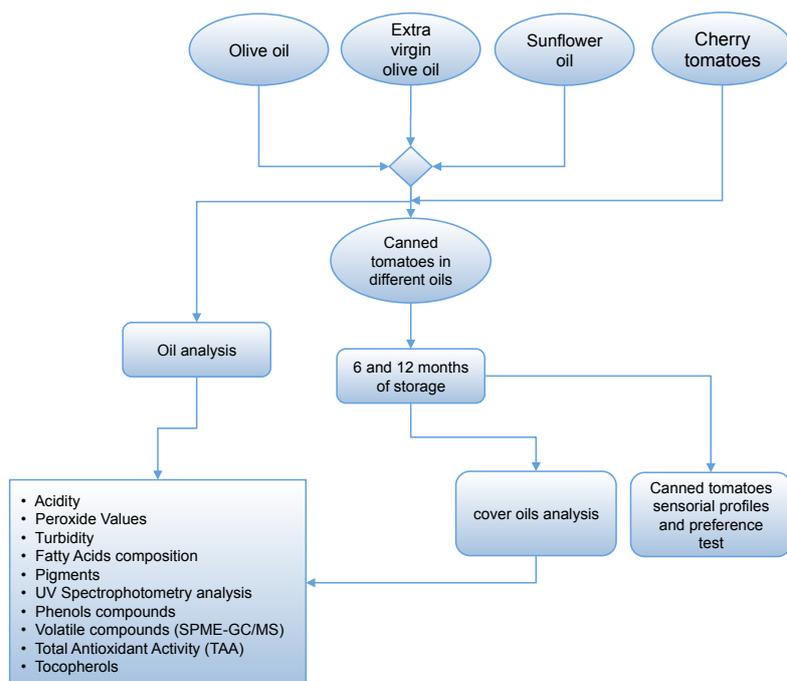


Figura 3.2.2 Disegno sperimentale

3.2.1.2. Valutazione dei pigmenti

La determinazione della clorofilla e dei carotenoidi viene effettuata misurando l'assorbimento della soluzione di olio in esano (1:1 v/v) a determinate lunghezze d'onda: a 670 nm per la clorofilla, a 415-450-475 nm per i carotenoidi (Minguez *et al.*, 1991).

Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrofotometro a doppio raggio UV-visibile Shimadzu mod.UV-1601 (Shimadzu Italia, Milano).

3.2.1.3. Determinazione della composizione in tocoferoli

I tocoferoli sono i più conosciuti tra gli antiossidanti naturali, si ritrovano prevalentemente nei grassi vegetali dove svolgono la loro azione antiossidante come miscela di α , β , γ , δ -tocoferoli.

I tocoferoli dell'olio e della frazione oleosa dei tre sistemi sono stati determinati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) su colonna a fase inversa.

Procedimento. A 0,20 g di olio sono aggiunti 3 ml di etile acetato. L'analisi quantitativa dei singoli tocoferoli è stata condotta con riferimento ad uno standard esterno (α -tocoferolo) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione.

I risultati sono stati espressi come α -tocoferolo (mg/kg di olio) (Tonolo & Marzo, 1989).

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- metanolo + acqua + acetonitrile (73.2 : 1.8 : 25 v/v/v);
- acetato di etile.

È stata utilizzata una eluizione isocratica dell'eluente A per un tempo di 19 min; dopo completa eluizione dei tocoferoli si è eseguito un lavaggio della colonna passando, in circa un minuto, nelle stesse condizioni di flusso dal 100% di eluente A al 100% di eluente B; dopo il tempo necessario al lavaggio (circa 15 min) si è passati nuovamente al 100% dell'eluente A.

Sono stati utilizzati:

- un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rivelatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna : 1,8 ml/min. Quantità iniettata: 20 µl.
- l'analisi è stata condotta ad una lunghezza d'onda del rivelatore di 290 nm.

3.2.1.4. Caratterizzazione della componente fenolica

Le sostanze fenoliche sono state determinate seguendo un metodo messo a punto per la loro estrazione quantitativa dall'olio e sono state analizzate mediante HPLC.

Partendo dalla metodica classica di estrazione descritta da Vasquez-Roncero (1978), si sono apportate alcune modifiche allo scopo di minimizzare i volumi di solvente utilizzati.

Procedimento. Un'aliquota di campione di olio (10 g) disciolto in esano (10 ml) è stata estratta in imbuto separatore con una miscela acqua/metanolo (40/60 v/v) (3x7ml); l'estratto idroalcolico ottenuto è stato lavato con esano per eliminare eventuali contaminazioni oleose e centrifugato per 10 minuti a 3500 giri/min.; la fase metanolica è stata raccolta in un pallone ed evaporata sottovuoto in evaporatore rotante (40°C). Il residuo è stato ripreso con 2 ml di metanolo ed un'aliquota di tale soluzione è stata utilizzata per l'analisi HPLC.

Per la separazione delle sostanze fenoliche si è utilizzata la cromatografia HPLC. È stata considerata come metodica di riferimento quella di Tsimidou *et al.*, (1992b).

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- acqua + acido trifluoroacetico (TFA) al 3%;
- metanolo 20% + acetonitrile 80%.

È stato utilizzato un gradiente di eluizione che parte dal 5% di metanolo/acetonitrile per arrivare in un tempo di 35 min al 98%.

Sono stati utilizzati:

- un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rivelatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- una colonna a fase inversa (Spherisorb S5 ODS3 250 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna: 1 ml/min. Quantità iniettata: 20µl.

L'analisi quantitativa dei singoli componenti è stata condotta con riferimento ad uno standard esterno (tirosolo) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione. L'identificazione dei principali picchi è stata effettuata per comparazione con i tempi di ritenzione di standard puri e sulla base degli spettri UV rilevati con il detector DAD. L'analisi quantitativa è stata condotta ad una lunghezza d'onda del rivelatore: 279 nm.

3.2.1.5. Misura dell'attività antiossidante (metodo ABTS+)

Questo metodo sfrutta la capacità delle sostanze antiossidanti di ridurre il catione radicalico ABTS⁺ un cromoforo blu-verde con un massimo di assorbimento a 734 nm.

Il catione radicalico è preparato e successivamente aggiunto alla matrice di cui si vuol valutare il contenuto in antiossidanti.

In seguito alla riduzione operata dalle sostanze antiossidanti, il valore di assorbanza diminuisce; dalla percentuale di inibizione dell'assorbanza si ricava il valore di attività antiossidante della sostanza in esame.

I valori ottenuti sono riportati in funzione di uno standard, il Trolox, un analogo della vitamina E, e l'unità di attività antiossidante è definita come TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), cioè come concentrazione di Trolox (μM) che ha attività antiossidante equivalente ad una soluzione 1 mM della sostanza in esame.

Preparazione del radicale ABTS⁺. Per la preparazione del radicale ABTS⁺ sono stati pesati 19,2 mg del sale di ammonio del 2-2'-azinobis-(acido 3-etilenbenzotiazoline-6-sulfonico) (ABTS), poi disciolti in 5 ml di acqua deionizzata, così da ottenere una concentrazione finale pari a 7 mM.

Sono stati aggiunti in seguito, 88 μl di una soluzione 140 mM di persolfato di potassio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) (37,8 mg in 1 ml di acqua deionizzata).

La soluzione è stata conservata al buio in frigo per una notte, al fine di ottenere la formazione del catione radicalico ABTS⁺.

Al momento dell'analisi, la soluzione del catione è stata diluita con etanolo in modo da ottenere un'assorbanza pari a $0,700 \pm 0,100$ a 734 nm (bianco con etanolo) (normalmente è necessaria una diluizione di circa 1:88).

Determinazione della retta di calibrazione. Sono state preparate diverse concentrazioni di Trolox diluito con etanolo. È stata preparata una soluzione madre di Trolox 1,8mM (22,5mg in 50 ml) e di essa si sono effettuate le seguenti diluizioni:

- 1:100 18 μM
- 1:50 36 μM
- 1:30 60 μM
- 1:20 90 μM
- 1:15 120 μM

È stato preparato un bianco con 1 ml di soluzione di ABTS⁺ + 100 μl di etanolo e di esso si sono effettuate 3 letture a 734, dopo 2,5 minuti.

In seguito sono state preparate le cuvette con 1 ml di soluzione di ABTS⁺ + 100 μl della soluzione di Trolox e di esse si sono effettuate 3 letture per ciascuna diluizione, a 734 nm, dopo 2,5 min. L'assorbanza deve essere compresa nell'intervallo di lettura della retta di calibrazione, in questo caso tra 0,2 e 0,7; se ciò non accade, è necessario cambiare le diluizioni di Trolox.

Per la determinazione della retta di taratura è stato necessario calcolare per ciascuna concentrazione la % di inibizione secondo la seguente formula:

$$\text{Inibizione di } A_{734} \% = (1 - A_f/A_0) * 100$$

dove: A_0 è l'assorbanza del bianco (media delle 3 letture)

A_f è l'assorbanza misurata dopo 2,5 minuti dall'aggiunta del campione antiossidante.

Dopo aver costruito la retta di taratura, è stata determinata l'equazione della retta:

% di inibizione vs. μM Trolox

Determinazione dell'attività antiossidante di un campione. Si è preparato il bianco con 1 ml della soluzione di ABTS⁺ + 100 μl di esano (solvente in cui è stato disciolto l'olio) e di esso si sono effettuate 3 letture a 734 nm dopo 2,5 minuti.

Sono state preparate le cuvette con 1 ml della soluzione di ABTS⁺ + 100 μl del campione opportunamente diluito (1:100 v/v) e di esse sono state effettuate 3 letture a 734 nm dopo 2,5 minuti.

È stata determinata, in seguito, la % di inibizione secondo la seguente formula:

$$\text{Inibizione di } A_{734} \% = (1 - A_f/A_0) * 100$$

dove: A_0 è l'assorbanza del bianco (media delle 3 letture)

A_f è l'assorbanza misurata dopo 2,5 minuti dall'aggiunta del campione antiossidante.

Mediante l'equazione della retta di calibrazione, è stato calcolato l'equivalente in μM di Trolox.

Si è moltiplicato per il fattore di diluizione, che nel complesso è pari alla diluizione del campione (1:100) per 11, cioè per la diluizione effettuata al momento dell'aggiunta di 100 μl di campione ad 1 ml della soluzione di ABTS⁺.

Si è ottenuto in tal modo, la Total Antioxidant Activity (TAA) del campione espressa in μmol Trolox / L di campione. (Pellegrini et al., 1999; Pellegrini *et al.*, 2001).

3.2.1.6. Valutazione Sensoriale

Per effettuare l'analisi sensoriale delle conserve oggetto di studio è stato effettuato un primo approccio per valutare la preferenza dei consumatori utilizzando il metodo dell'ordinamento multiplo. Questo tipo di test è indicato per discriminare, in ordine di preferenza, due o più campioni utilizzando almeno 20-30 consumatori (Meilgard *et al.*, 1999; Porretta, 2000; Pagliarini, 2002).

Ad un gruppo di 40 assaggiatori non addestrati (consumatori) sono stati presentati, in una sola seduta e simultaneamente i tre campioni di pomodorini sgocciolati da ordinare in base alla propria preferenza. Il protocollo di lavoro seguito ha permesso di ottimizzare le condizioni operative: identificazione dei campioni con codici numerici a tre cifre; identificazione di tutte le possibili sequenze di assaggio; ordine randomizzato.

L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata effettuata mediante il *Test di Friedman* calcolando il valore del parametro *Chi-Quadrato X^2* , in funzione del numero di campioni e del numero di assaggiatori utilizzati. Confrontando il valore ottenuto con il valore critico tabulato per $\alpha = 0,05$ e numero dei gradi di libertà (df) del parametro, si è potuto stabilire la significatività delle differenze tra i campioni. Quindi si è proceduto al confronto dei singoli campioni con la somma dei ranghi per valutarne le eventuali differenze. Mediante il calcolo della *Minima Differenza Significativa di Classificazione (MDSC)* si è potuto determinare se la differenza nella classificazione di preferenza risulta significativa.

Al fine di definirne il profilo sensoriale complessivo, gli stessi campioni sono stati sottoposti ad analisi sensoriale mediante utilizzo di assaggiatori addestrati. L'analisi è stata condotta utilizzando una apposita scheda in cui gli assaggiatori hanno riportato l'intensità dei diversi descrittori su scale non strutturate.

3.2.1.7. Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) - GC/MS

Per analizzare la frazione volatile degli oli tal quali e degli oli di copertura a 6 e 12 mesi è stata utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME) come metodo di pre-concentrazione precedente all'analisi GC/MS. La metodica è stata descritta in dettaglio nel capitolo precedente (§ 3.1.1).

3.2.2. Risultati e Discussione

Valutazione della qualità nutrizionale

Nella valutazione dei tocoferoli totali degli oli esaminati (**tabella 3.2.1.**; **figura 3.2.3**), riscontriamo, nelle conserve di dodici mesi, un lieve aumento dei suddetti composti negli oli di copertura, rispetto ai tal quali; livelli elevati nell'olio di girasole, medio - bassi nell'olio extra vergine e bassi nell'olio d'oliva; invece rispetto ai valori riscontrati sei mesi fa, il contenuto dei tocoferoli risulta essere più basso in tutti i diversi oli alimentari.

L' α - tocoferolo è presente in tutti i campioni esaminati e rappresenta la frazione più abbondante dei tocoferoli totali; mentre β , γ , δ - tocoferoli si apprezzano in quantità rilevanti solo nell'olio di girasole e nel corrispettivo olio di copertura.

Tabella 3.2.1. Contenuto di tocoferoli (ppm α - tocopherol) rilevati nei campioni di olio mediante HPLC

Type Oil	Tocopherols			
	a	b + g	d	total
A Extra-virgin olive oil	222	0,1	0,0	222,1
A* Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes	238	0,1	0,0	238,1
A** Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes after 1	227	4,8	0,0	231,8
B Sunflower oil	621	17,9	4,5	643,4
B* Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes	672	25,8	4,2	702,0
B** Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes after 1	635	19,8	1,2	655,8
C Olive oil	140	0,1	0,0	140,1
C* Olive oil with semi-dried tomatoes	144	0,1	0,0	228,0
C** Olive oil with semi-dried tomatoes after 1 year	136	5,9	1,6	143,5

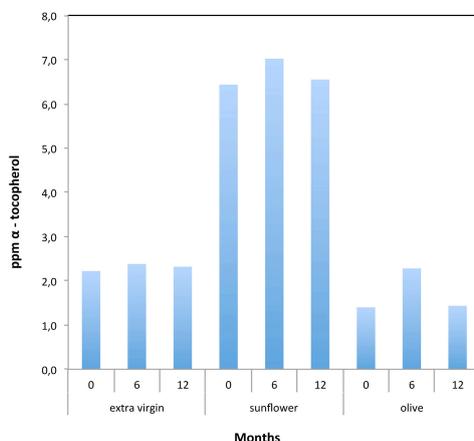


Figura 3.2.3. Tocoferoli totali degli oli utilizzati per le conserve.

In **tabella 3.2.2** e **figura 3.2.4** vengono mostrati i livelli di clorofilla e carotenoidi che evidenziano un significativo decremento della clorofilla nell'olio extra-vergine, e un importante arricchimento di carotenoidi, che si può attribuire alla migrazione del licopene, negli oli di copertura delle conserve di pomodorini semy-dry, soprattutto in quelle di olio extra vergine. In accordo con Parker (1988), Hussein *et al.* (1990), Stahl & Sies (1992), Graziani *et al.* (2003), si osserva dunque una ripartizione nella fase lipidica del licopene con conseguente aumento della sua biodisponibilità dopo il trattamento termico del sistema olio/pomodoro; questo effetto è amplificato, determinando un aumento graduale del carotenoide nella fase oleosa, all'aumentare della temperatura (fase di pastorizzazione). Nell'olio extra vergine di copertura constatiamo i valori di carotenoidi molto più alti, rispetto agli altri due tipi di oli di copertura anche dopo dodici mesi di conservazione, poiché sono presenti in elevate quantità già nel tal quale. Le concentrazioni dei pigmenti nell'olio di governo dipendono, oltre che dalla loro concentrazione nella matrice vegetale, dalle caratteristiche dei tessuti del pomodoro e dalla loro superficie specifica (De Giorgi *et al.*, 2000).

Tabella 3.2.2. Valori spettrofotometrici dell'assorbimento alle lunghezze d'onda di 450 nm (carotenoidi) e 670 nm (clorofille).

Symbol	Type Oil	Chlorophyll		Carotenoids	
		670		450	
		average ± SD	SD	average ± SD	SD
A	Extra-virgin olive oil	0,332 ± 0,003		0,878 ± 0,000	
A*	Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes	0,242 ± 0,032		2,075 ± 0,070	
A**	Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes after 1 year	0,195 ± 0,018		2,690 ± 0,095	
B	Sunflower oil	0,000 ± 0,000		0,000 ± 0,000	
B*	Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes	0,024 ± 0,002		1,117 ± 0,030	
B**	Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes after 1 year	0,016 ± 0,007		1,319 ± 0,098	
C	Olive oil	0,018 ± 0,006		0,107 ± 0,028	
C*	Olive oil with semi-dried tomatoes	0,012 ± 0,001		0,683 ± 0,079	
C**	Olive oil with semi-dried tomatoes after 1 year	0,022 ± 0,009		1,505 ± 0,051	

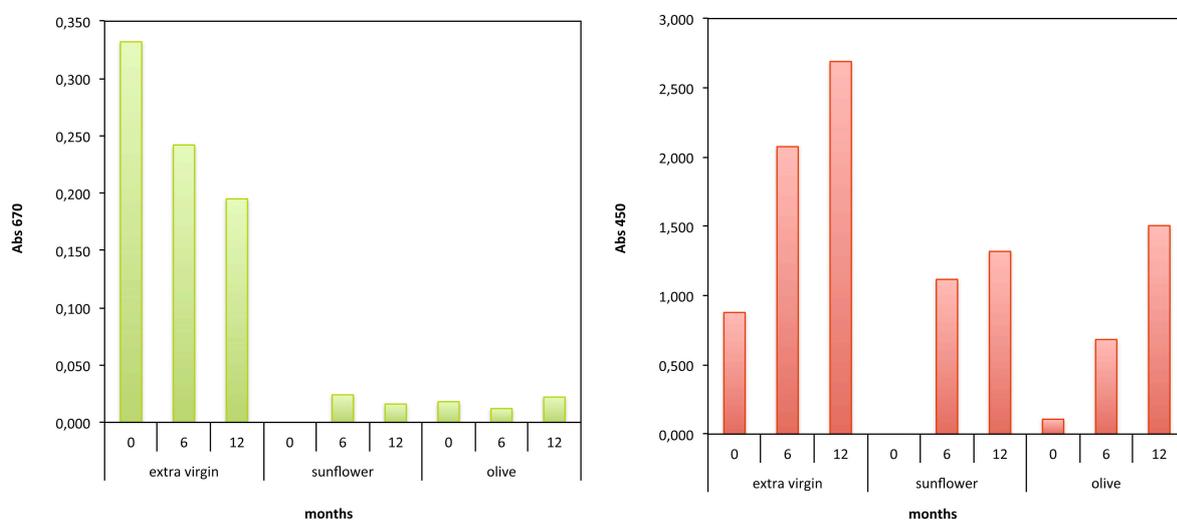


figure 3.2.4. Valori spettrofotometrici dell'assorbimento delle clorofille (670 nm) e dei carotenoidi (450 nm).

In **tabella 3.2.3** e **figura 3.2.5** si riportano i profili HPLC dei composti fenolici estratti dagli oli di copertura delle conserve a 6 e 12 mesi, e sugli oli tal quali.

Tabella 3.2.3. Composti fenolici (ppm di Tirosole) rilevati nei campioni di olio mediante HPLC

Symbol	Type Oil	Phenolic compounds** (ppm Tyrosol)								Totale
		OHTy	Ty	OHTy-EDA	Ty-EDA	L	Naringenin	OHTy-EA	Ty-EA	
		average ± SD	average ± SD	average ± SD	average ± SD	average ± SD	average ± SD	average ± SD	average ± SD	
A	Extra-virgin olive oil	27,0 ± 0,0	36,4 ± 0,0	42,5 ± 2,3	75,6 ± 2,1	43,9 ± 1,9	0,0 ± 0,0	36,8 ± 2,1	15,4 ± 1,0	291,1
A*	Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes	2,6 ± 0,1	2,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,3 ± 0,0	15,6 ± 0,0	75,2 ± 1,2	2,7 ± 0,0	2,4 ± 0,0	120,3
A**	Extra-virgin olive oil with semi-dried tomatoes after 1 year	1,6 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,0 ± 0,0	11,6 ±	64,1 ± 1,9	nq	nq	80,4
B	Sunflower oil	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
B*	Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	95,1 ± 1,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	95,1
B**	Sunflower seed oil with semi-dried tomatoes after 1 year	nq	nq	nq	nq	nq	76,4 ± 1,7	nq	nq	76,4
C	Olive oil	0,2 ± 0,0	1,5 ± 0,0	2,8 ± 0,8	3,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	4,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	24,1
C*	Olive oil with semi-dried tomatoes	2,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,6 ± 0,0	97,0 ± 1,8	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	115,0
C**	Olive oil with semi-dried tomatoes after 1 year	nq	nq	nq	nq	nq	81,6 ± 1,1	nq	nq	81,6

** identifying compounds: OHTy: Hydroxy Tyrosol, Ty: Tyrosol, OHTy-EDA: Decarbossimethyloleuropein aglycone dialdehyde form, Ty-EDA: Decarbossimethyligstoside aglycone dialdehyde form, L: Lignans (Pinoresinol + 1-acetoxy-pinoresinol), OHTy-EA: oleuropein aglycone, Ty-EA: ligstoside aglycone aldehyde form.

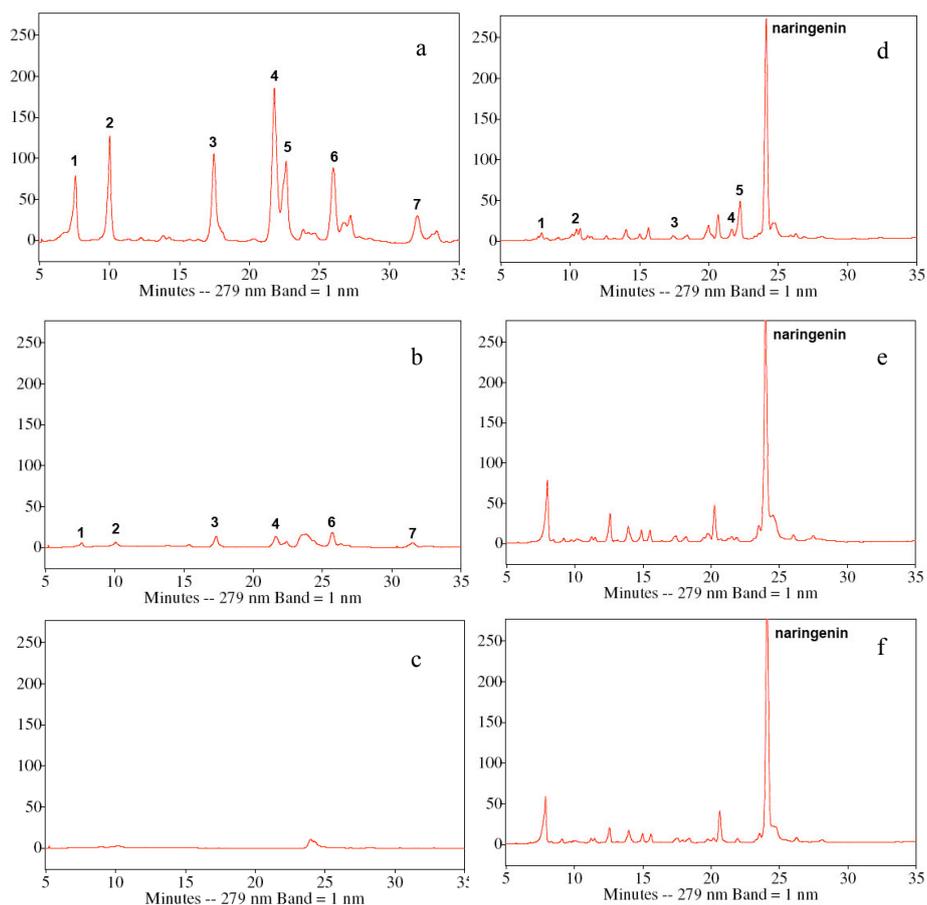


Figura 3.2.5. Cromatogrammi HPLC-DAD dei composti fenolici degli oli utilizzati per le conserve (**a:** Extra Virgin Olive Oil, **b:** Olive oil **c:** Sunflower Oil prima dell'inscatolamento. **d, e, f):** gli stessi oli dopo 12 mesi di stoccaggio dei pomodori.

Identificazione dei composti: 1) OHTy, Idrossitirosolo, 2) Ty, Tirosolo, 3) OHTy-EDA, form dialdehydic of decarbossimetiloleuropeina aglicone, 4) Ty-EDA, forma dialdeidica del decarbossimetilligstroside aglicone, 5) PR, pinoresinolo, 6) OHTy-EA, oleuropeina aglicone, 7) Ty-EA, form aldehyde of ligstroside aglicone. Naringenin is indicator in photos d, e and f

Gli oli di copertura, nei primi sei mesi, si arricchiscono di un composto in particolare: la naringenina, il principale flavonoide del pomodoro. La naringenina si accumula esclusivamente nella buccia e si forma in corrispondenza della colorazione del frutto (Orlando, 2009). Essendo le conserve sottoposte al trattamento di pastorizzazione, possiamo verificare che dopo il trattamento termico, la concentrazione di naringenina nell'olio a 6 mesi non è molto elevata.

Tra i 6 e i 12 mesi si osserva solo un lieve decremento nella concentrazione di tale composto.

Dopo dodici mesi, gli oli di copertura delle conserve presentano una quantità di composti fenolici molto bassa (quasi nulla) ad eccezione della naringenina, che al termine della sperimentazione risulta essere, il composto fenolico più abbondante nella frazione oleosa del sistema. Tale comportamento ricalca quello rilevato nelle salse olio-pomodoro dopo un prolungato processo di cottura (Orlando, 2009).

La misura dell'Attività Antiossidante Totale (**tabella 3.2.4**) effettuata negli oli di copertura, rispetto a quella rilevata sugli oli tal quali, aumenta in tutti i tipi di oli sottoposti all'analisi sia dopo sei mesi che dopo dodici mesi di vita commerciale delle conserve. Ciò può essere messo in relazione alla diffusione dei pigmenti liposolubili dei vegetali

(carotenoidi quale licopene, composti fenolici, clorofilla e flavonoidi come la naringenina) nell'olio di copertura, con un effetto più o meno marcato sul colore e sulle proprietà antiossidanti (De Giorgi *et al* 2000).

Tabella 3.2.4. Attività antiossidante totale rilevata negli oli tal quali e dopo inscatolamento

	Month	TAA (Total Antioxidant Activity) mmol Trolox/l campione average ± st.dev.
Extra Virgin Olive Oil	0	12,4 ^a ± 0,4
Extra Virgin Olive Oil with dried tomatoes	6	14,8 ^b ± 1,2
Extra Virgin Olive Oil with dried tomatoes after 1 year	12	20,1 ^c ± 1,1
Sunflower Oil	0	11,9 ^a ± 1,0
Sunflower Oil with dried tomatoes	6	15,9 ^b ± 1,7
Sunflower Oil with dried tomatoes after 1 year	12	27,9 ^c ± 1,0
Olive Oil	0	2,4 ^a ± 0,4
Olive Oil with dried tomatoes	6	5,4 ^b ± 0,5
Olive Oil with dried tomatoes after 1 year	12	17,3 ^c ± 1,2

*Different letters, on same column, indicate significantly (ANOVA) different values (p<0.05) for each oils.

In **figura 3.2.6** l'olio di girasole risulta presentare una maggiore attività antiossidante, dopo sei mesi +33% rispetto al tal quale, dopo dodici mesi maggiore del 100%.

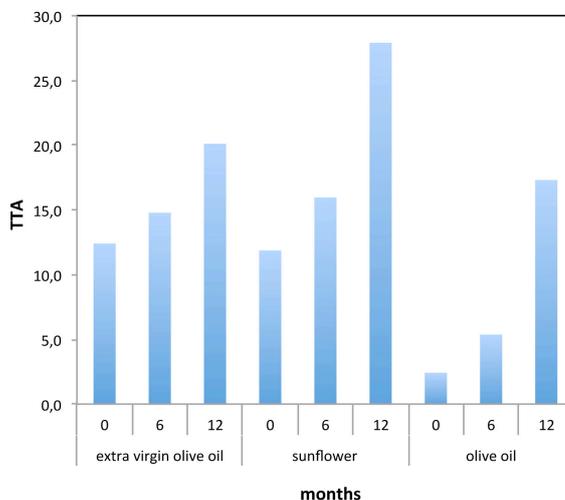


Figura 3.2.6. Attività antiossidante totale degli oli tal quali e dopo inscatolamento,

L'elevato contenuto di tocoferoli (α , β , γ , δ) dell'olio di girasole e la ripartizione dei carotenoidi e flavonoidi (naringenina), potrebbero spiegare la più alta capacità antiossidante misurata anche in relazione a

- Effetto sinergico tra tocoferoli carotenoidi e flavonoidi;
- Aumento della torbidità dovuto a una microdispersione di goccioline di acqua e colloidali dal pomodoro all'olio che trasforma l'olio in un sistema micellare (w/o) in cui gli antiossidanti lipofili come carotenoidi e tocoferoli svolgono con maggiore efficacia il loro ruolo antiossidante (Frankel, 1998)

Un andamento simile, meno intenso, si rileva nell'olio extravergine di copertura; esso registra un incremento di antiossidanti totali di ~20% a sei mesi e ~62% a dodici; l'olio di oliva è il campione che si arricchisce maggiormente rispetto al tal quale (~600%) dopo dodici mesi, pur risultando quello con più bassa attività antiossidante rispetto agli altri due tipi di oli utilizzati come copertura. Non possedendo inizialmente una carica antiossidante elevata (scarsa dotazione in tocoferoli e fenoli), l'incremento osservato è da attribuire alle sole molecole (flavonoidi e carotenoidi) diffuse negli oli dal pomodoro semi-dry.

Qualità sensoriale dei pomodorini semi-dry in funzione dell'olio di copertura

Attraverso l'analisi statistica dei risultati ottenuti dal *Preference Test*, effettuata mediante il *Test di Friedman*, si è potuto stabilire la significatività delle differenze tra i tre campioni (pomodorini semi-dry in olio extravergine, in olio di oliva ed in olio di girasole). Il valore del parametro *Chi-Quadrato* X^2 calcolato è risultato essere pari a 476. Questo valore è stato confrontato con il valore critico tabulato che per $\alpha = 0,05$ e $df = 2$ è pari a 5.99. Dato che il valore tabulato è risultato inferiore al valore calcolato, si è potuto concludere che esiste una differenza significativa tra i campioni in esame.

Considerando che, calcolando la somma dei ranghi per ogni campione, è risultato essere:

$T_A = 62$ somma del rango per la conserva di pomodori in olio extravergine d'oliva;

$T_B = 86$ somma del rango per la conserva di pomodori in olio d'oliva;

$T_C = 91$ somma del rango per la conserva di pomodori in olio di semi di girasole.

E quindi:

$$T_C - T_A = 91 - 62 = 29$$

$$T_B - T_A = 86 - 62 = 24$$

$$T_C - T_B = 91 - 86 = 5$$

Essendo risultato la Minima Differenza Significativa di Classificazione (MDSC) calcolata pari a 17,53, possiamo concludere che: $A \neq C = B$

Quindi la differenza nella classificazione di preferenza risulta significativa, in particolare il campione in olio extra vergine di oliva è risultato essere diverso dagli altri due uguali fra di loro. Si è verificato, inoltre, che la preferenza espressa dai consumatori è stata attribuita ai campioni di conserva in olio extra vergine (60% delle preferenze).

I profili sensoriali dei pomodorini semi-dry sgocciolati (**Figura 3.2.7**) hanno confermato, a sei mesi dalla produzione, la netta differenza nei diversi attributi evidenziando che il prodotto in olio di girasole, presenta una maggior percezione degli attributi di pomodoro fresco, del carattere dolce e succulento (associato ad una minor consistenza); il prodotto in extra vergine mostra un equilibrio delle caratteristiche sensoriali del pomodoro con quelle amare e pungenti tipiche dell'Olio Extra Vergine d'Oliva; il prodotto in olio d'oliva mostra un profilo simile all'extra, con l'eccezione del carattere amaro, il quale risulta nullo come per l'olio di semi di girasole. Confrontando il profilo sensoriale a 12 mesi rispetto a quello ottenuto sei mesi prima, si osserva un abbattimento dei descrittori, persistono gli attributi di amaro e piccante, per effetto del pomodoro stesso, in più si nota che i pomodori conservati con olio di semi di Girasole siano più dolci rispetto gli altri, mentre la consistenza del pomodoro è lievemente superiore nelle conserve con olio di Oliva ed olio Extra Vergine.

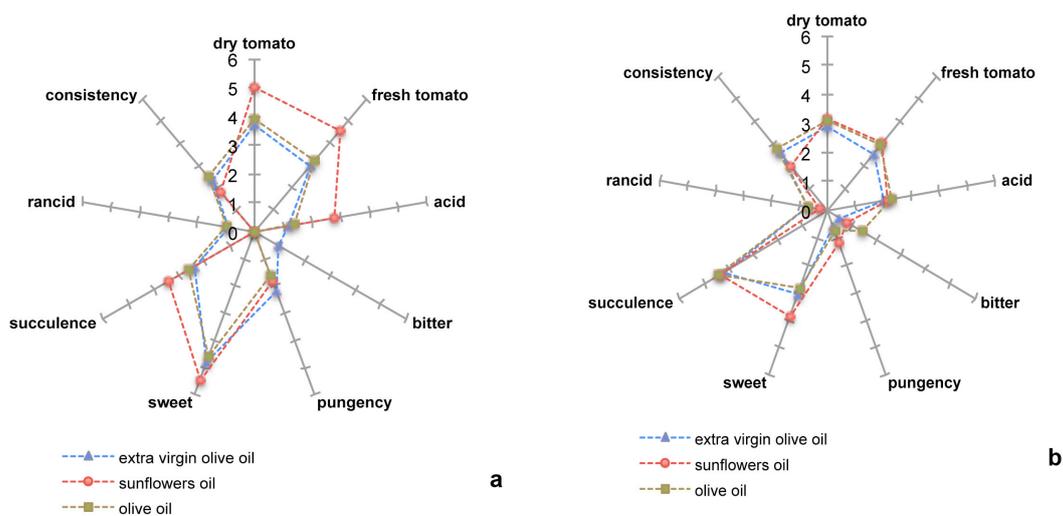


Figura 3.2.7. Profilo sensoriale dei pomodorini dopo sei mesi (a) e 12 mesi (b) di conservazione

Composti volatili rilevati nell'olio di copertura

Nella **figura 3.2.8** si riportano i cromatogrammi SPME-GC/MS delle sostanze volatili degli oli extra-vergine prima di essere usati come oli di copertura, e dopo 6 e 12 mesi di conservazione delle conserve stesse. In **tabella 3.2.5** è riportata l'identificazione dei picchi, dell'olio tal quale, dell'olio di copertura dopo sei mesi e dopo dodici mesi di vita commerciale delle conserve, con le quantità rilevate nei diversi campioni.

Sugli oli tal quali si può notare che l'Olio Extra Vergine d'Oliva ha mostrato, un profilo aromatico molto ricco, caratterizzato dall'abbondanza di trans-2-esenale, esanale, limonene tra i principali terpeni, cis-3-esenolo, esanolo e trans-2-esenolo a cui è associata la percezione di fruttato e foglia verde, in **fig. 3.2.8.a**).

L'Olio di Girasole in **fig. 3.2.9.a**), invece, ha mostrato il tipico profilo degli oli deodorati (unico componente identificato è l'esanale), anche dal punto di vista sensoriale quest'olio ha denotato l'assenza di particolari attributi (dati non mostrati).

La presenza del pomodoro a contatto con gli oli ha determinato l'arricchimento dei profili con componenti caratteristici del pomodoro. In particolare si osserva la presenza di metil-butanolo, 6-metil-5-epten-2-one, 2-isobutiltiazolo, furfurale (il più abbondante).

L'Olio di Girasole, impiegato come copertura, nei primi sei mesi evidenzia tale migrazione in **fig. 3.2.9.c**, dopo un anno di shelf-life, tali componenti sono presenti ma in quantità inferiore.

L'Olio Extra Vergine d'Oliva in **fig. 3.2.8.b-c**) presenta anche dopo sei mesi la prevalenza dei composti aromatici originari dell'olio ed in minor quantità le molecole caratteristiche rilasciate dal pomodoro. Dopo dodici mesi, il profilo aromatico dell'olio mostra gli stessi componenti identificativi ma in quantità inferiori.

Questa riduzione dei componenti identificativi nell'olio di copertura, sia quello Extra Vergine che di Girasole, dopo un anno di shelf-life è indice di ulteriore ossidazione e formazione di altri composti, come si evince dai cromatogrammi, tale che il profilo aromatico è identificato da nuovi picchi del 2,4-dimetil eptane, 3-metil butanenitrile, 1-ottanolo, 1-pentanolo.

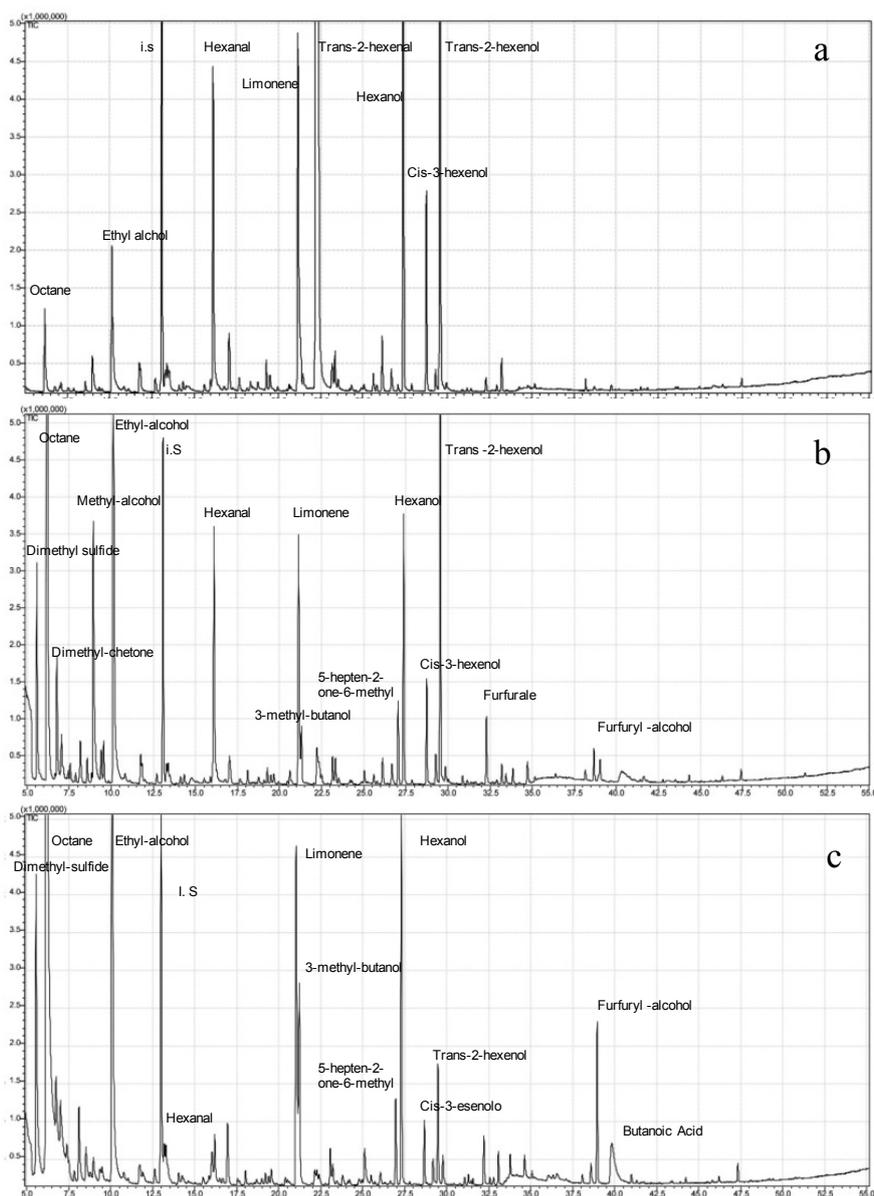


Figura 3.2.8. a) SPME-GC/MS chromatograms of Extra Virgin Olive Oil before storage of semi-dried tomatoes canned. Peaks identified in **tabella 3.2.5.** b) Extra Virgin Olive Oil with Dried Tomatoes. Peaks identified after 6 months. c) Extra Virgin Olive Oil with Dried Tomatoes. Peaks identified after 12 months.

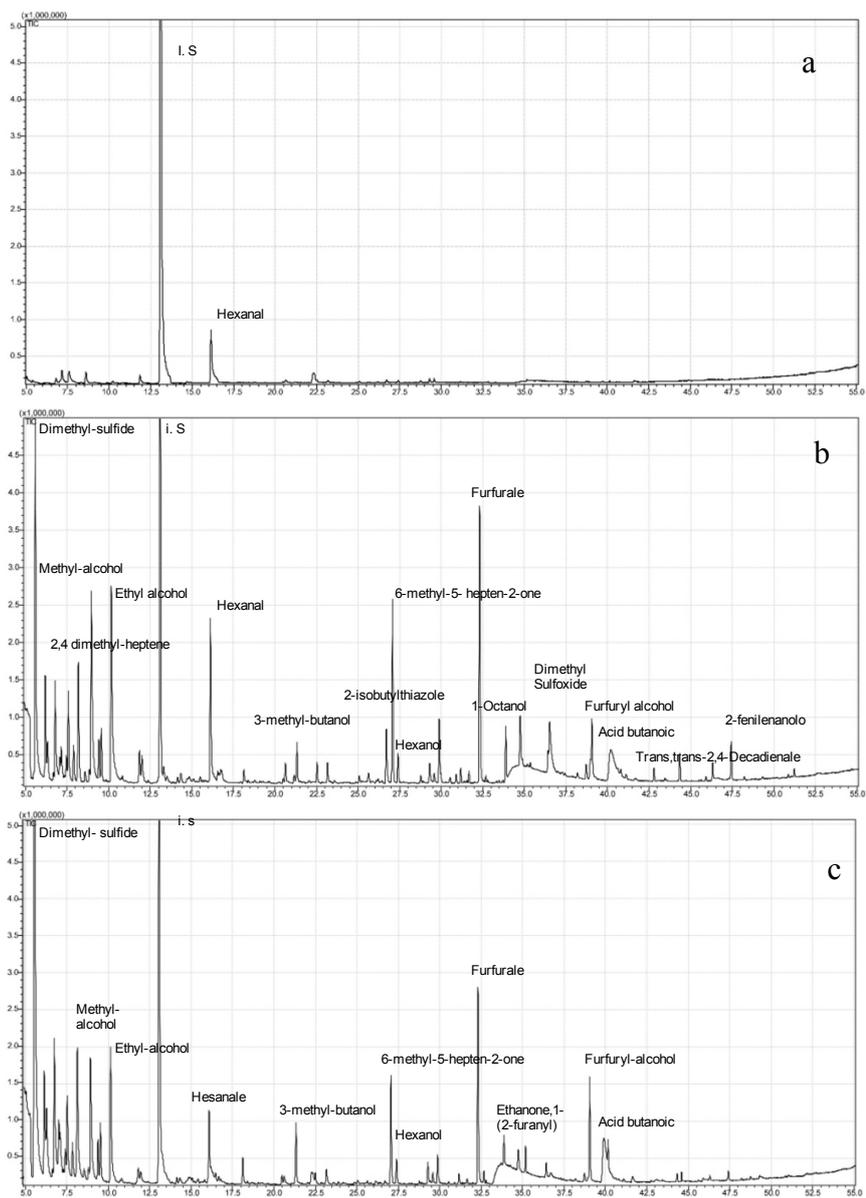


Figure 3.2.9. a) SPME-GC/MS chromatograms of Sunflower Oil before storage of semi-dried tomatoes canned.; b) Sunflower Oil with Dried Tomatoes after 6 months storage.; c) Sunflower Oil with Dried Tomatoes. Peaks identified in tab. 3.2.5.

Tab. 3.2.5. Volatile compounds identified (ppm isobutyl acetate) in samples subject to testing

volatile compounds	Ret.Time	Extra virgin olive oil	EVOpom		Sunflowers oil	GIRpom	
			6 months	12 months		6 months	12 months
Dimethyl sulfide	5.580	-	1.208,2	2.007,5	-	1.114,5	2.389,9
octano	6.158	372,2	11.763,5	17.239,8	-	346,1	274,3
Hexane, 2,3,4-trimethyl-	6.237	-	-	-	-	-	149,8
acetone	6.765	18,3	808,4	303,1	5,5	300,6	362,7
2-Hexanone, 5-methyl-	6.789	-	-	-	-	-	-
Acetic acid, methyl ester	6.974	-	-	-	-	-	55,3
Octane, 4-methyl	7.010	-	-	331,7	-	-	-
2-Propanone	7.020	-	-	-	-	-	81,2
methyl acetate	7.044	-	330,9	-	-	60,6	-
Acetic acid, 2-ethylbutyl ester	7.049	-	-	-	-	-	58,1
Butanoic acid	7.098	-	-	-	-	-	71,1
1-Octene	7.125	32,6	-	-	-	-	-
n-Octyl acetate	7.153	-	-	-	12,6	104,8	-
Heptane, 2,4-dimethyl	7.379	-	-	58,0	-	-	89,6
2,3,4-Trimethylhexane	7.442	-	66,0	-	-	50,0	-
E o Z 2-Octene	7.563	-	104,4	44,4	-	238,1	199,4
2-Propenal	7.578	-	-	-	17,8	-	-
3-Octene	7.792	-	-	-	-	-	81,1
E o Z 2-Octene	7.879	10,3	50,7	25,8	-	90,7	-
2,4 dimethyl heptene	8.167	-	307,1	420,7	-	347,4	419,5
ETILACETATO	8.567	38,1	148,2	231,0	14,4	27,3	11,5
Furan, 2-methyl	8.757	-	-	-	-	-	10,8
3-Methylfuran	8.836	-	49,3	-	-	29,7	13,6
methyl alcohol	8.981	234,1	2.119,0	365,7	-	687,1	196,2
Hydroxyacetic acid, hydrazide	8.933	-	-	-	-	-	38,0
2-methyl-butanal	9.393	16,7	208,2	54,1	-	108,7	91,5
3-methyl-butanal	9.536	12,5	248,9	54,4	-	128,8	115,1
2-Butanone, 3-methyl	9.960	-	-	-	-	-	-
Ethyl alcohol	10.138	837,7	3.698,6	5.504,4	3,0	649,8	305,6
Hexane, 4-ethyl-2,2-dimethyl-	11.697	-	-	118,4	-	-	-
Heptane, 2,6-dimethyl-	11.739	-	-	-	-	-	8,4
3-pentanone	11.767	119,3	172,9	-	-	-	-
Nonane, 2,6-dimethyl-	11.819	-	-	-	-	-	12,0
pentanal	11.832	86,4	106,6	-	11,0	-	-
3,3-Dimethyloctane	11.853	-	-	-	-	85,5	-
Heptane, 2,5,5-trimethyl	11.963	-	-	-	-	66,4	10,2
3-Ethyl-1,5-octadiene	12.714	65,9	64,9	66,8	-	-	-
alfa pinene	13.295	84,4	134,4	186,6	-	-	-
2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl	13.279	-	-	95,0	-	-	-
1,5-ottadiene, 3-etil	13.397	117,7	135,6	80,9	-	-	-
alfa pinene	13.399	-	-	33,8	-	-	-
1,5-ottadiene, 3-etil	13.407	-	-	39,2	-	-	-
n-Propanol	14.118	21,7	42,7	56,8	-	13,8	6,0
Toluene	14.349	37,1	66,0	24,7	-	38,0	-
3,7-decadiene	15.617	27,3	21,0	16,3	-	13,8	-
3-Ethyl-1,5-octadiene	15.843	-	-	11,2	-	-	-
3,7-decadiene	15.977	45,0	25,6	30,9	-	-	-
ESANALE	16.131	1.432,2	1.652,6	65,8	81,8	446,7	164,1
1-Propanol, 2-methyl	16.215	-	-	246,9	-	-	5,3
2-Methyl-2-butenal	16.778	13,7	4,3	-	-	-	-
beta pinene	17.084	255,5	244,8	252,6	-	-	-
beta phellandrene	17.680	60,5	28,3	-	-	-	-
Butanenitrile, 3-methyl-	18.020	-	-	55,0	-	-	57,6
Isovaleronitrile	18.103	-	82,3	-	-	31,8	-
trans-2-Pentenale	18.342	42,4	-	-	-	-	-
xilene (meta o para)	18.784	30,9	43,9	-	-	-	-
6-Octen-1-ol, 7-methyl-3-methylene	19.073	-	-	-	-	-	-
cis-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene	19.081	-	-	-	-	-	-
3-pentenol	19.287	108,3	85,8	43,4	-	-	-
Myrcene	19.370	-	-	31,8	-	-	-
beta mircene	19.500	60,1	47,0	65,4	-	-	-
3-methyl-2-Butenoic acid, methyl ester	19.550	14,5	10,3	-	-	-	-
2,6-Dodecadiene, 2,6-dimethyl	19.647	-	-	-	-	-	-
2-Heptanone	20.460	-	17,1	25,7	-	9,5	8,7

continua

Tab. 3.2.5. Volatile compounds identified (ppm isobutyl acetate) in samples subject to testing

volatile compounds	Ret.Time	Extra virgin olive oil	EVOpom		Sunflowers oil	GIRpom	
			6 months	12 months		6 months	12 months
eptanale	20.630	21,8	61,4	-	1,9	47,6	-
xilene (orto o para)	20.732	10,4	-	-	-	-	-
limonene	21.157	1.717,4	1.777,2	1.784,9	-	20,0	8,8
3-methyl-butanol	21.273	229,4	357,1	1.064,7	-	104,4	146,4
trans-2-hexenal	22.245	26.807,0	524,5	80,3	21,9	-	35,2
alchene	22.262	-	-	79,2	-	-	-
2-Pentylfuran	22.498	-	55,6	41,7	-	51,1	10,2
1-Pentanol	23.163	-	-	87,3	-	47,6	36,3
gamma.-Terpinene	23.185	126,0	184,3	57,0	-	-	-
beta ocimene (trans)	23.345	155,9	171,6	46,7	-	-	-
stirene	23.772	-	-	42,4	-	-	-
n-hexyl acetate	24.194	-	15,5	-	-	-	-
o-cymene	24.331	18,5	19,9	-	-	-	-
2-OTTANONE	24.747	-	-	12,8	-	-	-
2-Heptanone	24.860	-	-	-	-	-	-
OTTANALE	25.067	14,7	75,5	6,2	1,2	18,7	-
Acetoin	25.113	-	-	199,9	-	-	-
4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene	25.623	73,6	64,3	34,8	-	-	-
Hept-3-en-2-one	25.632	-	-	-	-	26,7	-
trans-2-pentenolo	25.825	19,1	12,9	-	-	-	-
cis-3-ESENILACETATO	26.106	-	-	-	-	-	-
cis-2-pentenol	26.145	228,2	183,6	69,0	-	-	-
trans-2-heptenal	26.698	98,9	136,0	181,3	2,3	154,8	-
6-metil-5-epten-2-one	27.079	22,1	468,7	185,9	-	424,6	224,7
hexanol	27.392	2.168,2	1.438,5	1.617,9	-	65,8	65,4
trans-3-hexenol	27.894	24,2	19,7	-	-	-	-
cis-3-hexenol	28.764	715,3	582,6	248,0	-	16,2	-
nonanal	29.306	88,0	199,7	122,7	3,0	44,6	28,2
trans-2-hexenol	29.575	4.058,5	2.125,6	463,2	-	21,0	6,5
2-Isobutylthiazole	29.850	-	86,7	128,8	-	151,8	28,0
cis-2-hexenol	29.954	18,7	-	-	-	-	26,7
trans-2-Octenal	30.891	5,0	42,4	27,9	-	19,8	-
3-octenol	31.168	10,4	22,1	-	-	33,2	20,6
1-Heptanol	31.398	7,5	5,6	31,4	-	-	-
2-Methyl-6-hepten-1-ol	31.644	-	9,2	7,0	-	23,2	7,9
Furfural	32.283	-	425,9	185,2	-	735,5	475,4
2,4-eptadienale	32.294	48,6	-	-	-	-	-
Ethylhexanol	32.654	-	10,0	26,4	-	13,2	11,4
Cyclosativene	32.934	21,5	24,5	10,1	-	-	-
alfa copaene	33.223	118,4	110,9	123,8	-	-	-
trans,trans-2,4-EPTADIENALE	33.439	-	44,6	-	-	-	-
Acetyl furan	33.855	-	86,9	90,9	-	126,3	59,1
Ethanol, 2-(methylthio)	34.629	-	-	-	-	-	30,6
BENZALDEIDE	34.724	-	-	107,7	-	-	26,3
1-Octanol	35.182	13,9	20,3	25,2	-	-	20,9
5-Methyl furfural	36.394	-	17,8	-	-	45,4	23,3
Dimethyl Sulfoxide	36.517	-	-	-	-	254,5	-
metilbenzoato	38.199	40,8	54,7	33,1	-	53,4	9,0
trans-2-Decenale	38.668	-	179,0	95,5	-	-	89,0
Benzeneacetaldehyde	38.927	-	36,3	-	-	-	-
Furfuryl alcohol	39.034	-	135,2	628,7	-	169,1	110,7
Butanoic acid, 3-methyl-	40.342	-	268,9	411,8	-	379,1	335,6
Hexanoic acid	40.558	-	-	-	-	-	45,5
terpene (alfa murolene)	41.459	7,8	-	-	-	-	-
alfa farnesene	41.868	4,9	-	-	-	-	-
(E,E)-2,4-Decadienal	42.769	-	9,4	-	-	29,9	-
trans,trans-2,4-DECADIENALE	44.320	-	36,2	19,8	-	60,9	12,9
benzil alcol	46.331	9,2	26,9	19,1	-	39,0	-
2-feniletanolo	47.442	27,4	58,9	71,2	-	88,7	16,3
p-Anisaldehyde	51.207	-	15,0	-	-	19,0	-

3.2.3. Conclusioni

Dopo stabilizzazione delle conserve per 6 mesi, attraverso l'analisi statistica dei risultati ottenuti dal Preference Test mediante il Test di Friedman, si è potuto stabilire la significatività delle differenze tra i tre campioni (pomodorini semi-dry in olio extravergine, in olio di oliva ed in olio di girasole). La differenza nella classificazione di preferenza è risultata significativa, in particolare il campione in olio extra vergine di oliva è risultato essere diverso dagli altri due uguali fra di loro. Si è verificato, inoltre, che la preferenza espressa dai consumatori è stata attribuita ai campioni di conserva in olio extra vergine (60% delle preferenze).

I profili sensoriali dei pomodorini semi-dry sgocciolati hanno confermato la netta differenza nei diversi attributi evidenziando per il prodotto in extra vergine un equilibrio delle caratteristiche sensoriali del pomodoro con quelle amare e pungenti tipiche dell'Olio Extra Vergine d'Oliva.

Il profilo aromatico degli oli di copertura, valutato mediante SPME-GC/MS dei composti volatili, ha evidenziato nel prodotto sott'olio extravergine la presenza sia di molecole odorose dell'olio extravergine che del pomodoro, confermando la maggiore qualità sensoriale rilevata. In particolare, la presenza del pomodoro a contatto con l'olio ha determinato il rilascio di componenti caratteristici, quali dimetil-sulfide, metanolo, etanolo, 6-metil-5-epten-2-one, furfurale. Dopo dodici mesi di vita commerciale delle conserve la valutazione sensoriale mostra un abbattimento dei descrittori con conseguente appiattimento delle differenze e diminuzione dell'accettabilità complessiva. Dal profilo delle sostanze aromatiche degli oli di copertura risulta la diminuzione dei composti già presenti e l'insorgenza di ulteriori picchi associabili a composti di neoformazione.

La conserva di pomodorini semi-dry sott'olio non è semplicemente un vegetale immerso in olio, ma appare un alimento "nuovo", per il quale le proprietà chimico-fisiche ed organolettiche non sono la pura somma delle proprietà dell'olio usato (che sia Olio Extra Vergine, d'Oliva o di Girasole) e della verdura ingrediente.

3.3. CARATTERIZZAZIONE DI OLIO AROMATIZZATO AL PEPERONCINO

Allo scopo di studiare il rilascio nell'olio di molecole dal valore nutraceutico e sensoriale in relazione al tempo ed alle modalità di infusione, sono state condotte prove su oli aromatizzati al peperoncino ed è stato messo a punto un metodo di estrazione e dosaggio di tali composti per HPLC.

3.3.1. Materiali e metodi

3.3.1.4. Campionamento

Per la sperimentazione sono stati utilizzati un olio di oliva, fornito dall'azienda IOBM, Montesarchio (BN), e peperoncino piccante in polvere presente comunemente in commercio (SILANPEPE sas, Lamezia Terme, CZ). Per l'infusione sono stati preparati 3 campioni di olio/peperoncino ad una concentrazione del 10% e 3 campioni di olio/peperoncino alla concentrazione del 20%, ogni campione è stato preparato in doppio. I campioni in bottiglie di vetro scuro sono stati conservati al buio alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, e sottoposti a periodica agitazione al fine di aumentare la superficie di contatto tra soluto e solvente.

Al tempo 7, 15, e 30 giorni sono stati prelevati 2 campioni, il peperoncino è stato allontanato per centrifugazione e sull'olio aromatizzato sono state eseguite le determinazioni analitiche.

In **Figura 3.3.1** si riporta il disegno sperimentale seguito nel corso delle prove di infusione olio/peperoncino. I dati relativi alla valutazione qualitativa degli oli non sono riportati nel presente lavoro di tesi.

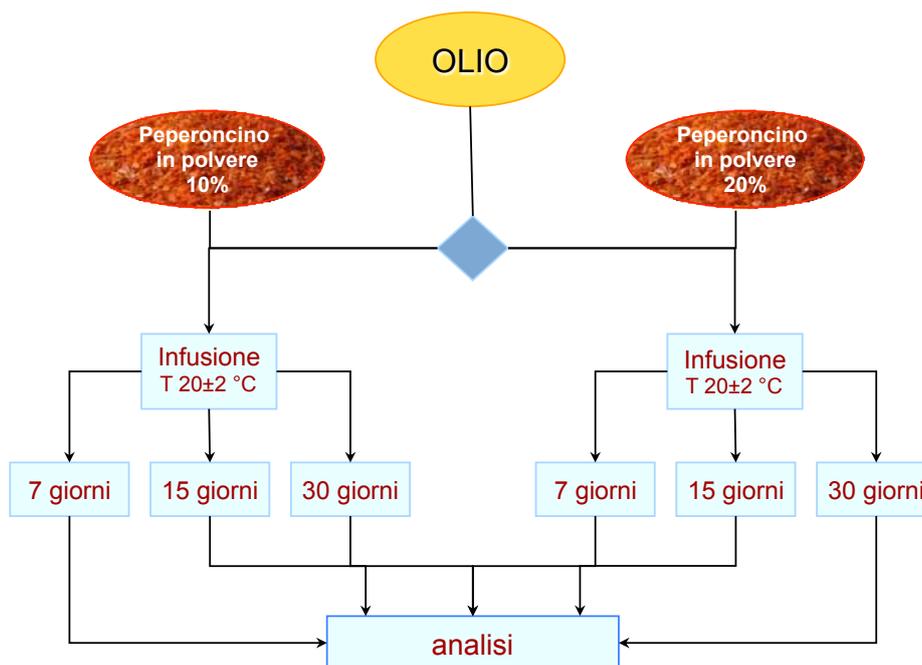


Figura 3.3.1 Disegno sperimentale

3.3.1.5. Estrazione ed analisi HPLC della Capsaicina dall'olio al peperoncino dopo infusione

Principio del metodo. Non essendo presenti in letteratura metodi di estrazione quantitativa dei capsaicinidi in matrice oleosa, il metodo di estrazione e la procedura di analisi HPLC degli estratti sono stati scelti in base a:

- Metodi riportati per l'estrazione ed il dosaggio HPLC della Capsaicina da peperoncini freschi o disidratati:

- Metodo utilizzato per l'estrazione dei secoridoidi e lignani degli oli vergini di oliva.

In particolare partendo dalla metodica classica di estrazione descritta da Vasquez-Roncero (1978) per gli oli di oliva, si sono apportate alcune modifiche allo scopo di minimizzare i volumi di solvente utilizzati, è stato scelto come solvente una miscela acqua-metanolo in base al metodo di estrazione dal peperoncino disidratato riportata da Maillard et al. (1997).

Sono in corso prove di verifica del recupero della Capsaicina in matrice oleosa con tale solvente in comparazione con altri solventi.

Procedimento. Un'aliquota di campione di olio (10 g) disciolto in esano (10 ml) è stata estratta in imbuto separatore con una miscela acqua/metanolo (40/60 v/v) (3x7ml); l'estratto idroalcolico ottenuto è stato lavato con esano per eliminare eventuali contaminazioni oleose e centrifugato per 10 minuti a 3500 giri/min.; la fase metanolica è stata raccolta in un pallone ed evaporata sottovuoto in evaporatore rotante (40°C). Il residuo è stato ripreso con 2 ml di metanolo ed un'aliquota di tale soluzione è stata utilizzata per l'analisi HPLC.

Per la separazione dei capsaicinoidi si è utilizzata la cromatografia HPLC. È stata considerata come metodica di riferimento quella proposta da Tsimidou *et al.*, (1992) per i composti fenolici degli oli.

Le fasi eluenti utilizzate sono state le seguenti:

- a. acqua + acido trifluoroacetico (TFA) al 3%;
- b. metanolo 35% + isopropanolo 63,4% + acetonitrile 1,6%.

È stato utilizzato un gradiente di eluizione che parte dal 20% di eluente **b**, per arrivare in un tempo di 18 min al 98% di **b**.

Sono stati utilizzati:

- un HPLC (SHIMADZU, mod.LC-10ADVP) provvisto di rivelatore UV-Vis DIODE ARRAY (SHIMADZU, mod.SPD-M10AVP) e software di acquisizione Class-VP Chromatography data system vers. 4.6 (Shimadzu Italia, Milano);
- una colonna a fase inversa (Synergi 4 μ Fusion-RP 80Å 150 x 4,6 mm i.d.). Flusso in colonna: 0,7 ml/min. Quantità iniettata: 20 μ l.

L'analisi quantitativa dei singoli componenti capsaicinoidi è stata condotta con riferimento ad uno standard esterno di Capsaicina naturale (capsaicina 65%, diidrocapsaicina 35% - Sigma - Aldrich) impiegato per la costruzione della retta di calibrazione. L'identificazione dei picchi è stata effettuata per comparazione con i tempi di ritenzione dello standard puro e sulla base degli spettri UV rilevati con il detector DAD. L'analisi quantitativa è stata condotta ad una lunghezza d'onda del rivelatore: 279 nm.

3.3.1.6. Misura dell'attività antiossidante (metodo ABTS+)

Per la misura dell'attività antiossidante è stato utilizzato il metodo ABTS descritto in dettaglio nel capitolo precedente (§ 3.2.1.)

3.3.1.7. Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) - GC/MS

Per analizzare la frazione volatile degli oli tal quali e dopo infusione è stata utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME) come metodo di pre-concentrazione precedente all'analisi GC/MS. La metodica è stata descritta in dettaglio nel capitolo precedente (§ 3.1.1.).

3.3.2. Risultati e Discussione

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle analisi chimico-compositive effettuate sui campioni di olio ottenuti dall'infusione di olio di oliva e polvere di peperoncino al 10% ed al 20%.

In **Figura 3.3.1** è riportato un esempio di profilo HPLC dello standard di Capsaicina (**a**) usato per la costruzione della retta di calibrazione e di un estratto olio/peperoncino 10% dopo infusione (**b**), con identificazione dei picchi relativi ai due capsaicinoidi. In **Figura 3.3.2** è riportata la retta di calibrazione ottenuta dallo standard di Capsaicina pura (Capsaicina 65%, Diidrocapsaicina 35%), dopo opportune diluizioni.

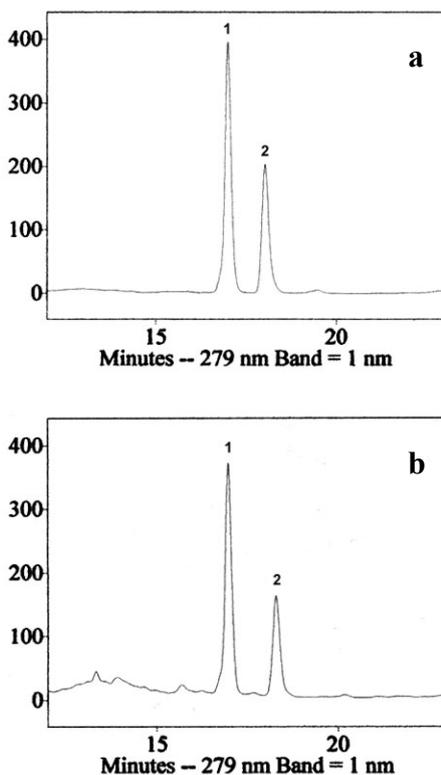


Figura 3.3.1. Esempio di profilo HPLC-DAD dello standard di capsaicina (**a**) utilizzato per la costruzione della retta di calibrazione e dell'estratto metanolico dell'olio dopo infusione con il peperoncino (**b**). **Identificazione dei picchi:** 1: capsaicina, 2: diidrocapsaicina.

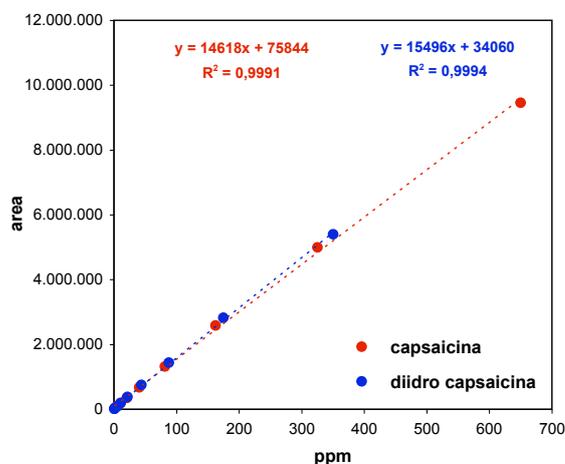


Figura 3.3.2. Retta di calibrazione dello standard di capsaicina naturale (65% capsaicina, 35% diidrocapsaicina).

Il limite di rivelabilità (LR, la più bassa concentrazione di analita che può essere rilevata ma non quantizzata), nelle condizioni sperimentali del metodo, è risultato essere di 1 ppm per la capsaicina e di 0,5 ppm per la diidrocapsaicina. Il limite di quantificazione (LQ, la concentrazione a partire dalla quale ha significato esprimere i risultati in termini quantitativi), ha presentato un valore di 2 ppm per la capsaicina e di 1,4 ppm per la diidrocapsaicina.

Le **prove di infusione** sono state effettuate mettendo a contatto olio di oliva con polvere di peperoncino, 10% e 20%, per un tempo di 7, 15 e 30 giorni e determinando gli indici di qualità (acidità, numero di perossidi, assorbimento spettrofotometrico nell'UV), la composizione degli acidi grassi, delle sostanze volatili, dei pigmenti, dei tocoferoli, il livello di capsaicinoidi e l'attività antiossidante.

Nella **Tabella 3.3.1** sono riportati i quantitativi dei due principali capsacinoidi rilevati negli oli al peperoncino dopo 7, 15 e 30 giorni di infusione.

Tabella 3.3.1. Contenuto di capsaicina e diidrocapsaicina nei campioni Olio/Peperoncino dopo 7, 15 e 30 giorni di infusione.

	ppm capsaicina (mg/kg)	ppm diidro capsaicina (mg/kg)
	media ± dev.st.	media ± dev.st.
Olio di Oliva	-	-
10%7gg	123,83 ^b ± 6,40	56,47 ^b ± 3,84
10%15gg	123,09 ^b ± 5,48	58,43 ^b ± 2,87
10%30gg	125,16 ^b ± 3,20	57,62 ^b ± 2,03
20%7gg	221,02 ^a ± 10,70	103,21 ^a ± 6,67
20%15gg	226,12 ^a ± 12,68	107,85 ^a ± 7,42
20%30gg	231,94 ^a ± 4,48	108,78 ^a ± 2,71

*Lettere diverse sulla stessa colonna indicano valori significativamente ($p < 0.05$) differenti (ANOVA).

Dalla **Figura 3.3.4.** si osserva come il rilascio dei due capsacinoidi non dipende dal tempo di infusione. Non si evidenzia una variazione di contenuto tra 7 e 30 giorni.

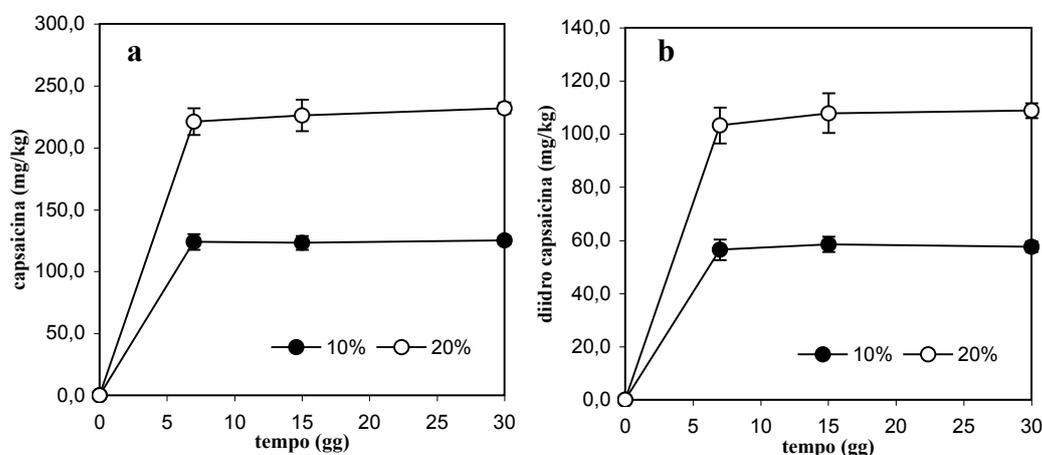


Figura 3.3.4. Evoluzione della capsaicina (a) e diidrocapsaicina (b) nell'olio dopo infusione a 7, 15 e 30 giorni.

Nei primi 7 giorni di infusione si ottiene quindi la massima solubilizzazione di capsaicinoidi dalla polvere di peperoncino all'olio. Il rilascio dipende dalla concentrazione di polvere di peperoncino messa in infusione e non dal tempo in quanto al 20% si estrae un maggior contenuto di capsaicinoidi rispetto al 10%.

Nella **Figura 3.3.5.** sono riportati i profili SPME-GC/MS dell'olio di oliva (**a**), del peperoncino in polvere (**b**) e dell'olio al peperoncino dopo 30 giorni di infusione con il 20% di polvere di peperoncino (**c**).

I componenti non presenti nell'olio tal quale e riscontrati nell'infuso sono le sostanze volatili, alcuni di natura terpenica, rilasciate dal peperoncino all'olio durante l'infusione. La presenza di elevate quantità di acido acetico, rilasciato dal peperoncino, può essere attribuita ai fenomeni fermentativi a cui va incontro il peperoncino durante l'essiccazione.

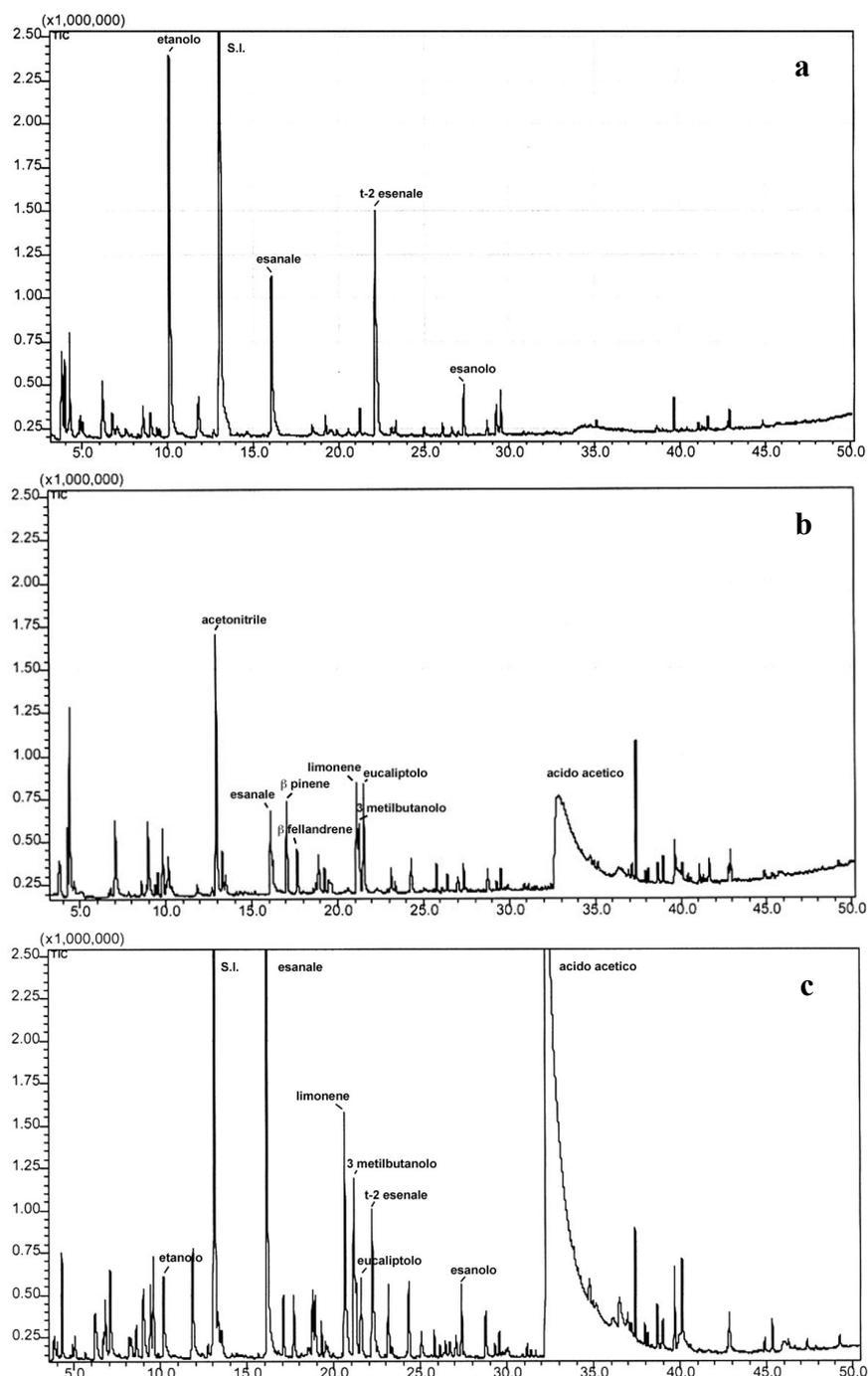


Figura 3.3.5. Profili SPME-GC/MS dell'olio di oliva (**a**), del peperoncino in polvere (**b**) e dell'olio al peperoncino dopo 30 giorni di infusione con il 20% di polvere di peperoncino (**c**).

Nella **Tabella 3.3.2** e nella **Figura 3.3.5** sono riportati i valori dell'attività antiossidante riscontrati nell'olio di oliva e dopo 7, 15 e 30 giorni di infusione con polvere di peperoncino al 10 e 20%. Si osserva un'attività antiossidante maggiore nei campioni messi in infusione con polvere di peperoncino rispetto all'olio tal quale, tale attività antiossidante è funzione della concentrazione di polvere di peperoncino messo in infusione (maggiore alla concentrazione del 20%) e non dal tempo di infusione. L'attività antiossidante può essere attribuita al rilascio dei componenti capsacinoidi e dei tocoferoli, in particolar modo β + γ -tocoferolo, da parte del peperoncino all'olio durante l'infusione. È infatti noto che i pigmenti carotenoidi presenti nel peperoncino rosso piccante hanno un'elevata attività *free radical scavengers* (Matsufuji et al., 1998). Inoltre il peperoncino rosso piccante contiene elevati livelli di flavonoidi e fenoli naturali quali quercetina, luteolina e capsacinoidi (Hasler, 1998), con elevata capacità antiossidante (Sim and Sil, 2008).

Tabella 3.3.2. Valori dell'attività antiossidante (μ mol Trolox / L di campione) riscontrati nell'olio tal quale e nei campioni Olio/Peperoncino dopo i relativi tempi di infusione (7, 15 e 30 giorni).

	TAA (Total Antioxidant Activity) mmol Trolox/l campione
	media \pm dev.st.
Olio di Oliva	3.094 ^c \pm 100
10%7gg	17.882 ^a \pm 1.297
10%15gg	17.977 ^a \pm 886
10%30gg	16.976 ^a \pm 500
20%7gg	25.723 ^b \pm 892
20%15gg	25.484 ^b \pm 500
20%30gg	26.992 ^b \pm 1.339

*Lettere diverse sulla stessa colonna indicano valori significativamente ($p < 0.05$) differenti (ANOVA).

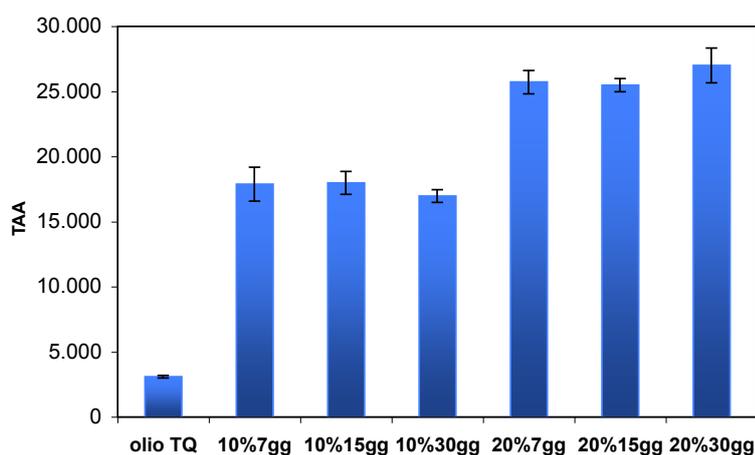


Figura 3.3.5. Valore dell'attività antiossidante riscontrato nell'olio tal quale e negli oli aromatizzati dopo 7, 15 e 30 giorni di infusione.

In alternativa all'infusione tradizionale sono state effettuate delle prove di estrazione dei capsacinoidi dalla polvere di peperoncino impiegando il microonde e gli ultrasuoni.

Per quanto riguarda la prova a microonde sono stati preparati 3 campioni di olio con il 20% di peperoncino, questi campioni sono stati sottoposti a microonde rispettivamente per 10, 30 e 60 secondi.

Per quanto riguarda la prova ad ultrasuoni sono stati preparati 2 campioni di olio con l'aggiunta del 10% di peperoncino e 2 campioni di olio con l'aggiunta del 20% di peperoncino, i campioni sono stati sottoposti ad ultrasuoni per 10 e 20 minuti. Sugli oli sono state effettuate le stesse misure precedentemente descritte.

Nella **Tabella 3.3.4** sono riportati i quantitativi dei due capsaicinoidi estratti nella prova ad ultrasuoni e a microonde. Si osserva che si raggiungono livelli vicino ai 100 ppm di capsaicina alla concentrazione del 10% di polvere di peperoncino, livelli vicino ai 200 ppm di capsaicina alla concentrazione del 20% per i campioni ad ultrasuoni, e livelli vicino ai 200 ppm di capsaicina in 60 secondi a microonde.

Tabella 3.3.4. Quantitativi di capsaicina e diidrocapsaicina estratti dalle prove ad ultrasuoni

	ppm capsaicina (mg/kg)	ppm diidro capsaicina (mg/kg)
s20m10%	93,34	42,97
s10m10%	84,62	39,14
s10m20%	114,74	53,16
s20m20%	169,86	82,99
m10s20%	89,84	42,67
m30s20%	86,66	37,56
m60s20%	164,67	75,11

Va rilevato come entrambi i sistemi consentono di estrarre in 10 min ad ultrasuoni e in 60 secondi a microonde un contenuto di capsaicina paragonabile a quella che si ottiene in 7 giorni di infusione tradizionale.

Nella **Tabella 3.3.5** sono riportati i valori di attività antiossidante rilevati nei campioni sottoposti a microonde e ad ultrasuoni. La maggiore attività antiossidante si riscontra nei campioni in cui è verificata una maggiore estrazione di capsaicina.

Tabella 3.3.5. Valori dell'attività antiossidante ($\mu\text{mol Trolox} / \text{L}$ di campione) riscontrati nei campioni Olio/Peperoncino sottoposti a microonde e ultrasuoni

	TAA (Total Antioxidant Activity) mmol Trolox/l campione
	media \pm dev.st.
m10s20%	15.700 ^c \pm 658
m30s20%	13.907 ^b \pm 750
m60s20%	19.938 ^a \pm 500
s10m10%	13.823 ^c \pm 820
s20m10%	15.257 ^c \pm 600
s10m20%	17.091 ^b \pm 867
s20m20%	23.186 ^a \pm 900

*Lettere diverse sulla stessa colonna, per ogni sperimentazione, indicano valori significativamente ($p < 0.05$) differenti (ANOVA).

Al fine di effettuare una prima comparazione degli effetti nutraceutici di tali oli, gli oli al peperoncino sono stati comparati con quelli aromatizzati con altre spezie ed aromi naturali.

Nella **Tabella 3.3.6** e nella **Figura 3.3.6** sono riportati i valori dell'attività antiossidante di alcuni oli aromatizzati del commercio.

Tabella 3.3.6. Valori dell'attività antiossidante ($\mu\text{mol Trolox} / \text{L}$ di campione) riscontrati in alcuni oli aromatizzati presenti in commercio

	TAA (Total Antioxidant Activity) mmol Trolox/l campione
mandarino	6.644
bergamotto	6.899
limone	7.952
arancia	10.802
peperoncino	11.642
basilico	15.585
cardamomo	22.179
spezie asia	22.349

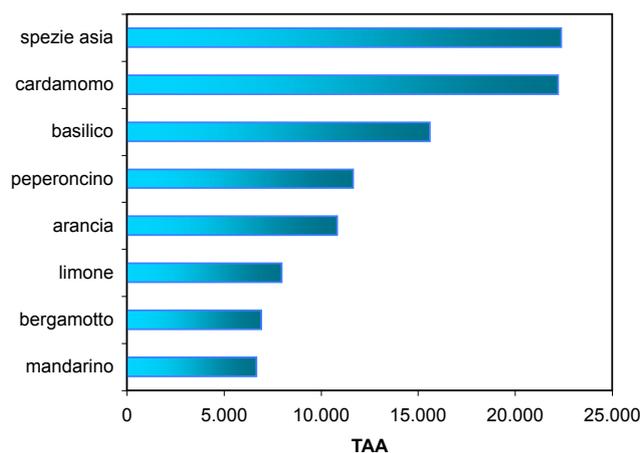


Figura 3.3.6. Attività antiossidante misurata su diversi tipi di oli aromatizzati del commercio.

L'olio al peperoncino nel caso della formulazione studiata e della sua particolare diluizione, risulta presentare una attività antiossidante superiore a tutti gli oli aromatizzati agli agrumi e inferiore agli oli al basilico, al cardamomo ed alle spezie asiatiche.

3.3.3. Conclusioni

Nell'ambito della caratterizzazione dell'olio aromatizzato al peperoncino, il profilo dei composti volatili ottenuto mediante SPME-GC/MS dell'olio di oliva, del peperoncino in polvere e dell'olio al peperoncino, al 10 e 20% dopo 7 e 30 giorni di infusione, ha evidenziato la presenza nell'infuso di sostanze volatili rilasciate dal peperoncino. Tra tali sostanze le maggiormente caratterizzanti sono di natura terpenica; elevate quantità di acido acetico sono attribuibili a fenomeni fermentativi a cui va incontro il peperoncino durante l'essiccazione.

La messa a punto di un metodo di estrazione liquido-liquido dei capsaicinoidi dal sistema olio/peperoncino e relativo dosaggio HPLC-DAD ha consentito la determinazione quantitativa della capsaicina rilasciata dalla polvere di peperoncino nel corso dell'infusione in olio. La valutazione del rilascio della capsaicina nell'olio di oliva, in relazione al tempo di infusione (7, 15 e 30 gg) ed alla concentrazione di polvere di peperoncino in infusione (10% e 20%) ha permesso di definire le condizioni di infusione ottimali al fine di ottenere determinati profili degli estratti concentrati. L'innovazione nella produzione dei concentrati (nel nostro caso con riferimento alle sole tecnologie a microonde ed ultrasuoni sperimentate) potrà consentire infine l'ottenimento di oli di elevata qualità sensoriale e nutrizionale con brevissimi tempi, semplici e diffuse tecnologie, a costi contenuti.

3.4. CARATTERIZZAZIONE DI OLIO AROMATIZZATO ALLA LIQUIRIZIA

Allo scopo di studiare il rilascio nell'olio di molecole dal valore nutraceutico e sensoriale in relazione al tempo ed alle modalità di infusione, sono state condotte prove su oli aromatizzati alla liquirizia ed è stato messo a punto un metodo di estrazione e identificazione di tali composti mediante cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC/MS/MS).

3.4.1. Materiali e metodi

3.4.1.1. Campionamento

Per la sperimentazione sono stati utilizzati un olio di oliva commerciale (Bertolli), un olio di oliva extra vergine (Olearia San Giorgio, San Giorgio Morgeto, RC) e diverse tipologie di liquirizia (radice intera e grattugiata, bacchetta e polvere di liquirizia pura) (Amarelli, Rossano, CS).

In **Figura 3.4.1** si riporta il disegno sperimentale seguito nel corso delle prove di infusione olio/liquirizia. La tipologia di campioni ottenuta è riportata in **Tabella 3.4.1**.

I campioni sono stati messi in infusione in bottiglie di vetro scuro e conservati al buio alla temperatura di $20 \pm 2^\circ\text{C}$, e sottoposti a periodica agitazione. Dopo 7, 30, 90 giorni sull'olio aromatizzato sono state eseguite le determinazioni analitiche. I dati relativi alla valutazione qualitativa degli oli non sono riportati nel presente lavoro di tesi.

Tabella 3.4.1 Identificazione dei campioni

A	Radice 20% in Olio di Oliva
B	Radice 20% in Olio extra vergine di Oliva
C	Bacchetta 20% in Olio di Oliva
D	Bacchetta 20% in Olio extra vergine di Oliva
E	Polvere 20% in Olio di Oliva
F	Polvere 20% in Olio extra vergine di Oliva
G	Radice grattugiata 10% in Olio Oliva
H	Radice grattugiata 10% in Olio extra vergine di oliva
I	Radice 30% in Olio Oliva
L	Radice 30% in Olio extra vergine di Oliva
M	Bacchetta 30% in Olio di Oliva
N	Bacchetta 30% in Olio extra vergine di Oliva
O	Polvere 30% in Olio di Oliva
P	Povere 30% in Olio extra vergine di Oliva
OO	Olio di Oliva
OE	Olio extra vergine di Oliva

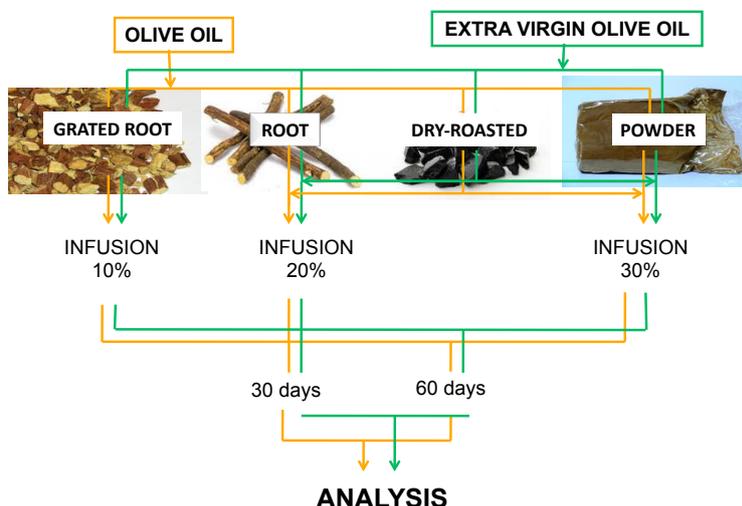


Figura 3.4.1 Disegno sperimentale

3.4.1.2. Misura dell'attività antiossidante (metodo ABTS+)

Per la misura dell'attività antiossidante è stato utilizzato il metodo ABTS descritto in dettaglio nel capitolo precedente (§ 3.2.1.)

3.4.1.3. Analisi delle sostanze volatili mediante Solid Phase Microextraction (SPME) - GC/MS

Per analizzare la frazione volatile degli oli tal quali e dopo infusione è stata utilizzata la microestrazione in fase solida (SPME) come metodo di pre-concentrazione precedente all'analisi GC/MS. La metodica è stata descritta in dettaglio nel capitolo precedente (§ 3.1.1.).

3.4.1.4. Caratterizzazione dei componenti antiossidanti mediante analisi LC/MS/MS

La metodica di estrazione dall'olio, delle sostanze antiossidanti rilasciate dalla liquirizia in fusione, è stata messa a punto in base a quanto riportato in letteratura circa l'estrazione dalla radice sono state estratte con fase metanolo/acqua (60:40, v/v) (Sabbioni et al., 2004). Un'aliquota di campione di olio (10 g) disciolto in esano (10 ml) è stata estratta in imbuto separatore con una miscela acqua/metanolo (40/60 v/v) (3x7ml); l'estratto idroalcolico ottenuto è stato lavato con esano per eliminare eventuali contaminazioni oleose e centrifugato per 10 minuti a 3500 giri/min.; la fase metanolica è stata raccolta in un pallone ed evaporata sottovuoto in evaporatore rotante (40°C). Il residuo è stato ripreso con 2 ml di metanolo ed un'aliquota di tale soluzione è stata utilizzata per la successiva analisi LC.

L'analisi della glicirizina, dei flavonoidi e degli isoflavonoidi è stata eseguita mediante cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC/MS/MS). Le separazioni cromatografiche sono state ottenute utilizzando un HPLC equipaggiato con due micropompe serie 200 (Perkin Elmer, Canada), una colonna Prodigy 5u ODS 100A 3 250x4.6 mm (Phenomenex, CA, USA). Le fasi eluenti erano costituite da Fase A:acqua 0.2% acido formico; e Fase B CH₃CN/MeOH (60:40 v/v). Il gradiente utilizzato è stato il seguente: 0-30% B (10 min), 10-40% B (5 min), 23-100% B (5 min), 30-100 % B (5 min), 35-30% costante allo 0% di A per 5 min, ad un flusso costante di 0.8 mL/min. Un flusso di 0.2 mL/min è stato mandato nello spettrometro di massa. Sono stati iniettati 20 µL di campione. Le analisi MS and MS/MS sono state eseguite con uno spettrometro di massa API 2000 triplo quadrupolo (AppliedBiosystems, Canada) equipaggiato con una sorgente TurboIonspray. L'acquisizione è stata effettuata nella modalità degli ioni negativi in MRM (multiple reaction monitoring).

3.4.1.4. Valutazione del profilo Sensoriale

I campioni sono stati sottoposti ad valutazione del profilo sensoriale mediante la metodica descritta precedentemente (§ 3.1.1.), utilizzando un apposita scheda in cui gli assaggiatori hanno riportato l'intensità dei diversi descrittori su scale non strutturate. Sono state effettuate prove preliminari per la definizione degli attributi caratteristici della liquirizia.

3.4.2. Risultati e Discussione

Di seguito sono riportati e discussi i risultati ottenuti dalle analisi chimico-compositive effettuate sui campioni di olio di oliva ed olio extra vergine di oliva e le rispettive infusioni olio/liquirizia.

E' stata effettuata LC/MS per la caratterizzazione e l'individuazione delle principali saponine e flavonoidi nei campioni M e G. In **Tabella 3.4.2** sono riportate le caratteristiche dei composti rilevati.

Tabella 3.4.2 Caratteristiche LC/MS/MS dei composti analizzati.

Composto	Ione precursore [M-H] ⁻ m/z	Ione frammento [M-H] ⁻ m/z
Glycyrrhizic Acid	822	351
glabridin	323	201
LQA o ILA	549	255
LQN o ILN	417	255
LQG o ILG	255	119
7,4-dihydroxyflavone	253	117
Isoononin	429	267
Glycyrrhetic acid	469,5	425
Glycyrrhizin	821	71

Dalla **Figura 3.4.2** si evince che in entrambi i campioni la presenza dell'acido glicirretinico (**6**), della glabridina (**5**), dell'isoliquiritigenina [**ILG(4)**], liquiritigenina [**LQG (3)**], liquiritina [**LQN (1)**] ed infine l'isoliquiritina [**ILN (2)**].

La maggiore presenza di flavonoidi, è dovuta probabilmente dalle caratteristiche di resistenza termica. Infatti (Baek Ju Baek, et al., 2008), ha dimostrato che sottoponendo le saponine come Acido glicirretico e la glicirrizina, e uno dei principali flavonoidi come la liquiritina (estratti naturalmente dalla radice di liquirizia), a tempi e temperature diverse, si osserva un massimo di estrazione per le saponine a 50°C per 10 minuti, e all'aumentare della temperatura come la glicirrizina si decompone in 18β-Acido glicirretico (Sung et al., 2004), mentre la liquiritina dimostra un comportamento diverso dalle saponine dato che ha un massimo a quasi 300°C. Quindi questo conferma la maggiore presenza nella bacchetta di questi flavonoidi rispetto alla radice.

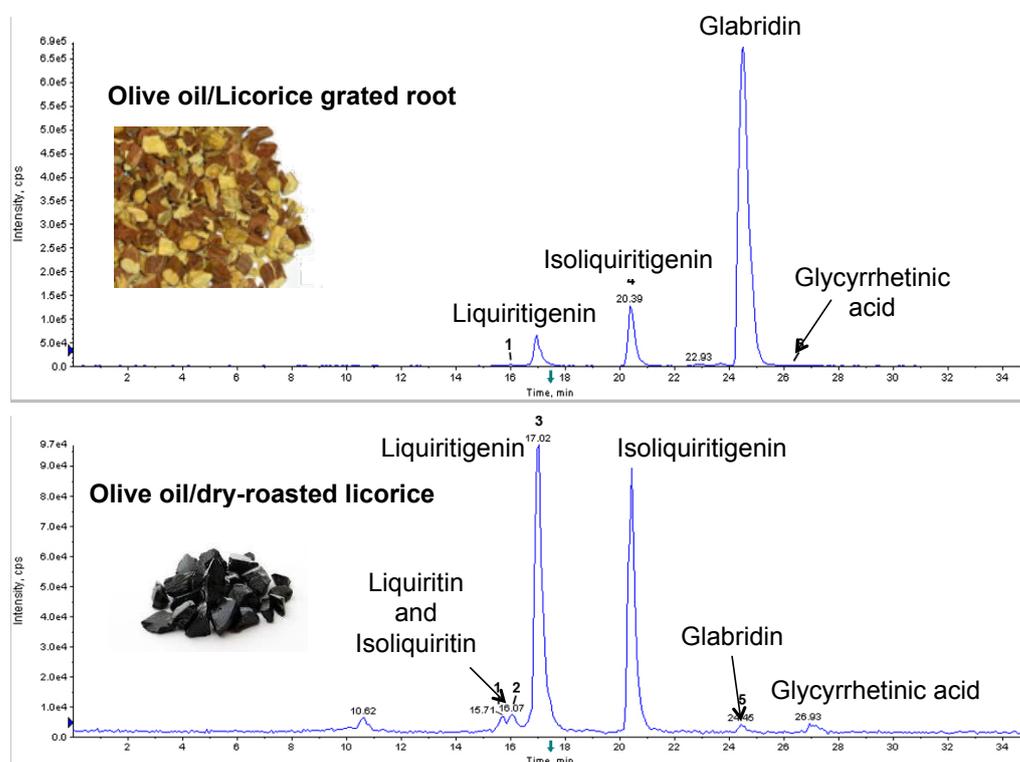


Figura 3.4.2 Cromatogrammi TIC LC/MS relativi al campione G (a), ed M (b).

Nella **Tabella 3.4.3** e in **Figura 3.4.3** e **Figura 3.4.4** sono riportati i valori dell'attività antiossidante riscontrati nell'olio di oliva, nell'olio extra vergine di oliva e negli oli aromatizzati dopo 60 giorni di infusione. L'attività antiossidante può essere attribuita dal rilascio di flavonoidi dalla radice di liquirizia all'olio, i quali presentano più gruppi ossidrilici sullo stesso anello.

Questo maggiore rilascio si rileva nei campioni con radice di liquirizia intera e prevalentemente nella radice grattugiata, e questo dimostra la presenza di sostanze ad elevata capacità antiossidante solo nei campioni con radice, diversamente da i prodotti processati che presentano una diminuzione rispetto al campione tal quale.

Tabella 3.4.3 Valori dell'attività antiossidante ($\mu\text{molTrolox} / \text{L}$ di campione) riscontrati negli oli tal quale e nei campioni dopo 60 giorni di infusione.

Sample	TAA (Total Antioxidant Activity) $\mu\text{molTrolox/L}$ sample		
	media	\pm	dev.st
OE	20,9	\pm 1,20	
B	59,4	\pm 1,34	
L	60,3	\pm 3,10	
H	113,4	\pm 5,67	
F	15,1	\pm 0,76	
P	21,9	\pm 1,10	
D	9,3	\pm 0,46	
N	19,3	\pm 0,97	
OO	11,8	\pm 0,59	
A	25,0	\pm 1,25	
I	26,0	\pm 1,30	
G	46,6	\pm 2,33	
E	3,8	\pm 0,19	
O	6,3	\pm 0,32	
C	3,9	\pm 0,20	
M	11,6	\pm 0,58	

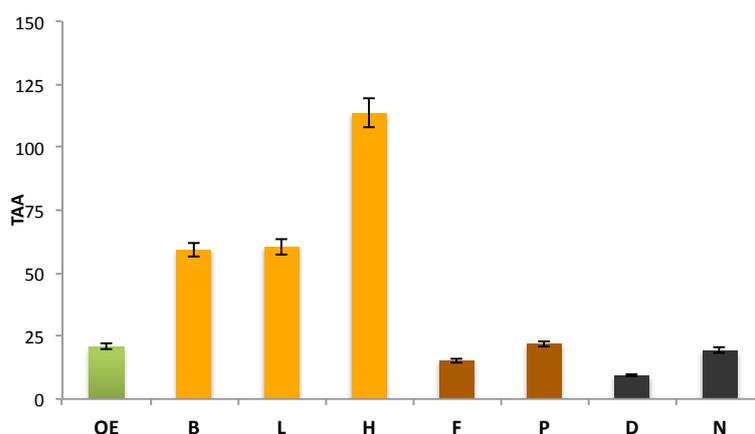


Figura 3.4.3 Valori dell'attività antiossidante riscontrati nell'olio extra vergine di oliva tal quale e nei campioni aromatizzati dopo 60 giorni di infusione.

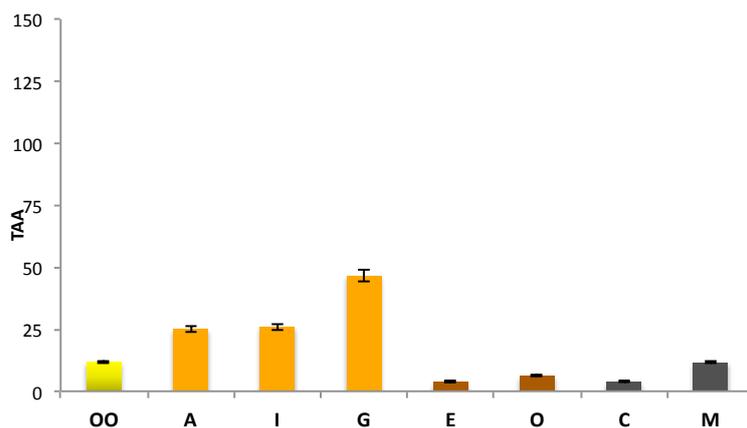


Figura 3.4.4 Valori dell'attività antiossidante riscontrati nell'olio di oliva tale quale e nei campioni aromatizzati dopo 60 giorni di infusione.

Al fine di effettuare una prima comparazione degli effetti nutraceutici di tali oli, gli oli aromatizzati alla liquirizia sono stati comparati con quelli aromatizzati con altre spezie ed aromi naturali.

Nella **Tabella 3.4.4** e nella **Figura 3.4.5** sono riportati i valori dell'attività antiossidante di alcuni oli aromatizzati del commercio.

Tabella 3.4.4 Valori dell'attività antiossidante (mmolTrolox / L di campione) riscontrati in alcuni oli aromatizzati presenti in commercio

Sample	TAA (Total Antioxidant Activity)mmolTrolox/L sample
mandarino	7
bergamotto	6,90
limone	8
arancia	11
peperoncino	12
basilico	16
bac. Liquirizia	19,3
polv. Liquirizia	21,9
cardamomo	22
spezie asia	22
rad. Liquirizia intera	60,3
rad. Liquirizia grattugiata	113,4

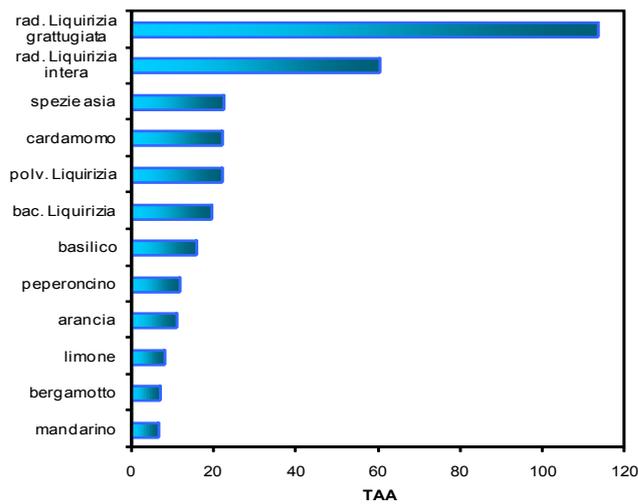


Figura 3.4.5 Attività antiossidante misurata su diversi tipi di oli aromatizzati del commercio.

L'olio di oliva aromatizzato con radice di liquirizia grattugiata, seguita dall'olio aromatizzato con radice intera, nel caso della formulazione studiata e della loro particolare diluizione, risultano presentare una attività antiossidante superiore a tutti gli oli aromatizzati, grazie alla presenza delle molecole antiossidanti, principalmente flavonidi, mentre la bacchetta e la polvere comunque rispetto agli altri oli aromatizzati presentano una buona attività antiossidante, probabilmente questo può essere dovuto sia dalla presenza dei flavonoidi termoresistenti (Beak J., et al., 2008), sia dalla presenza del 2-furanmetanolo e maltolo, molecole eterocicliche che si sviluppano durante la reazione di Maillard, le quali possiedono (Wei A., et al., 2001) attività antiossidante.

Nella **Figura 3.4.6** si riporta il profilo SPME-GC degli oli tal quale. Nella **Figura 3.4.7** della radice di liquirizia, del campione I (olio di oliva con il 30% di radice intera) e del campione H (olio extra vergine di oliva con 10% di radice grattugiata). Nella **Figura 3.4.8** della bacchetta di liquirizia tal quale insieme al campione M (olio di oliva con 30% di bacchetta di liquirizia) ed N (olio extra vergine di oliva con 30% di bacchetta di liquirizia), ed infine nella **Figura 3.4.9** ritroviamo il profilo della polvere tal quale con il campione O (olio di oliva con 30% di polvere di liquirizia) ed il campione P (olio extra vergine di oliva con 30% di polvere di liquirizia).

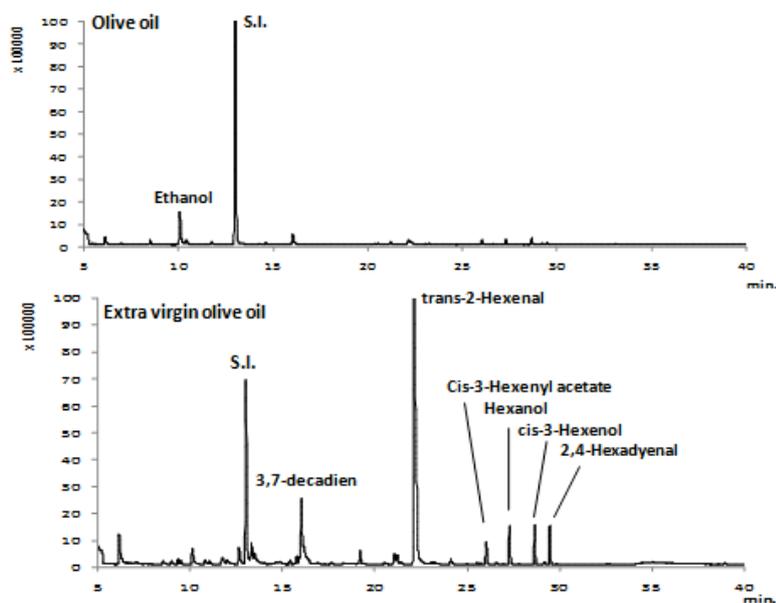


Figura 3.4.6. Profili SPME-GC/MS dell'olio di oliva (a), e dell'olio extra vergine di oliva (b).

Riscontriamo nel caso dei campioni aromatizzati con radice di liquirizia intera e grattugiata una prevalenza di 2,3 butandiolo, responsabile di conferire agli oli l'aroma dolce, mentre gli oli aromatizzati con bacchetta e polvere di liquirizia si osserva una maggiore prevalenza di sostanze passate dalla liquirizia tal quale all'olio, come la presenza di acido acetico, che risulta essere responsabile dell'aroma pungente, del 2-Furanmetanolo e maltolo che risultano essere responsabili dell'aroma di zucchero bruciato e caramello (Lee S., et al., 2009), e si è visto che il 2-Furanmetanolo e il maltolo oltre ad essere sostanze volatili generate dai trattamenti termici, infatti sono riscontrate solo nella bacchetta e nella polvere, risultano possedere anche attività antiossidanti (Wei A., et al., 2001).

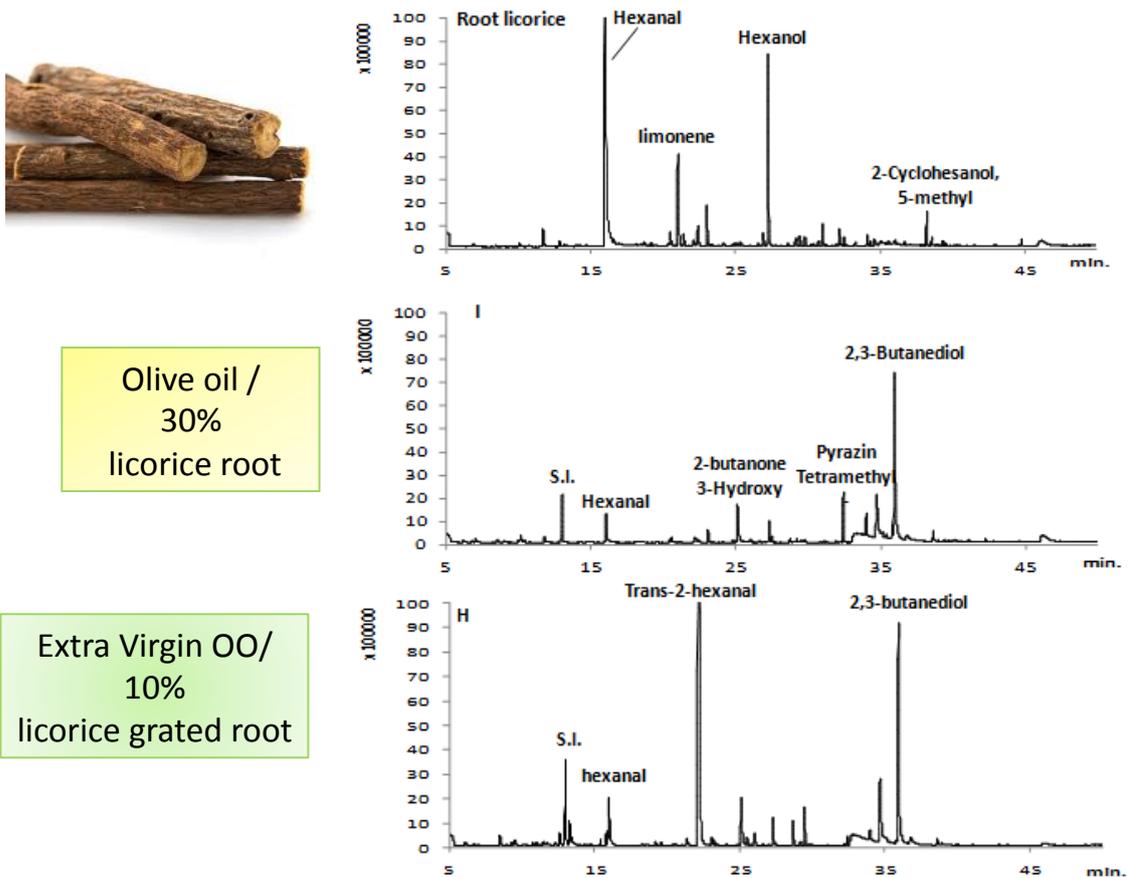


Figura 3.4.7. Profili SPME-GC/MS della radice di liquirizia, dei campioni I ed H dopo 60 giorni di infusione.



Olive oil/
30%
dry-roasted
licorice

Extra Virgin OO/
30%
dry-roasted
licorice

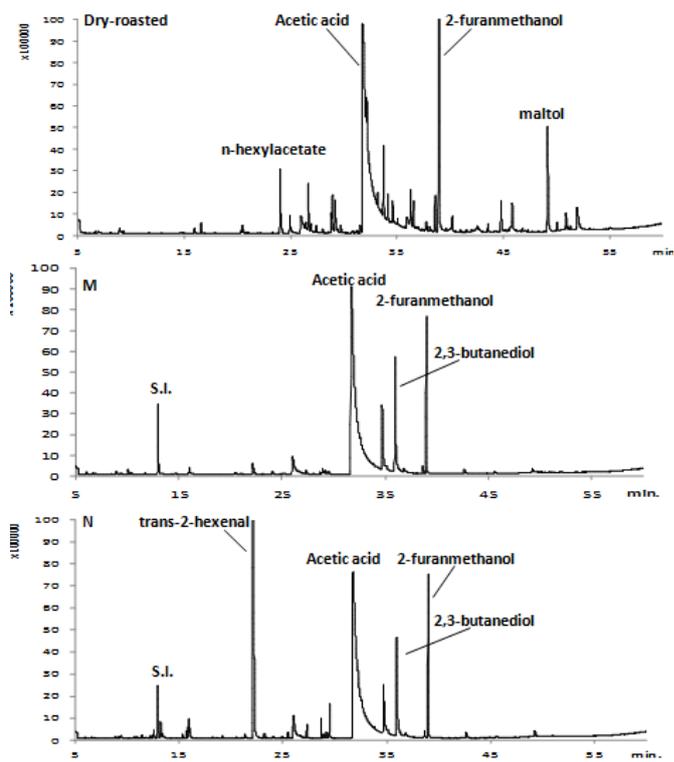


Figura 3.4.8. Profili SPME-GC/MS della bacchetta di liquirizia tal quale, e dei campioni M e N, dopo 60 giorni di infusione.



Olive Oil/
30%
Licorice powder

Extra Virgin OO/
30%
Licorice powder

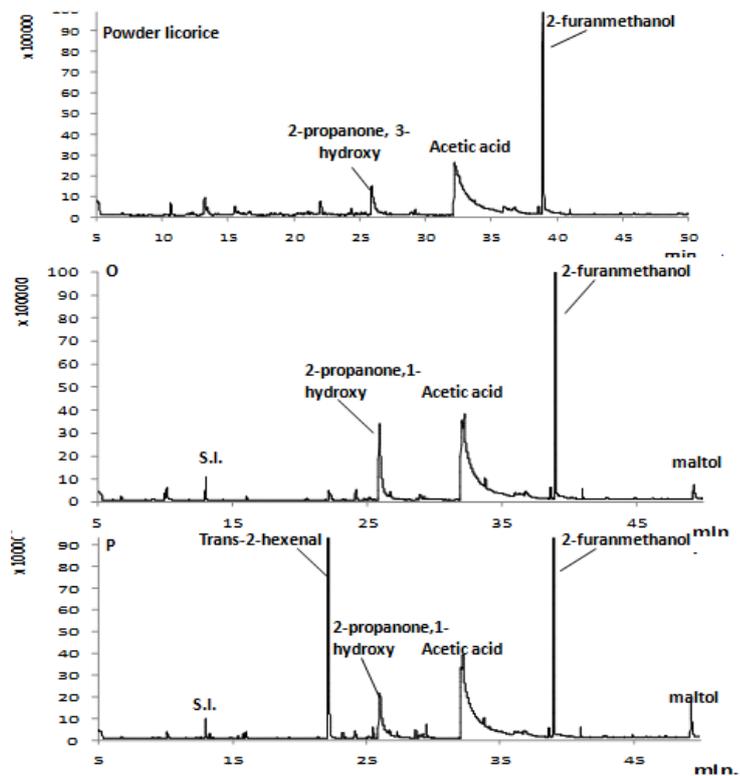


Figura 3.4.9. Profilo SPME-GC della polvere di liquirizia tal quale, dei campioni O e P, dopo 60 giorni di infusione.

È stata effettuata la valutazione sensoriale dei seguenti campioni: G, H, I, M, N, O. I descrittori ottenuti in seguito alla valutazione sensoriale sono riportati nelle seguenti **figure 3.4.10 e 3.4.11**.

Nella **figura 3.4.10** sono riportati i campioni G, H ed I. Si osserva i campioni G ed H, che sono rispettivamente aromatizzati con il 10% di radice grattugiata in olio di oliva il primo, ed in olio extra vergine di oliva il secondo, ed il campione I, che rappresenta l'olio di oliva aromatizzato con il 30% di radice intera, un profilo molto simile sul descrittore di legno di liquirizia; G ed I risultano essere molto simili sulla dolcezza, sul profilo mandorla/nocciola e infine sul gusto di liquirizia. H invece presenta a differenza di G ed I, un profilo più fruttato di oliva e legnoso, probabilmente dovuto dalla presenza dell'olio extra vergine di oliva, ma comunque risulta essere molto dolce e dal leggero sentore di liquirizia.

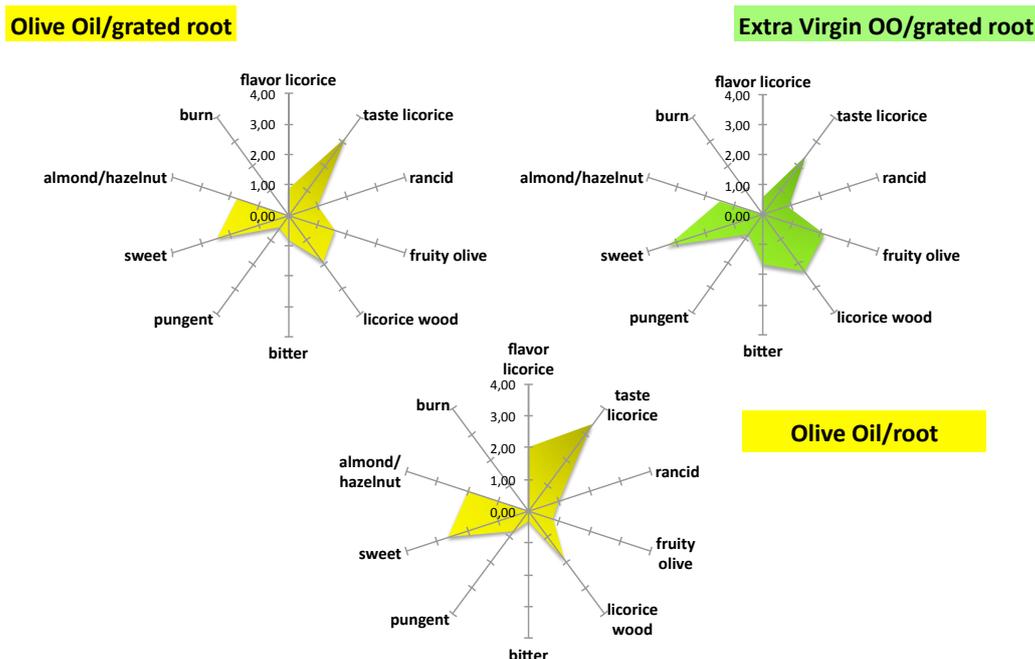


Figura 3.4.10 Valutazione sensoriale dei campioni aromatizzati con radice di liquirizia grattugiata al 10% in olio di oliva (G) e in olio extra vergine di oliva (H), e con radice di liquirizia intera al 30% in olio di oliva (I), dopo 60 giorni di infusione.

Nella **figura 3.4.11** sono riportati i profili sensoriali di M, N ed O. M ed N rappresentano gli oli aromatizzati con il 30% di bacchetta di liquirizia pura, in olio di oliva il primo, ed in olio extra vergine di oliva il secondo. O, invece rappresenta l'olio di oliva aromatizzato con il 30% di polvere di liquirizia.

Si osserva una prima differenza sensoriale rispetto ai campioni costituiti da radice, ossia l'assenza del profilo erbaceo e fruttato, ad eccezione di N, e tutti rievocano il gusto della bacchetta di liquirizia. M presenta una prevalenza di dolcezza, mandorla/nocciola e gusto di liquirizia, N ha un più intenso sentore di fruttato dovuto dalla presenza dell'olio extra vergine di oliva ed O, infine, carente di tutti gli altri descrittori trasmette all'assaggiatore una maggiore sensazione di cotto.

M risulta essere il campione con migliori preferenze, probabilmente dovuto dal fatto che riesce al meglio ad esaltare gli aromi caratteristici della bacchetta di liquirizia.

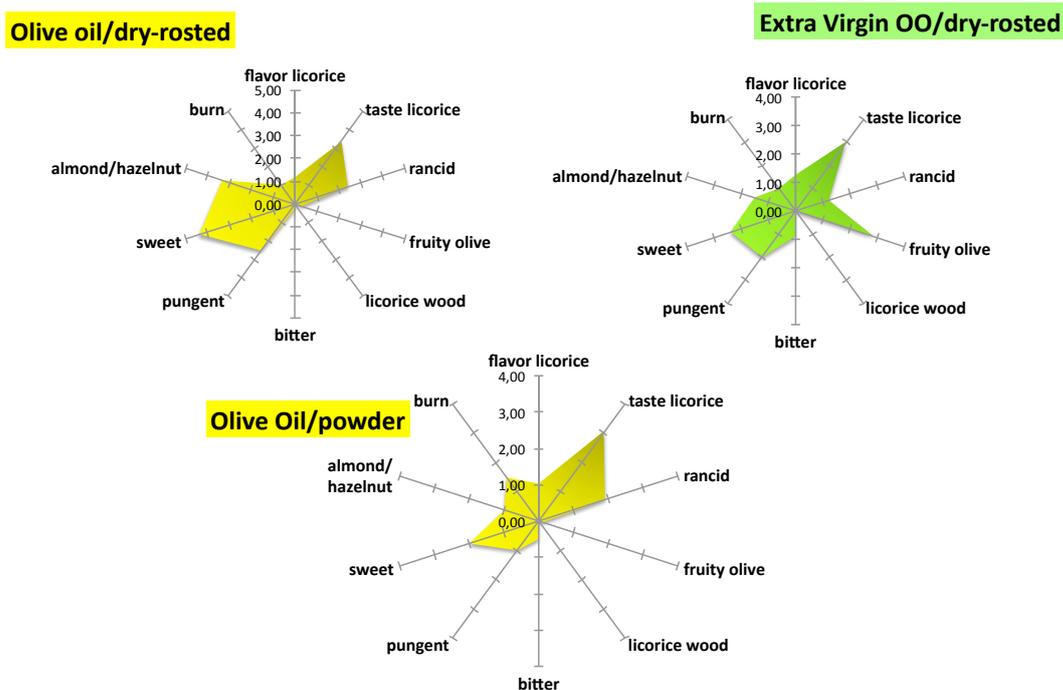


figura 3.4.11 Valutazione sensoriale dei campioni aromatizzati con bacchetta di liquirizia pura in olio di oliva (M), in olio extra vergine di oliva (N), e con polvere di liquirizia in olio di oliva (P), tutti al 30% dopo 60 giorni di infusione.

3.4.3. Conclusioni

A seguito delle prove di infusione di diverse tipologie di liquirizia (radice intera e grattugiata, bacchetta e polvere di liquirizia pura) in olio d’oliva ed olio extra vergine d’oliva, il profilo dei composti volatili, ottenuto mediante analisi SPME-GC/MS dei campioni, ha evidenziato il rilascio negli infusi dei componenti presenti nella liquirizia di partenza. In particolare, la radice di liquirizia risulta caratterizzata dalla presenza di composti C6 (esanale, esanolo) e di natura terpenica, mentre la liquirizia pura evidenzia composti generati dai trattamenti termici (2-furanmetanolo e metanolo). La valutazione sensoriale degli oli aromatizzati alla liquirizia ha permesso di evidenziarne di descrittori caratteristici: sentore di liquirizia, ma anche mandorla e nocciola, caramello e cotto per i campioni ottenuti con la liquirizia pura; i campioni ottenuti con la radice di liquirizia hanno evidenziato la prevalenza del sentore di legno di liquirizia ed erbaceo dovuto al contatto con la matrice vegetale. I campioni ottenuti per infusione con la bacchetta di liquirizia pura hanno mostrato le migliori preferenze.

Non essendo presenti in letteratura metodi di estrazione quantitativa della glicirrizina e altri isoflavonoidi derivanti dalla liquirizia in matrice oleosa, il metodo di estrazione e la procedura di analisi LC degli estratti sono stati scelti in base a metodi riportati per l’ estrazione ed l’analisi LC degli stessi dalla radice di liquirizia e metodi utilizzati per l’ estrazione dei secoroidi e lignani dagli oli vergini di oliva. La cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem, ha permesso l’identificazione della glicirrizina e dei flavonoidi responsabili del valore nutraceutico negli oli alla liquirizia.

BIBLIOGRAFIA

- AA.VV. 2009 L'ulivo e l'olio. Collana Coltura & Cultura. Angelici R, eds, Bayer CropScience, Ed Script, pp. 784
- Ahindra N (2000) Stabilization of Flaxseed oil with Capsicum antioxidant. *JAOCS* 77:799-800
- Ambrosino M.L. (2006) a curadi. I profumi dell'olio. Regione Campania e Laboratorio Chimico Merceologico della CCIAA di Napoli. pp. 103.
- Andersen Ø.M., Markham K.R. (2006) *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis Group.
- Angerosa F. (2000). Sensory quality of olive oils. In J. Harwood & R. Aparicio (Eds.), *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publications Inc.
- Angerosa F (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104:639-660
- Angerosa F, Basti C, Vito R (1999) Virgin olive oil volatile compounds from Lipoxigenase pathway and characterization of some italian cultivars. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 47:836-839
- Angerosa F., Di Giacinto L., Solinas M. (1992). Influence of *Dacus Oleae* infestation on flavor of oils, extracted from attacked olive fruits. by HPLC and HRGC analyses of volatile compounds. *Grasas y Aceites*. 43:134-142.
- Angerosa F., Mostallino R., Basti C., Vito R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 72: 19-28.
- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposito S, Montedoro G (2004) Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality, *Journal of Chromatography A* 1054:17-31
- Anese M., Manzocco L., Nicoli M.C., Lerici C.R. (1999) Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. *J Sci Food Agric*. 79:750-754.
- Antolini P. *Il Grande Manuale dell'Ulivo e dell'Olio – storia, coltivazione, lavorazione, produzione, itinerari e ricette gastronomiche*. Milano, Ed. Mondadori, 1997
- Anthon GE, Barrett DM (2003) Thermal inactivation of lipoxygenase and hydroperoxytrienoic acid lyase in tomatoes. *Food Chemistry* 81:275-279.
- Antoun N, Tsimidou M (1997) Gourmet olive oil: stability and consumer acceptability studies. *Food Research International* 30, 2:131-136
- Aparicio R., Luna G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 614-627.
- Aparicio, R, Morales MT (1998) Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric Food Chem* 46:1116-1122
- Arthur C.L., Pawliszyn J., (1990). Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145-2148.
- Baccouri O., Bendini A., Cerretani L., Guerfel M., Baccouri B., Lercker G., Zarrouk M., Miled D.D.B. (2008). Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry*, 111: 322-328.
- Baiano A, Gambacorta G, La Notte E. Aromatization of Olive Oil. *Transworld Research Network* 2010, pp. 1-29. ISBN 978-81-7895-462-2 http://www.tnres.com/ebook/uploads/baiano/T_1273557073Baianofinal.pdf
- Barone E, Di Marco L. Morfologia e ciclo di sviluppo. In *Olea. Trattato di olivicoltura*, Fiorino P, eds., Edagricole 2003, pp.13-35. ISBN 885064938x
- Benincasa C, De Nino A, Lombardo N, Perri E, Sindona G, Tagarelli A (2003). Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern italian regions by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51:733-741
- Breer H. (2008). The sense of smell – Reception of flavors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1126: 1-6.
- Biondi A, Borghetti N, Castellanza V, Farioli A, Magni A, Pasini S (2008) L'analisi del settore dell'olio d'oliva in Italia. Corso in Economia del consumo aa 2007/2008. Libera Università di lingue e Comunicazione. <http://www.iulm.it>
- Campeol E, Flamini G, Chericoni S, Catalano S, Cremonini R (2001) Volatile compounds from three cultivars of *Olea europea* from Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:5409-5411.

- Caporale G, Policastro S, Monteleone E (2004) Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hesene-1-ol) in a model olive oil. *Food Quality and Preference*, 15:219-227.
- Cavalli J, Fernandez X, Lizzani-Cuvelier L, Loiseau A (2004) Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry* 88:151-157.
- Cimato A, Baldini A, Moretti R (2001) L'olio di oliva: cultivar, ambiente e tecniche agronomiche. Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione nel settore Agricolo-Forestale. Firenze, Gennaio 2001.
- Conde C, Delrot S, Geros H (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology* 165:1545-1562.
- De Giorgi et al., (2000), R. Bortolomeazzi, L. Piazzale, in *Alli del Convegno "Azioni combinate nella stabilizzazione dei prodotti alimentari"*. Università degli Studi di Udine. Udine 1992.
- Della Medaglia D., Ambrosino M.L., Spagna Musso S., Sacchi R. (1996). Modification of phenols during the storage and heating of extra-virgin olive oil. In: *Oil process and biochemistry of lipids; Proceedings of the 1st European Meeting of the American Oil Chemists' Society, University of Burgundy, Dijon, France; AOCS: Champaign, IL.* p. B24.
- Di Giovacchino L, Costantini N, Serraiocco A, Surricchio G, Basti C (2001) Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103:279-285
- Di Vaio C (2008) Dispense delle lezioni di Olivicoltura, Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, Università degli Studi di Napoli "Federico II"
- Dhifi W., Hamrouni I., Ayachi S., Chahed T., Saidani M., Marzouk B. (2004). Biochemical characterization of some tunisian olive oils. *Journal of Food Lipids*. 11: 287-296.
- Doveri S, Baldoni L. Olive. In *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 4 Fruits and Nuts*, Kole C, eds., Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, pp. 253-264.
- Duarte C., Moldão-Martins M., Gouveia A. F., Beirão da Costa S., Leitão A. E., Bernardo-Gil M.G. (2004). Supercritical fluid extraction of red pepper (*Capsicum frutescens* L.). *J. of Supercritical Fluids*. 30, 155-161.
- Duthie G, Crozier A. (2000) Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology*, 11, 43-47.
- EC (1991). Commission regulation (EEC) no. 2568/91 dell'11 luglio 1991 sulle caratteristiche dell'olio di oliva e sui metodi di analisi. *Official Journal L.*, 248:1-83)
- Escuderos M.E., Uceda M., Sanchez S., Jimenez A. (2007). Instrumental technique evolution of olive oil sensory analysis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 536-546.
- Francesconi L (2005) La liquirizia. Tesi di laurea in STAL. Università di Udine.
- Garcia-Gonzales DL, Aparicio R (2010) Research in olive oil: Challenges for the near future. *J Agric Food Chem* 58:12569-12577
- Garcia-Gonzales DL, Aparicio-Ruiz R, Aparicio R (2008) Virgin olive oil – Chemical implications on quality and health. *Eur J Lipid Sci Technol*, 110:602-607
- Giomo A. (1999). La qualità dell'olio d'oliva extra vergine come viene percepita dai consumatori. *Olivo & Olio*. 3, 33-48.
- Gomez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Del Carlo M., Compagnone D., Cichelli A. (2008). Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 4577-4583.
- Gomez-Rico A., Salvador M.D., Fregapane G. (2009). Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETC in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International*, 42: 1067-1076.
- Gomez-Rico A, Salvador MD, La Greca M, Fregapane G (2006) Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L., cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7130-7136
- Gucci R., Perri E., Servili M. (2004). Il miglioramento delle caratteristiche organolettiche tipiche degli oli extra vergini di oliva rispetto alle esigenze di mercato. Campagna finanziata con il contributo della Comunità Europea Reg. (CE) n. 133/2004. Pisa, pp.63.

- Guth H. and Grosch W. (1991). A Comparative Study of the Potent Odorant of Different Virgin Olive Oils. *Fat. Sci. Technol.* 9: 335-339.
- Guth H., Grosch W. (1993). Quantitation of a potent odorants of virgin olive oil by stable isotope dilution assay. *J.A.O.C.S.* 70: 513-518.
- Fogher C, Busconi M, Sebastiani, Bracci T. Olive Genomics. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy VR & Ross R, eds., Elsevier Inc. 2010, pp. 17-24. ISBN: 978-0-12-374420-3
- Fogliano V., Monti S.M., Ritieni A., Gallo M., Della Medaglia D., Ambrosino M.L., Sacchi R. (1999). Antioxidant activity of virgin olive oil phenolic compounds in a micellar system. *J Sci Food Agric.* 37:1458-65.
- Frankel EN (2011) Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 59: 785-792
- Herrmann K., (1976) Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.*, 11,433.
- Huang S-W, Hopia A, Schwarz K, Frankel EN, German JB. (1996b). Antioxidant activity of a-tocopherol and Trolox in different lipid substrates. *J. Ag. Food. Chem.* 44, 444–452.
- Hasler C.M. (1998). Functional foods: their role in disease prevention and health. *Food Technology*, 52, 63–69.
- Iorizzi M., Lanzotti, V., De Marino S., Zollo F., Blanco-Molina M., Macho A., and Munoz E. (2001). New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *J Agric Food Chem.* 49, 2022-9.
- Ishikawa K., Janos T., Sakamoto S. and Nunomura O. (1998) The contents of capsaicinoids and their phenolic intermediates in the various tissues of the plants of *Capsicum annuum* L. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 17, 22–25.
- Issaoui M., Jlamini G., Brahmi F., Dabbou S., Hassine K.B., Taamali A., Chehab H., Ellouz M., Zarrouk M., Hammami M. (2009). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chetoui olive oils. *Food Chemistry*, 119: 220-225.
- Inarejos-Garcia AM, Santacatterina M, Salvador MD, Fregapane G, Gómez-Alonso S (2010) PDO virgin olive oil quality—Minor components and organoleptic evaluation. *Food Research International* 43:2138–2146
- Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K (2007) Olive oil volatile compounds, flavor development and quality: a critical review. *Food Chemistry* 100:273–286
- Kalua C.M., Bedgood D.R., Bishop A.G., Prenzler P.D. (2006). Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7641-7651.
- Kandyli P, Vekiari AS, Kanellaki M, Grati Kamoun N, Msallem M, Kourkoutas Y (2011) Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *Food Science and Technology* 44:1333–1341
- Kawada T., and Iwai K. (1985). In vivo and in vitro metabolism of dihydrocapsaicin, a pungent principle of hot pepper, in rats. *Agric. Biol. Chem.* 49, 441-448.
- Kawada T., Suzuki T., Takahashi M., and Iwai K. (1984). Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 72, 449-56.
- Kempaiah R. K., Manjunatha H., and Srinivasan K. (2005). Protective effect of dietary capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein in rats. *Mol Cell Biochem* 275, 7-13.
- Kiritsakis AK (1998) Flavor components of olive oil – a review. *Journal of the American Chemists Society* 75: 673–681
- Kiritsakis A.K., Nanos G.D., Polymenopoulos Z., Thomai T., & Sfakiotakis M. (1998). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75, 721–724.
- Kobata K., Todo T., Yazawa S., Iwai K., and Watanabe T. (1998). Novel capsaicinoid-like substances, capsiate and dihydrocapsiate, from the fruits of a nonpungent cultivar, CH-19 Sweet, of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem.* 46, 1695-697
- Kogure K., Goto S., Nishimura M., Yasumoto M., Abe K., Ohiwa C., Sassa H., Kusumi T., and Terada H. (2002). Mechanism of potent antiperoxidative effect of capsaicin. *Biochim Biophys Acta* 1573, 84-92.
- Korel F., Bagdatlioglu N., Balaban M. O., and Hisil Y. (2002) Ground Red Peppers: Capsaicinoids Content, Scoville Scores, and Discrimination by an Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3257-3261.
- Kubo A., Lunde C.S., Kubo I. (1995). Antimicrobial activity of the olive oil flavor compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 1629-1633.

- Kuhnau J., (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24, 117.
- Lazzez A, Perri E, Caravita MA, Khlis M, Cossentini M (2008) Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the Chemlali variety. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 56:982–988
- Lee A., Thurnham I., Chopra M. (2000) Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity plasma. *Free Radical Biology & Medicine.* 29(10):4723-7.
- Lee Y. S., Kang Y. S., Lee J. S., Nicolova S., and Kim J. A. (2004b). Involvement of NADPH oxidase-mediated generation of reactive oxygen species in the apoptotic cell death by capsaicin in HepG2 human hepatoma cells. *Free Radic Res* 38, 405-12.
- Lee Y., Howard L. R., and Villalòn B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *J of Food Sci* 60, 473-76.
- Leete E. and Loudon M.C.L. (1968). Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum frutescens*. *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6837-6841.
- Leistner L (2000) Basic aspect of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181-186
- Lingnert H., Eriksson C.E. (1980) Antioxidative Maillard reaction products. I. Products from sugars and free amino acids. *J Food Process Preserv.* 4:161-167.
- Luna G., Morales M.T., Aparicio R. (2006). Characterization of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98: 243-252.
- Luaces P., Perez A.G., Sanz C. (2003). Role of olive seed in the biogenesis of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 4741-4745.
- Manai H, Mahjoub-Haddada F, Oueslati I, Daoud D, Zarrouk M (2008) Characterization of monovarietal virgin olive oils from six crossing varieties. *Science Horticulturae* 115:252–260
- Marin A., Ferreres F., Tomas-Barberan F. A., and Gil M. I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *J Agric Food Chem.* 52, 3861-9.
- Matsufuji, H., Nakamuro, H., Chino, M. & Mitsuharo, T. (1998). Antioxidant activity of capsanthin and the fatty acid esters in paprika (*Capsicum annum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 46, 3462–3472.
- Migliorini Maria Grazia. La produzione delle conserve vegetali. Collana: Quaderno ARSIA 7/2004. ARSIA Regione Toscana 2004. ISBN 88-8295-062-X
- Montealegre C, Alegre MLM, Garcia-Ruiz C (2010) Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:28-38
- Montedoro G., Bertuccioli M., Anichini F. (1987). Aroma analysis of virgin olive oil by head space volatiles extraction techniques, in *Flavor of Foods and Beverages.* Academic Press. New York, pp. 247-281. Morales MT, Aparicio R, Rios JJ (1994) Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J Chromatog A* 668(2):455-462
- Morales M.T., Luna G., Aparicio R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.*, 91: 293-301.
- Monti S., Ritieni A., Sacchi R., Skog K., Borgen E., Fogliano V. (2001) Characterisation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil and their Effect on the Formation of Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Amines in a Model System. *J. Agric. Food Chem.* 49:3969-3975.
- Montoro P, Maldini M, Russo M (2011) Metabolic profiling of roots of liquorice from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS. *J. Pharma and Biom Analysis* 54:535-544
- Muir S.R., Collins G.J., Robinson S., Hughes S., Bovy A., De Vos C.H.R., van Tunen A.J., Verhoeven M.E. (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of Flavonols. *Nature Biotechnology.* 19, 470-474.
- Murakami K., Ito M., Htay H., Tsubouchi R., and Yoshino M. (2001). Antioxidant effect of capsaicinoids on the metal-catalyzed lipid peroxidation. *Mol Cell Biochem* 275, 7-13.
- Ohnuki K., Haramizu S., Oki K., Watanabe T., Yazawa S., and Fushiki T. (2001). Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 65, 2735-40.

- Olias JM, Perez AG, Rios JJ, Sanz C (1993) Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:2368-2373.
- Paduano A., Ambrosino M.L., Della Medaglia D. A., Monteleone E., Sacchi R. (2009). Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione. In Atti I Convegno nazionale dell'Olio e dell'Olio, Acta Italicus Hortus, SOI, eds, pp341-344 ISBN 978-88-905628-0-8
- Paduano A., Ferrara L., Sacchi R. (2009). Gramolazione controllata e profilo qualitativo degli oli extravergini di oliva. . In Atti I Convegno nazionale dell'Olio e dell'Olio, Acta Italicus Hortus, SOI, eds, ISBN 978-88-905628-0-8
- Pellegrini N., Re R., Yang M., Rice-Evans C. (1999) Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical cation decolorization assay. *Methods in Enzymology* 299, 379-389.
- Pellegrini N., Visioli F., Buratti S., and Brighenti F. (2001) Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of olive oil and Studies on the Influence of Heating. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2532-2538.
- Perez A.G., Sanz L.C., & Olias J.M. (1993). Partial-purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1462–1466.
- Perez A.G., Sanz L.C., Olias R., Rios J.J., Olias J. M. (1996). Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3286–3290.
- Pernice R., Vitaglione P., Sacchi R., Fogliano V. (2007). Phytochemicals in Mediterranean Diet: the Interaction between tomato and olive oil bioactive compounds. In *Handbook of Food Products Manufacturing (2 Vol. Set)* Editor: Y.H.
- Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.
- Poggi P. (2002). Peperoncini Piccanti. *Accademia italiana del peperoncino*. p 13-54.
- Hui et al., Wiley-Interscience, Chapter 48, pp 53-63. Preziuso S.M., Di Serio M.G., Biasone A., Vito R., Mucciarella M.R., Di Giovacchino L. (2009). Effetti dei differenti metodi di frangitura delle olive sulla resa e sulle caratteristiche qualitative dell'olio vergine di oliva. In Atti I Convegno nazionale dell'Olio e dell'Olio, Acta Italicus Hortus, SOI, eds, ISBN 978-88-905628-0-8
- Ranalli A., Contento S., Schiavone C., Simone N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103: 228-238.
- Ranalli A, De Mattia G, Patumi M, Proietti P (1999) Quality of virgin olive oil as influenced by origin area. *Grasas Y Aceites* 50:249–259
- Reiners & Grosch W. (1998). Odorants of virgin olive oil with different flavor profiles. *Journal of Agricultura and Food Chemistry*, 46, 2754–2763.
- Sabbioni C, Ferranti A, Bugamelli F (2006) Simultaneous HPLC analysis with isocratic elution of glycyrrhin and glycyrrhetic acid in liquorice roots and confectionery products. *Fitochem Analysis* 17:25-31
- Sacchi R. (2008). L'olio extravergine in cucina. Università degli studi di Napoli. Ed SBR. ISBN 88-901941-2-X
- Sacchi R. (2011). Appunti e lucidi dalle lezioni. Laboratorio di ricerca sugli oli e grassi. Dipartimento di Scienza degli Alimenti. Università degli studi di Napoli “Federico II”.
- Sacchi R, Della Medaglia D, Ambrosino ML, Paduano A, Tartaglione L, Spagna Musso S. Linee guida per la qualità dell'olio vergine di oliva. IV edizione finanziata dalla Unione Europea. Reg. CE 2407/01, Portici, 2003
- Sacchi R., Mannina L., Fiordiponti P., Barone P., Paolillo L., Patumi M., Segre A. (1998). Characterization of italian extra virgin olive oils using ¹H-NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46: 3947-3951.
- Sacchi R., Paduano A., Fiore F., Della Medaglia D., Ambrosino M.L., Medina I. (2002). Partition behavior of virgin olive oil phenolic compounds in in Oil-Brine mixtures during thermal processing for fish canning. *J. Agric.Food Chem.* 50:30-2835.
- Sacchi, R., C. Parisini, A. Paduano, D.A. Della Medaglia, M. Savarese & M.L. Ambrosino, 2010. Relationship between sensory profile and volatile compounds: identification of sensory typicality in PDO Italian olive oils. *Proceeding Acts “Agrostat 2010 – 11th European Symposium on Statistical Methods for the Food Industry”* (Academy School, eds) pp. 65-72, Univ. of Sannio, Benevento, Italy. ISBN: 88-901015-8-X
- Sakouhi F, Absalon C, Sebei K, Fouquet E, Boukhchina S, Kallel H (2009) Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of triterpene alcohols and monomethylsterols in developing *Olea europea* L. fruits. *Food Chem* 116: 345-350
- Salas J (2004) Characterization of alcohol acyltransferase from olive fruit. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52:3155–3158

- Salas J, Sanchez JJ (1999) Hydroperoxide lyase from olive (*Olea europea*) fruits. *Plant Science* 143:19–26
- Salas JJ, Williams M, Harwood JL, Sanchez J (1999) Lipoxigenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists Society* 76:1163–1168.
- Salvador M.D., Aranda F., Fregapane G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality – A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*. 73: 45-53.
- Sanchez J, Harwood JL (2002) Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:564-573
- Sanchez-Ortiz A., Romero C., Perez A. G., Sanz C. (2008). Oxygen concentration affects volatile compound biosynthesis during virgin olive oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 4681-4685
- Sanchez J, Salas JJ. Biogenesis of olive oil aroma. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. Gaithersburg, Harwood J & Aparicio R, eds., Maryland, USA: Aspen publications, Inc., 2000
- Scamosci M, Ridolfi M. e Patumi M. (2009). Evoluzione della drupa e dei principali composti che determinano la qualità dell'olio in tre cultivar di olivo allevate in Umbria durante l'inolizione. In *Atti I Convegno nazionale dell'Olio e dell'Olio*, Acta Italicus Hortus, SOI, eds, ISBN 978-88-905628-0-8
- Servili M., Piacquadio P., De Stefano G., Taticchi A., Sciancalepore V. (2002). Influence of a new crushing technique on the composition of the volatile compounds and related sensory quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104: 483-489.
- Sim H. Ki & Young H. Sil. (2008). Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annum*) pericarp and seed extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1813-1823.
- Simonelli P. *Esportazioni di prodotti agro-alimentari italiani 2008-2010*. I.C.E. – Istituto nazionale per il Commercio Estero, 2011
- Sinelli N. (2008) www.silsismi.unimi.it/SILSISMI/Indirizzi/Indirizzi_doc/Tecnologico/conserve-Sinelli.pdf
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A (2008) Mediterranean diet and health status: a meta-analysis. *BMJ* 337: 673-675
- Stark AH, Madar Z (2002) Olive oil as a functional food: Epidemiology and nutritional approaches. *Nutrition Reviews*. ProQuest Agriculture Journals 60, 6:170-176
- Stefanoudaki E., Williams M., Chartzoulakis K., Harwood J. (2009). Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7048-7055.
- Surh, Y. J. (2002) Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol* 40, 1091-7
- Temime A.B., Campeol E., Cioni P.P., Daoud D., Zarrouk M. (2006b). Volatile compounds from Chetoui olive oil and variations induced by growing area. *Food Chemistry*, 99: 315-325.
- Temime S.B., Wael T., Bechir B., Leila A., Douja A., Mokhtar Z. (2006a). Changes in olive oil quality of Chetoui variety according to origin of plantation. *Journal of Food Lipids*. 13: 88-99.
- Tsimidou M., Papadopulos G. & Boskou D., (1992). Determination of phenolic compounds in virgin oliveoil by reversed-phase HPLC with Emphasis on UV Detection. *Food Chem.* 44, 53-60.
- Tura D., Failla O., Bassi D., Pedo S., Serraiocco A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, 118: 139-148.
- UNAPROL (2010) Lo scenario economico di settore “Olivicoltura da olio”. <http://www.unaprol.it>
- USDA (2007) Phytochemical and Ethnobotanical Databases. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/duke/>
- Vekiari SA, Papadopoulou P, Kiritsakis A (2007) Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes. *Grasas Y Aceites* 58:237–242
- Vichi S, Castellote AI, Pizzale L, Conte LS, Buxaderas S, Lòpez-Tamames E (2003) Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace Solid-Phase MicroExtraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection, *Journal of Chromatography A* 983:19-33
- Vichi S, Guadayol JM, Caixach J, Lòpez-Tamames E, Buxaderas S (2006) Monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons of virgin olive oil by headspace solidphase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1125:117-123

- Vichi S, Romero A, Tous J, Lopez-Tamames E, Buxaderas S (2008) Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance. *Journal of Chromatography* 1211:1-7
- Vichi S, Romero A, Tous J, Caixach J (2011) The activity of healthy olive oil extraction influences oil chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:4705-4714
- Vlahov G., Del Re P., Simone N. (2003). Determination on geographical origin of olive oils using ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy – Classification of olive oils of the Puglia region with Denomination of Protected Origin. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5612-5615.
- Williams M.T., Morales M.T., R. Aparicio, Harwood J.L. (1998) Analysis of volatile from calles cultures of olive *Olea europaea*. *Phytochemistry* 47:1253–1259.
- Zachariah Jhon T., and Gobinath P., (2008). Paprica and Chilli. *Chemistry of spices*. Edited by V.A. Parthasarathy. 260-286.
- Zunin P., Boggia R., Salvadeo P., Evangelisti F. (2005). Geographical traceability of West Liguria extravirgin olive oils by the analysis of volatile terpenoid hydrocarbons. *J. Chrom. A.*, 1089: 243-249.

APPENDICE

PUBBLICAZIONI

Articoli in atti di convegni:

- Sacchi, R., C. Parisini, A. Paduano, **D.A. Della Medaglia**, M. Savarese & M.L. Ambrosino, 2010. Relationship between sensory profile and volatile compounds: identification of sensory typicality in PDO Italian olive oils. Proceeding Acts “Agrostat 2010 – 11th European Symposium on Statistical Methods for the Food Industry” (Academy School, eds) pp. 65-72, Univ. of Sannio, Benevento, Italy. ISBN: 88-901015-8-X
- Della Medaglia, D.A.**, 2010. Volatile markers of Extra Virgin Olive Oil quality and typicality. Proceeding Book “15th WORKSHOP on the development in the Italian PhD research on Food Science Technology and Biotechnology” (Cues, eds.) pp. 231-232, Univ. of Naples “Federico II”, Portici (NA), Italy. ISBN: 978-88-95028-62-0
- Paduano, A., M.L. Ambrosino, **D.A. Della Medaglia**, E. Monteleone, & R. Sacchi, 2011. Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione. Atti del “I° Convegno Nazionale dell’Olivo e dell’Olio” (Acta Italus Hortus, SOI, eds) pp. 341-344. ISBN 978-88-905628-0-8

Abstracts per Poster e comunicazioni orali a convegni

- Paduano, A., M.L. Ambrosino, **D.A. Della Medaglia**, E. Monteleone, & R. Sacchi, 2009. Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione. In Abstract Book “I° Convegno Nazionale dell’Olivo e dell’Olio” p. 85, Univ. degli Studi di Napoli “Federico II”- Facoltà di Agraria, Portici (NA), Italia.
- Della Medaglia, D.A.**, G. Nicoletti, A. Paduano, & R. Sacchi, 2010. La capsaicina nell’olio aromatizzato al peperoncino. In Atti del Convegno “Giornate Scientifiche 2010” Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita (Cues, eds.) p 312, Univ. degli Studi di Napoli “Federico II” – Facoltà di Medicina e Chirurgia, Napoli, Italia. ISBN: 978-88-95028-66-8
- Della Medaglia, D.A.**, G. Orlando, A. Paduano, M.L. Ambrosino & R. Sacchi, 2010. Profilo sensoriale degli oli extravergini di oliva in relazione ai composti fenolici e volatili. In Atti del Convegno “Giornate Scientifiche 2010” Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita (Cues, eds.) p 319, Univ. degli Studi di Napoli “Federico II” – Facoltà di Medicina e Chirurgia, Napoli, Italia. ISBN: 978-88-95028-66-8
- Sacchi, R., C. Parisini, A. Paduano, **D.A. Della Medaglia**, M. Savarese & M.L. Ambrosino, 2010. Relazione tra tipicità sensoriale e composti volatili in alcuni oli extravergini DOP italiani. In Atti del Convegno Nazionale di Scienze Sensoriali (Cues, eds.) p 27, Univ. degli Studi di Napoli “Federico II”-Facoltà di Agraria, Portici (NA), Italia. ISBN: 978-88-95028-67-5
- Sacchi, R., M. Ascione, A. Paduano, **D.A. Della Medaglia**, 2010. Qualità Sensoriale di Pomodorini Semi-Dry Sott’Olio Prodotti con Diversi Oli Alimentari. In Atti del Convegno Nazionale di Scienze Sensoriali (Cues, eds.) p 29, Univ. degli studi di Napoli “Federico II”- Facoltà di Agraria, Portici (NA), Italia. ISBN: 978-88-95028-67-5
- Cimmino, A., A. Paduano, **D.A. Della Medaglia** & R. Sacchi, 2011. Marcatori di tipicità degli oli d'oliva della Penisola Sorrentina. In Abstract Book “II° Convegno Nazionale dell’Olivo e dell’Olio” p 52, Univ. degli Studi di Perugia – Facoltà di Agraria, Perugia, Italia.
- Robertello, R., **D.A. Della Medaglia**, A. Paduano & R. Sacchi, 2011. Caratterizzazione di oli di oliva di varietà calabresi. In Abstract Book “II° Convegno Nazionale dell’Olivo e dell’Olio” p 112, Univ. degli Studi di Perugia – Facoltà di Agraria, Perugia, Italia.

AGRO-INDUSTRIE
et MÉTHODES
STATISTIQUES

DASES
Dipartimento di Analisi dei Sistemi Economici e Sociali

Università
degli Studi
del Sannio

$$(X, Y) = \left(X^j \frac{\partial Y^i}{\partial x^j} - Y^j \frac{\partial X^i}{\partial x^j} \right) \frac{\partial}{\partial x^i}$$

**11th European Symposium on
STATISTICAL METHODS FOR
THE FOOD INDUSTRY**

**11^{èmes} Journées Européennes
AGRO-INDUSTRIE ET
MÉTHODES STATISTIQUES**

BENEVENTO

Italy - Italie

23 - 26 February 2010

23 - 26 Février 2010

**Under the auspices of the
French Statistical Society**

**Sponsored by the
Italian Statistical Society**

PROCEEDINGS

ACTES

EDITORE
ACADEMY SCHOOL

ISBN N. 88-901015-8-X

Copy write by ACADEMY SCHOOL – January 2010

The rights for translation. Reproduction and total or partial adaptation and through any means (including photocopies, didactic films and microfilms) are foreseen for all countries.

To the reader

the realization of a book has variable costs (paper, print, binding) and fixed costs, that are independent of the number of copies printed (translation, preparation of originals, editorial, composition, pagination). Photocopiers can limit costs because other than not having to pay for the Author's Rights, they do not have fixed costs.

On the other hand, reducing the number of copies sold by the editor, will give rise to the incidence of the fixed price per copy and force the editor to raise the price for each photocopy; this naturally gives further incentive to photocopy. If this vicious circle is not broken, we will get to the point that the editors will not have the economic convenience to print books anymore.

The Editor



P.zza Municipio (Via S. Maria, 3) – Afragola (Na)

Tel/Fax 081 8525819

www.academyschool.it

info@academyschool.it

**Relation entre le profil sensoriel et les composés volatils:
identification de la typicité sensorielle des huiles d'olive
italiennes AOP**

**Relationship between sensory profile and volatiles
compounds: identification of sensory typicality in PDO
Italian olive oils**

Raffaele Sacchi¹, Cristina Parisini², Antonello Paduano¹, Dorotea Anna Della Medaglia¹,
Maria Savarese² & Maria Luisa Ambrosino³

¹ *Department of Food Science, University of Naples Federico II, Naples, Italy,*

E-mail : sacchi@unina.it

² *CRIOL, Centro Ricerche per l'Industria Olearia, Industria Olearia Biagio Mataluni; Montesarchio (BN), Italy*

³ *ASA, Analisti Sensoriali Associati, Naples, Italy*

Abstract

Sensory profiles of extra virgin olive oils produced in geographical areas corresponding to some Protected Denomination of Origin (PDO) from traditional Italian olive varieties show some typical sensory notes like 'green tomato' (or 'tomato leaves'), 'rosemary' (or 'oregano'), 'bitter almond', 'basil'. The gas-chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of volatile compounds, carried out by dynamic head-space (DHS) and solid phase micro extraction (SPME), in combination with Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Analysis (PLS) data evaluation, allowed to identify in some aldehydes, alcohols and esters arising from the lipoxigenase pathway and in some terpenoid compounds the key-molecules able to explain some perceived sensory attributes. Hypothesis on the eco-physiological role of these compounds should be the key to understand the molecular basis of virgin olive oil typicality, mainly in relation to the interactions between the olive variety and growing environment/conditions. The typical flavour of PDO oils from 'Penisola Sorrentina', as an example, can be put in relation to several volatiles involved in the plant-insect co-evolution mechanisms.

Keywords : aroma, virgin olive oil, DHS, SPME, GC/MS, Protected Denomination of Origin, PCA, PLS, sensory quality, volatile compounds.

Résumé

Les profils sensoriels de certaines huiles d'olive vierges extra produites dans les zones géographiques correspondants à ces d'Appellation d'Origine Protégée (AOP) et obtenues à partir des variétés d'olives italiennes traditionnelles, ont montré des typiques notes sensorielles comme celle de 'tomates vertes' (ou 'feuilles de tomate'), 'rose marin' (ou 'origan'), 'amande amère', 'basilic'. L'analyse conduite par gas-chromatography / spectrométrie de mass (GC/MS) des composés volatiles de ces échantillons d'huile, réalisée par l'analyse de l'espace de tête dynamique (DHS) et la Solid Phase Micro Extraction (SPME), et l'application de l'analyse statistique (PCA et PLS), permettent d'identifier, dans certains aldéhydes, esters et alcools obtenu pa la

rue de la lipoxigenase et dans certains composés terpénoïdes, la molécules-clé capables d'expliquer quelques caractéristiques sensorielles de tipicité. Le rôle physiologique de ces composés peut être la clé pour comprendre la base moléculaire de la tipicité de certains huiles d'olive vierges extra, principalement en ce qui concerne les interactions entre la variété d'olive et les conditions de croissance. L'arome typique des huiles AOP de la 'Penisola Sorrentina', peut être mis en relation à certain composés volatiles liés à la relation olivier-insectes et aux mécanismes de co-evolution.

Mots-clés : aroma, huile d'olive vierge, DHS, SPME, GC/MS, Appellation d'Origine Protégée (AOP), PCA, PLS, qualité sensorielle, composés volatils.

1. Introduction

The olive tree has shaped the Mediterranean landscape since ancient times. Both the high oil content and the wide geographical adaptation of the tree helped to make this plant the main oil crop of the classical ancient world. Virgin Olive Oil (VOO) is a 'lipid juice' obtained from fresh olive fruits, by means of purely mechanical and physical processes. VOO is unique among edible vegetable oils because of its antioxidant properties, its delicious taste and aroma and its key-role in Mediterranean food habits. Volatile compounds responsible for the flavour of VOO are mainly produced by oxidation of fatty acids. Endogenous olive fruit enzymes (lipoxygenase pathway) produce the positive flavour in VOO (Angerosa et al., 2004;). On the other hand molecules produced by exogenous enzymes, usually from microbial activity, and from autoxidation are associated with sensory defects (Morales et al., 2005). Volatile compounds are low molecular weight compounds (less than 300 Da) which vapourise readily at room temperature. Some volatile compounds reach the olfactory epithelium, dissolve into the mucus and may bond with olfactory receptors to give odour sensations. The aroma of VOO is attributed to aldehydes, alcohols, esters, hydrocarbons, ketones, furans, terpenes (Sakouhi et al., 2009), phenols (Vichi et al., 2008) and other as yet unidentified volatile compounds. The major volatile compounds reported in virgin olive oils are the C6 and C5 compounds (Luna et al., 2006; Escuderos et al., 2007). In this work, the most remarkable results by PCA and PLS processing of data obtained by sensory and instrumental analysis of aroma compounds in VOOs were reported. The analysis of sensory and GC/MS data could allow to find some possible molecular markers to identify and protect the tipicality of Protected Denomination of Origin (PDO) extra virgin olive oils. Some characteristic aromas in VOO from traditional varieties could be, in fact, enhanced through the modulation of agronomic and technological practises, to obtain PDO olive oils with improved and controlled sensory quality and tipicality.

2. Experimental

2.1 Sampling

Protected Denomination of Origin (PDO) oils and oils from traditional Italian olive varieties were collected from Department of Food Science (Portici, Naples) and from the Industria Olearia Biagio Mataluni s.r.l. (Montesarchio, Benevento) during the 2007/08 and 2008/09 seasons.

2.2 Sensory evaluation

Sensory evaluation was carried out by a trained panel according to the EC method (Regulation n. 2568/91 and its updates Regg 796/02 and 640/08).

2.3 HS-SPME-GC/MS and DHS-GC/MS analysis of oils

SPME-GC/MS. The volatile compounds were extracted and concentrated by SPME and analyzed by a GC/MS system (Vichi et al., 2003). Olive oil samples (3 ml) were placed into a 20 mL headspace glass vial with screw cap and PTFE/silicon septa. Extraction and concentration of volatiles was carried out with a 50/30 mm DVB-CAR-PDMS fibre (Supelco, Bellefonte, USA). The desorbed compounds were separated on a Shimadzu gas chromatograph (QP5050A) with mass spectrometer detector (E.I. 70eV) (Shimadzu, Milan, Italy) equipped with a 60 m x 0,32 mm i.d., film thickness 0,50 mm, Supelcowax TM 10 (Supelco, Bellefonte, USA). Conditions used for GC analysis were: initial temperature, 40°C for 4 minutes, increased to 240°C at a rate of 3,5 ml/min, held for 3 minutes. The operating MS conditions were: temperature interface 250°C, temperature ion source 200°C. The mass range varied from 30 to 250 amu, the solvent delay was 5 min and scan speed 0,4 scan/s. Compounds identification was based on comparison of their mass spectra of the NIST mass spectra library search.

DHS-GC/MS. For dynamic headspace (DHS) analysis a Teledyne Velocity XPT Purge and Trap sample concentrator (Tekmar-Dohrmann, Manson, Ohio, U.S.A.) was used. Helium was used as stripping gas. 3 ml of oil sample were placed in a 5 ml fritless glassware sampler and purged for 30 minutes applying 200 ml/min flow rate. Helium at 200 ml/min to desorb the volatiles compounds from the trap. During desorption, the trap was kept at 260°C for 10 minutes. The transfer line and the valve were maintained at 200°C to avoid condensation of molecules. The chromatographic analysis implemented a Shimadzu gas chromatograph - mass spectrometer (QP 2010 - Shimadzu, Milan, Italy). The gas-chromatographic column and conditions used were the same reported for SPME/HRGCMS method. The MS operating conditions were as follows: temperature interface 230°C, temperature ion source 200°C. The mass range varied from 40 to 400 amu, the solvent delay was 5 min and scan speed 0,5 scan/s. Quantification was carried out using Isobutyl Acetate as internal standard (Morales et al., 1994).

2.4. Statistical analysis

Statistical multidimensional evaluation of the data (Principal Component Analysis, PCA, Partial Least Square, PLS) was performed using the software XLSTAT 2007, version 7 (Addinsoft, Paris, France).

3. Results and discussion

The sensory profiles of extra virgin olive oils produced in geographical areas corresponding to some Protected Denomination of Origin (PDO) and of monovarietal VOOs obtained from traditional Italian olive varieties showed some typical sensory notes like 'green tomato' (or 'tomato leaves'), 'rosemary' (or 'oregano'), 'bitter almond', 'basil'. **Figure 1** shows, as example, the typical sensory profile of a PDO oil (Penisola Sorrentina) characterized by sensory attributes of 'rosemary' and 'oregano-spices'. The analysis carried out by DHS-GC/MS, allowed the identification and the semi-quantitative evaluation of a wide number of volatile compounds related to the fruity flavour which arise from the Lipoxigenase pathway and from the pathway of plant terpenoids. An example of the output of the GC/MS analysis of VOO headspace is reported in **Figure 1**.

The Principle Component Analysis (PCA) made on the sensory and volatiles dataset allowed to identify in some aldehydes, alcohols and esters arising from the lipoxigenase pathway, and in some terpenoid compounds, the key-molecules able to explain some perceived sensory attributes (**Figure 2**).

Taking into account the relative concentrations measured by GC/MS and the sensory thresholds reported for pure compounds (**Table 1**), the Odour Activity Values (OAVs) were evaluated and only molecules present at levels compatible with a sensory impact were considered for the multivariate statistical evaluation. The “rosemary” and “spices” sensory notes perceived in “Penisola Sorrentina” PDO oils can be attributed to some molecules such a beta-pinene, eucalyptol and D-limonene.

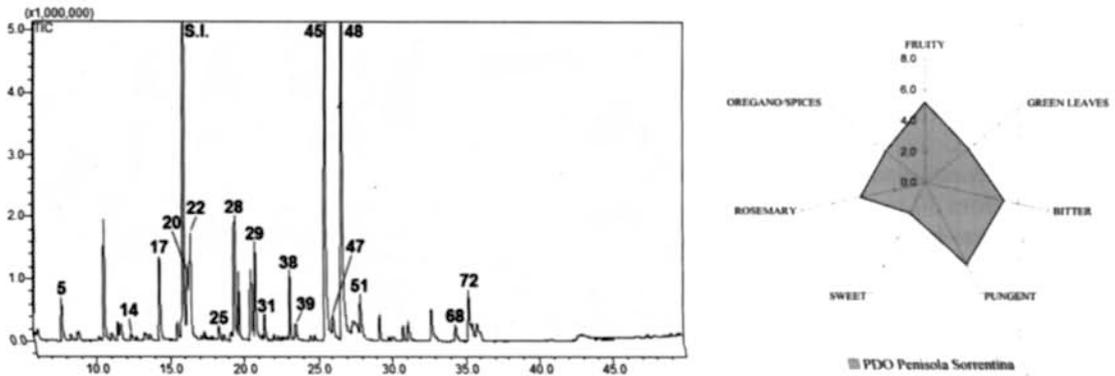


Figure 1: Sensory profile (medians for main sensory attributes) and Chromatogram of the Total ion current chromatogram (TIC) obtained by DHS-GCMS analysis of a VOO sample (PDO “Penisola Sorrentina”). Peak identification: 5.octane, 14.ethanol, 17.3-pentanone, 20.alfa-pinene, 22.1-penten-3-one, 25.camphene, 28.hexanal, 29.beta-Pinene, 31.beta-phellandrene, 38. 3-Pentenol, 39.beta-Myrcene, 45. D-limonene, 47.eucalyptol, 48.trans-2-hexenal, 51.cis-beta-ocimene, 68.cis-3-hexenol, 72.trans-2-hexenol.

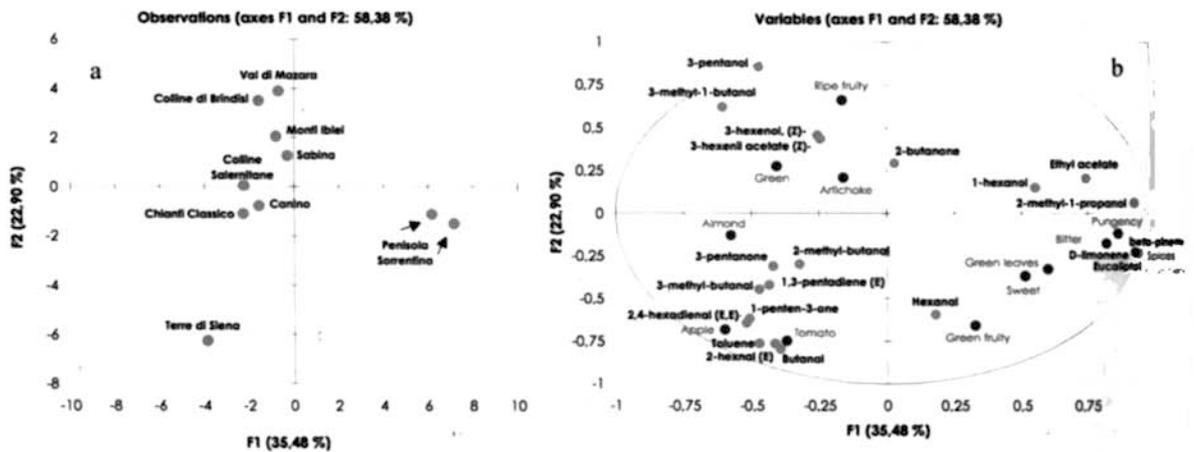


Figure 2: Score plot (a) and loading plot (b) from the PCA performed on DHS GC/MS and sensory data in PDO oils.

The multivariate statistical analysis (PLS) confirms the strong relation between the sensory perceptions and some molecular markers (**Figure 3**).

the Minucciola olive variety, are mainly discriminated by the presence of limonene, eucalyptol (Fig. 4d). Oils characterized by the sensory notes of 'tomato' (coming from the Biancolilla and Ravece olive variety) are characterized by the presence of high amounts of *cis*-3-hexenal (Fig. 4b e 4c).

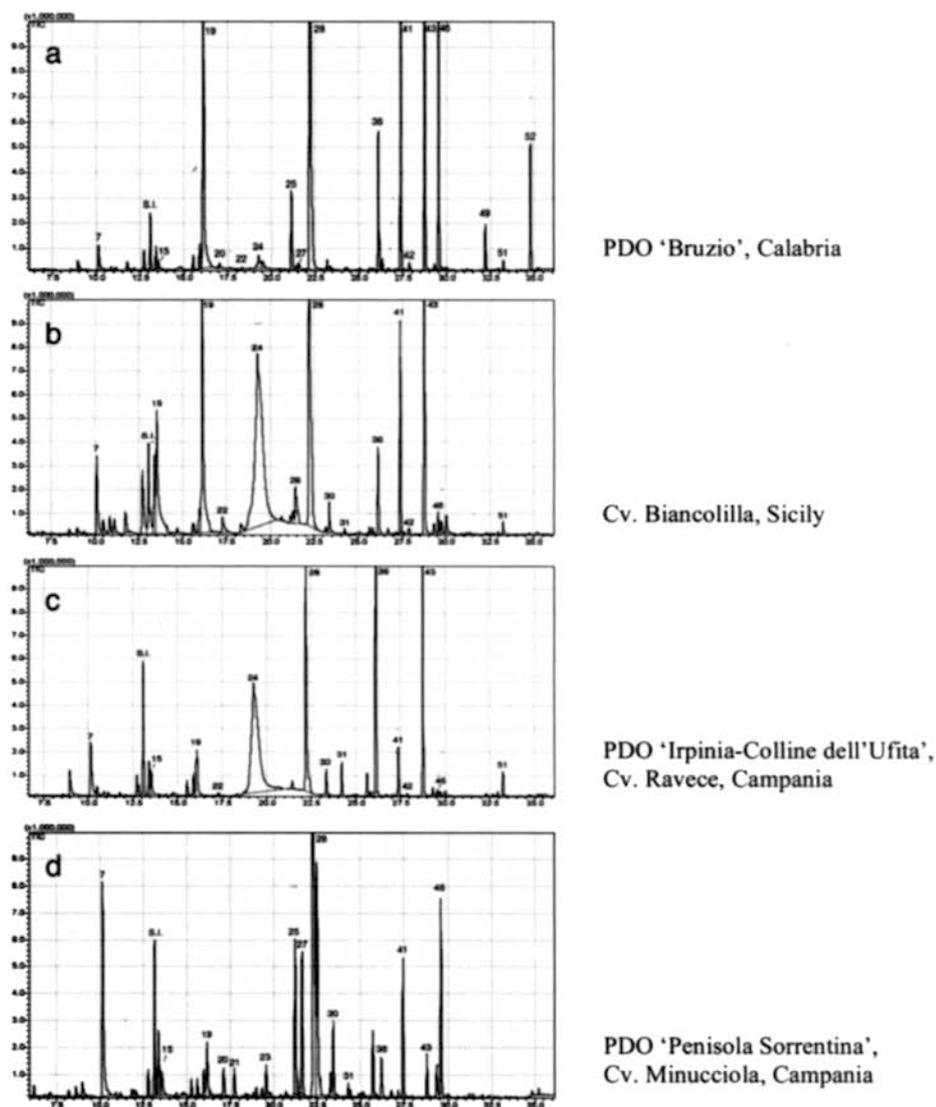


Figure 4: SPME GC/MS chromatograms of the headspace of some oils: a) PDO Bruzio, b) Biancolilla variety (Sicily), c) Ravece variety (PDO Irpinia-Colline dell'Ufita), d) Minucciola variety (PDO Penisola Sorrentina). Peak identification of the main volatile compounds: 7) ethanol, 15) 3-pentenone, 19) hexanal, 20) beta-pinene, 21) beta-phellandrene, 22) *trans*-2-pentenal, 23) beta-myrcene, 24) *cis*-3-hexenal, 25) D-limonene, 26) 3-methyl butanol, 27) Eucalyptol, 28) *trans*-2-hexenal, 30) beta-cimene, 31) *n*-hexyl acetate, 36) *cis*-3-hexenyl acetate, 41) hexanol, 42) *trans*-3-hexenol, 43) *cis*-3-hexenol, 46) *trans*-2-hexenol, 49) *n*-valeric acid *cis*-3-hexenyl ester, 51) copaene, 52) beta-linalool.

The PLS analysis can be an useful tool to understand the chemical basis of typical sensory notes found in different VOOs. In **Figure 5** the PLS performed on volatiles and sensory data of VOOs obtained from Ravece, Ortice, Rotondella, Coratina and Tonda varieties is showed. The tomato flavour appear related to Ravece and Ortice samples being Ravece oil more bitter and pungent.

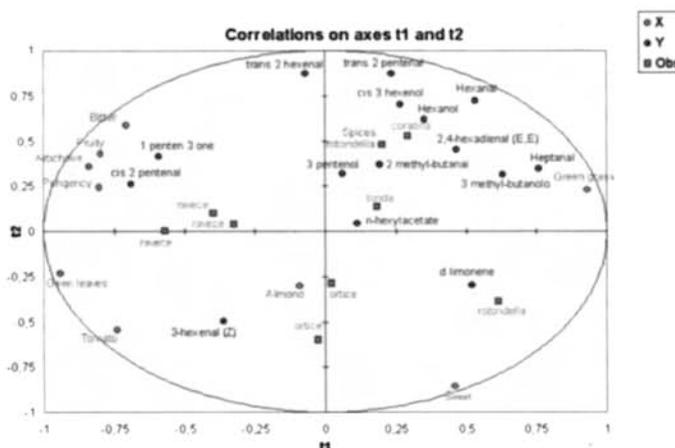


Figure 5: Partial Least Square (PLS) performed on volatiles and sensory data.

4. Conclusions

The analysis of sensory and instrumental data carried out by multivariate statistical technique could allow to find volatile molecules which could represent an useful element to describe typicality and protect Italian PDO extra virgin olive oils. The identification of the key-molecules linked to peculiar sensory attributes could also allow to exalt some characteristic oil aromas through the modulation of agronomic and technological practices to obtain a product with improved sensory quality.

A suggestive hypothesis comes from these preliminar data and observations. It is well known that plants respond to arthropods with an induced emission of volatiles such as green leaf volatiles and terpenoids (Mumm et al, 2008). These herbivore-induced plant volatiles can attract carnivores, for example, predators and parasitoids. The fact that some olive varieties are adapted to particular environments in which the climatic conditions are favourable to the development of olive fly (*Bactrocera Oleae*) and to its damage to olive fruits (i.e. "Minucciola" or "Oliva da Olio" in the PDO of Penisola Sorrentina, "Oleastro" in PDO Bruzio, and others) can be explained by the biosintesis and emission of volatiles specifically involved in the olive-insect communication mechanisms (Cheng et al., 2007).

The combination of eco-physiological and molecular studies, statistics and ecogenomics, sensory and metabolomics, should contribute to understand the indirect plant defence functions, the invisible interactions between variety and growing environment/conditions, probably at the basis of the sensory typicality of many vegetable foods.

Bibliography

- Angerosa F., Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054: 17-31.

- Aparicio, R., & Morales, M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1116-1122.
- Cheng A.X., Lou Y.G., Mao Y.B., Lu S., Wang L.J., Chen X.Y. (2007). Plant Terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 179-186.
- Guth, H., & Grosch, W. (1990). Deterioration of soya-bean oil: quantification of primary flavour compounds using a stable isotope dilution assay. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 23, 513-522.
- European Economic Community Regulation 2568/91. Off. J. Eur. Communities 1991, L 248, (1991).
- European Community Regulation 796/2002. Off. J. Eur. Communities 2002, L. 128/8 (2002).
- European Community Regulation 640/2008. Off. J. Eur. Communities 2002, L. 178/11 (2008).
- Escuderos M.E., Uceda M., Sánchez S., Jimenez A. (2007). *Instrumental technique evolution of olive oil sensory analysis. Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 109: 536-546.
- Luna G., Morales M.T., Aparicio R. (2006). Characterization of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98: 243-252.
- Morales, M.T., Aparicio, R., & Rios, J.J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J. Chromatog. A.*, 668(2), 455-462.
- Morales, M. T., & Aparicio, R. (1996). Influence of Olive Ripeness on the Concentration of Green Aroma Compounds in Virgin Olive Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 11, 171-178.
- Morales, M. T., Angerosa, F., & Aparicio, R. (1999). Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas y aceites.*, 50, 114-121.
- Morales M.T., Luna G., Aparicio R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chem.*, 91: 293-301.
- Mumm R., Posthumus M.A., Dicke M. (2008). Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant, Cell and Environment*, 31: 575-585.
- Reiners, J., & Grosch, W. (1998). Odorants of virgin olive oils with different flavor profiles. *J. Agri. Food Chem.*, 46, 2754-2763.
- Ruth, J.H. (1986). Odor Thresholds and Irritation Levels of Several Chemical Substances: A Review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 47, 142-153.
- Sakouhi F., Absalon C., Sebei K., Fouquet E., Boukhchina S., Kallel H. (2009). Gas chromatographic-mass spectrometric characterization of triterpene alcohols and monomethylsterols in developing *Olea europea* L. fruits. *Food Chem.*, 116: 345-350.
- Vichi, S., Castellote, A., I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003) Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase MicroExtraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 19-33.
- Vichi S., Romero A., Tous J., Lopez-Tamames E., Buxaderas S. (2008). Determination of volatile phenols in virgin olive oils and their sensory significance. *Journal of Chromatography*, 1211: 1-7.



University of Naples - Federico II

Faculty of Agriculture



PROCEEDINGS

15th WORKSHOP on the Development in the Italian PhD
Research on Food Science Technology and Biotechnology



September 15-17, 2010
Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Napoli - Federico II
Portici (NA)



2nd Year PhD Student Poster Communications

Volatile markers of Extra Virgin Olive Oil quality and typicality

Dorotea Anna Della Medaglia (dellamed@unina.it)
Department of Food Science, University of Naples Federico II, Naples, Italy
Tutor: Prof. Raffaele Sacchi

In accordance with the PhD thesis project, this poster reports the main results of the HS-SPME-GC/MS analysis of aroma compounds in EVOOs and the first results by PLS data processing by sensory and instrumental analysis. The analysis of sensory and GC/MS data could allow to find some possible molecular markers to identify and protect the typicality of Protected Denomination of Origin (PDO) extra virgin olive oils. Some typical aromas in VOO from traditional varieties could be enhanced through the modulation of agronomic and technological practises, to obtain PDO olive oils with improved and controlled sensory quality.

Composti volatili marcatori della qualità e tipicità dell'olio extra vergine di oliva

In conformità con il progetto di tesi di dottorato, questo poster riporta i risultati principali dell'analisi HS-SPME-GC/MS dei composti responsabili dell'aroma dell'olio extra vergine di oliva ed i primi risultati ottenuti dall'analisi PLS dei dati sensoriali e strumentali. L'analisi sensoriale ed i dati GC/MS potrebbero consentire di identificare possibili markers molecolari per individuare e proteggere la tipicità degli oli extra vergini di oliva a denominazione di origine (DOP). Alcuni aromi tipici di varietà autoctone potrebbero essere enfatizzati attraverso la modulazione delle pratiche agronomiche e tecnologiche, per ottenere oli extra vergini di oliva DOP con una migliore e controllata qualità sensoriale.

Keywords : extra virgin olive oil (VOO), PDO, sensory quality, volatile compounds, SPME-GC/MS.

1. Introduction

Virgin Olive Oil (VOO) is a 'lipid fruit juice' obtained from fresh olive fruits, by means of purely mechanical and physical processes. VOO is unique among edible vegetable oils because of its antioxidant properties, its delicious taste and aroma and its key-role in Mediterranean food habits. The aroma of VOO is attributed to aldehydes, alcohols, esters, hydrocarbons, ketones, furans, terpenes, phenols and other as yet unidentified volatile compounds. The major volatile compounds reported in virgin olive oils are the C6 and C5 compounds, deriving from the lipoxygenase pathway and correlated with positive flavour (Angerosa *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2006). In accordance with the PhD thesis project, this poster reports the main results of the HS-SPME-GC/MS analysis of aroma compounds in VOOs and the first results obtained by PLS processing of sensory and instrumental analysis data.

2. Materials and Methods

Protected Denomination of Origin (PDO) oils and oils from traditional Italian olive varieties were collected at the Department of Food Science (Portici, Naples) during the 2008/09 and 2009/10 seasons. Sensory evaluation was carried out by a trained panel according to the EC method (EEC Reg. 2568/91 and its updates). The volatile compounds were evaluated by HS-SPME-GC/MS analysis. Statistical multidimensional evaluation of the data (Partial Least Square, PLS) was performed using the software XLSTAT 2007 (Addinsoft, Paris, France).

HS-SPME-GC/MS analysis of oil. The volatile compounds were extracted and concentrated by SPME with a 50/30 mm DVB-CAR-PDMS fibre (Supelco, Bellefonte, USA) and analyzed by a GC/MS system (Vichi *et al.*, 2003). The desorbed compounds were separated on a Shimadzu gas chromatograph (QP5050A) with mass spectrometer detector (E.I. 70eV) (Shimadzu, Milan, Italy) equipped with a Supelcowax TM 10 (Supelco, Bellefonte, USA). Compounds identification was based on comparison of their mass spectra of the NIST mass spectra library search. Quantification was carried out using Isobutyl Acetate as internal standard.

3. Results and discussion

The sensory profiles of extra virgin olive oils produced in geographical areas corresponding to some Protected Denomination of Origin (PDO) and of monovarietal VOOs obtained from traditional Italian olive varieties showed some typical sensory notes like 'tomato', 'spices' ('rosemary', 'oregano', etc), 'bitter almond', 'artichoke' (data not shown). In Figure 1 some examples of SPME GC/MS chromatograms are reported. Clear differences can be observed among GC/MS profiles for many aldehydes, alcohols and terpenoids. A typical VOO from the PDO 'Bruzio' showed an abundance of C6 alcohols (hexanol and *trans*-2-hexenol) and the relevant presence of beta-linalool (Fig. 1a). The PDO 'Penisola Sorrentina' VOOs, obtained from the Minucciola

Acta Italus Hortus

I Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio

Portici (NA), 1-2 ottobre 2009
Facoltà di Agraria, Reggia di Portici

A cura di
Claudio Di Vaio



Publicata dalla Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana (SOI)

ACTA - ITALUS HORTUS

Pubblicazione della Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI)

Politica editoriale. *Acta - Italus Hortus* è una collana dedicata agli Atti di Convegni organizzati o patrocinati dalla Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI). La pubblicazione degli articoli è sotto la responsabilità dell'Organizzatore del convegno e/o del curatore del volume. I contributi sono di orma in italiano, con un ampio abstract e didascalie di tabelle e figure in lingua inglese. I lavori pubblicati sono soggetti a revisione da parte del Comitato Scientifico ed Editoriale del Convegno prima della loro accettazione definitiva per la stampa.

Aims and Scope *Acta - Italus Hortus* publishes Proceedings of Conferences organized under the aegis of Italian Society for Horticultural Sciences (SOI). Articles are reviewed by the Scientific Committee of the Conference before final acceptance. The publication of articles is under the responsibility of the Convenor and / or of the Editor of the Conference Proceedings. All contributions appear in Italian with an extended summary, captions and legends in English.

Sintesi della procedura per la pubblicazione di Atti di convegno su *Acta - Italus Hortus*

La richiesta di pubblicazione Atti di convegno su *Acta - Italus Hortus* va inviata al Direttore Responsabile e al Direttore Scientifico e deve includere l'elenco dei componenti del Comitato Scientifico ed editoriale del Convegno e l'indicazione del Curatore degli Atti. La richiesta viene esaminata dal Comitato Scientifico-Editoriale di *Italus Hortus*, ed accettata sulla base delle informazioni fornite dal Comitato Organizzatore del Convegno e dell'interesse per i soci SOI per la tematica proposta.

Il Comitato Organizzatore del Convegno si impegna a coprire il costo della stampa del numero di *Acta - Italus Hortus* e a fornire alla Segreteria Editoriale i testi e le figure in formato elettronico, redatti secondo le norme editoriali riportate in terza di copertina e sul sito web della SOI (www.soihs.it). Al Curatore degli Atti saranno inviate le bozze tipografiche per la correzione.

Direttore Responsabile / Managing Editor: Elvio Bellini, *Università di Firenze*

Direttore Scientifico / Editor: Massimo Tagliavini, *Libera Università di Bolzano*

Segreteria Editoriale / Secretary: Francesco Baroncini, *Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana*

Editore: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI), Firenze

Direzione e Redazione: Viale delle Idee, 30 - 50019 Sesto Fiorentino (FI); tel. 055.4574067; fax 055.4574071;

e-mail: soifi@unifi.it; sito web: <http://www.soihs.it>

Stampa: F&P Parretti Grafiche

Pubblicazione registrata presso il tribunale di Firenze al n. 4609 del 1 agosto 1996

ISSN: 1127-3496

ISBN: 978-88-905628-0-8

© 2011 by SOI - Firenze

Finito di stampare nel mese di Gennaio 2011

Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione

Paduano A.¹, Ambrosino M.L.², Della Medaglia D.A.¹, Monteleone E.³ e Sacchi R.¹

¹ Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II

² ASA Analisti Sensoriali Associati, Napoli

³ Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze

Destoning effect on virgin olive oils quality related to variety and ripening

Abstract. The practice of destoning is a phase with high potential impact on the quality of the finished product. This experimental work had the objective to study the effect of destoning on quality of virgin olive oil, using lots of different varieties of olives at different ripening. The extra virgin olive oil produced with the destoning showed, compared to traditional oil mill, a lower primary oxidation and an increase of phenolic compounds and volatile strongly related to varietal factor. These results confirmed the data obtained from the panel test, because in the sensory profiles of the destoned samples were observed, more evident, some notes of the flavor. Improving the quality of extra virgin olive oil produced with the destoning appeared, however, influenced by the ripeness of the olives. If the latter is advanced, oils showed no significant differences in composition and sensory evaluation.

Key words: virgin olive oil, destoning, ripening, quality.

Introduzione

Negli ultimi anni, il mercato dell'olio extra vergine di oliva richiede sempre più prodotti di elevata qualità, in cui siano esaltate le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche. L'olio extra vergine di oliva è ormai riconosciuto sia come prodotto salutare contenente apprezzabili quantità di componenti minori aventi un importante ruolo biologico sia per le sue proprietà edonistiche che lo rendono unico tra gli oli alimentari. La tendenza a migliorare il livello qualitativo per soddisfare consumatori sempre più esigenti ha riportato, da qualche anno, alla pratica di estrarre olio da paste d'oliva denocciolate per ottenere "olio di sola polpa" (AA.VV., 2002; Frega, 1997).

Le caratteristiche peculiari di un olio d'oliva vergine vengono condizionate da diversi fattori: la varietà e il grado di maturazione delle olive, le condizioni pedoclimatiche, le tecniche agronomiche e le modalità

di raccolta. Inoltre, a parità di materia prima, durante il processo di lavorazione le olive subiscono modificazioni di tipo enzimatico ed ossidativo nonché la ripartizione dei composti aromatici e antiossidanti tra la fase oleosa e l'acqua di vegetazione, che condizionano quelle che sono le proprietà del prodotto finito.

La pratica della denocciolazione, che si inserisce nel processo produttivo nel momento della frangitura delle olive, è, indubbiamente, una fase a forte impatto sulla potenziale qualità del prodotto finito (Frega *et al.*, 1999; Angerosa *et al.*, 1999; Mattei *et al.*, 2001).

Il panorama degli studi effettuati sulla qualità degli oli da olive denocciolate risulta abbastanza eterogeneo e mancano studi sperimentali effettuati sul presupposto di una probabile correlazione tra stadio di maturazione delle drupe e incidenza della denocciolazione sulla qualità dell'olio prodotto.

Il presente lavoro sperimentale ha avuto l'obiettivo di studiare l'effetto della denocciolazione delle olive e della tradizionale frangitura, sulla qualità dell'olio di oliva extravergine, impiegando partite di olive di diversa varietà e grado di maturazione.

Materiali e metodi

I campioni di olio sono stati ottenuti da olive monovarietalì (*Coratina*, *Ogliarola del Bradano*, *Maiatica*, *Rotondella*) in due diverse epoche di raccolta (I e III decade di novembre).

Le olive sono state trasformate, nelle stesse condizioni operative, in impianti industriali continui costituiti da due linee parallele, una con denocciolatore e l'altra con frangitore tradizionale.

Sui campioni di olio sono stati determinati i parametri di qualità ed il panel test secondo i metodi ufficiali di analisi (Reg. CEE 2568/91), la frazione fenolica mediante analisi HPLC-DAD (Sacchi *et al.*, 2002) e l'analisi delle principali sostanze volatili mediante DHS-GC (Morales *et al.*, 1994).

L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza (ANOVA), con l'utilizzo del software Excel STAT Addinsoft version 6.1.

Risultati e discussione

Dall'analisi dei dati, gli indici analitici (Acidità, Numero di Perossidi, Indici Spettrofotometrici) non sempre sono risultati discriminanti al fine di differenziare il campione tradizionale e quello ottenuto da olive denocciolate. Tuttavia, negli oli da olive denocciolate, allo stadio di maturazione più precoce, il Numero di Perossidi è risultato sempre lievemente ma significativamente ($p < 0,05$) minore rispetto a quelli tradizionali, indipendentemente dalla varietà delle olive.

I profili sensoriali degli oli, in tutte le varietà studiate, sono risultati caratterizzati, al primo prelievo, da un fruttato medio-alto e dalla chiara percezione degli attributi di amaro e piccante accompagnata da note di erba/foglia, mela, carciofo e pomodoro. Si è potuto constatare che quasi sempre l'intensità di tali attributi risulti più spiccata nei campioni denocciolati, se confrontati con i corrispondenti campioni tradizionali. I profili sensoriali degli oli prodotti dalla varietà *Maiatica* non sembrano, invece, risentire dell'effetto della denocciolazione. Alla seconda epoca di raccolta, con l'avanzare della maturazione, anche per le altre varietà, i profili non sono apparsi differenziati in funzione del trattamento tecnologico.

In figura 1 sono riportati i profili sensoriali relativi alla varietà *Coratina* sottoposta a sperimentazione. Si può osservare come le differenze nel profilo sensoriale riconducibili alla denocciolazione sono evidenti nei campioni ottenuti alla prima epoca di raccolta (a).

La componente biofenolica degli oli ha evidenziato una dotazione in composti fenolici, sia semplici che complessi, diversificata in funzione delle varietà considerate: in particolare, i campioni prodotti da *Ogliarola*, *Coratina* e *Rotondella* sono caratterizzati da un maggiore contenuto in composti fenolici rispetto a quelli ottenuti dalla varietà *Maiatica*. Per quest'ultima varietà non sono state riscontrate differenze significative ($p > 0,05$) attribuibili al trattamento tecnologico di denocciolazione, né allo stadio di maturazione.

In generale, i campioni denocciolati hanno mostrato un maggiore contenuto di composti biofenolici, soprattutto complessi (OHTy-EDA, Ty-EDA, OHTy-EA, Ty-EA) nei confronti dei corrispettivi campioni tradizionali ($p < 0,05$). Allo stadio di maturazione più avanzato, si osserva negli oli da olive denocciolate un complessivo decremento dei fenoli totali, senza mostrare più significative differenze ($p > 0,05$) in funzione della tecnologia di processo, risultando simili ai campioni tradizionali.

I campioni di *Ogliarola* e di *Coratina* ottenuti con il frangitore tradizionale alla seconda epoca di raccolta sono, inoltre, risultati più ricchi in composti fenolici rispetto ai corrispondenti campioni alla prima epoca (fig. 2). Tutto questo indicherebbe che, per tali varietà, l'operazione di denocciolazione delle olive produrrebbe un reale arricchimento degli oli in composti fenolici, solo allo stadio più anticipato di maturazione delle olive.

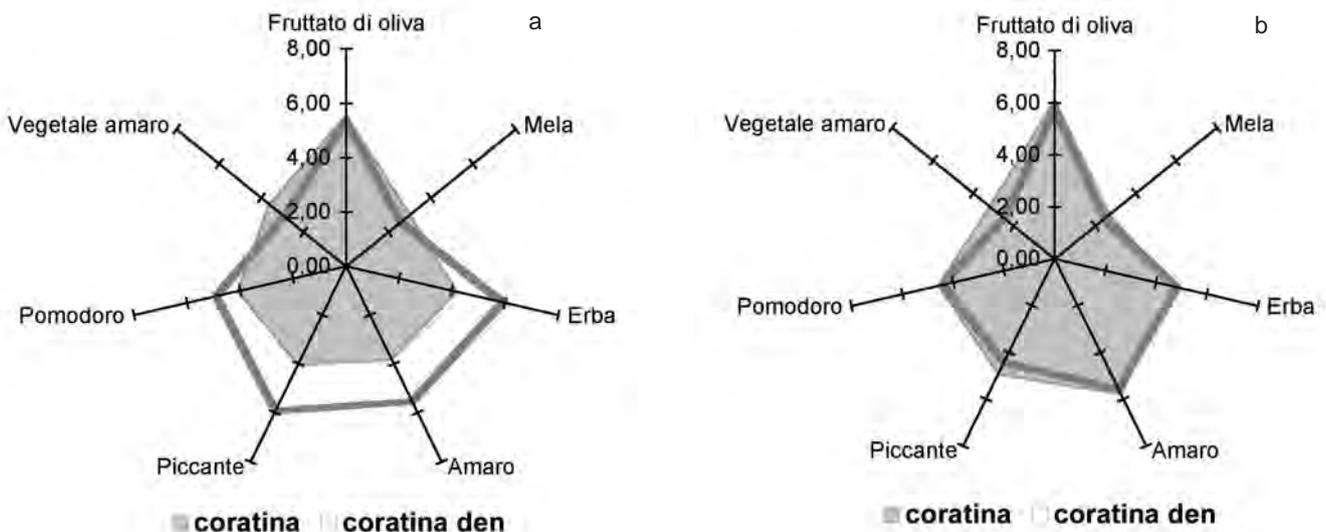


Fig. 1 - Profili sensoriali degli oli prodotti dalla varietà Coratina alla I (a) ed alla III (b) decade di novembre.
Fig. 1 - Sensory profiles of Coratina variety oils obtained to I (a) and III (b) decade of November.

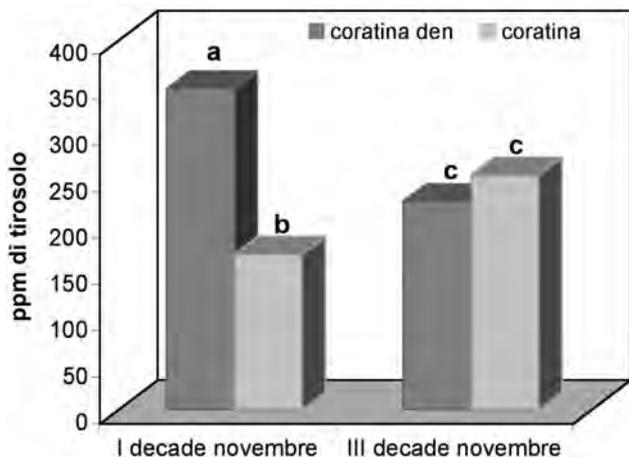


Fig. 2 - Fenoli totali degli oli prodotti dalla varietà Coratina alla I ed alla III decade di novembre.
 Fig. 2 - Total phenols Coratina variety oil obtained to I and III decade of November.

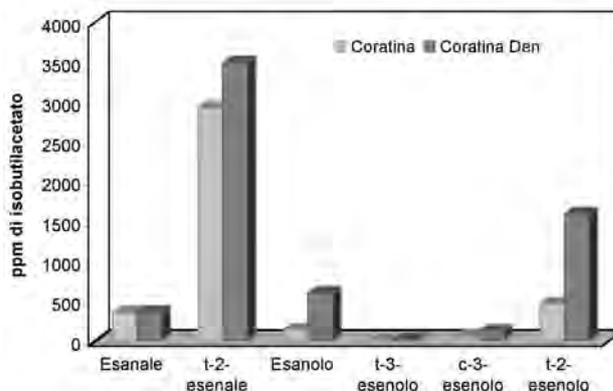


Fig. 3 - Principali composti volatili C6 rilevati negli oli prodotti dalla varietà Coratina alla I decade di novembre.
 Fig. 3 - Major C6 volatile compounds found in Coratina variety oil obtained to I decade of November.

L'analisi DHS-GC dei composti volatili degli oli ha evidenziato oltre 50 differenti composti. Sono stati presi in considerazione i principali composti volatili C6 derivanti dalla via della lipossigenasi, responsabili dei sentori di foglie, frutti e vegetali non completamente maturi e, con diverse sfumature, dell'erba appena tagliata (note verdi e fruttate) (Angerosa *et al.*, 1999).

È stato possibile osservare delle differenze, soprattutto al primo prelievo, tra i campioni sottoposti al processo di denocciolazione e quelli ottenuti in maniera tradizionale. In particolare, tra i composti C6, gli alcoli sono risultati maggiori negli oli denocciolati contribuendo alla loro complessità aromatica. Ciò si

evincesse dalla figura 3 dove sono riportati i principali composti volatili C6 rilevati negli oli prodotti dalla varietà *Coratina* alla I decade di novembre.

In figura 4 si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultanti dalla PCA effettuata per gli attributi sensoriali, la composizione fenolica ed i principali composti volatili C6 identificati nei campioni di olio ottenuti mediante le due diverse tecnologie (denocciolazione e frangitura tradizionale). Lo *score plot* mette in evidenza nette differenze per le coppie di campioni di *Coratina* e *Ogliarola* ottenuti da olive alla prima epoca di raccolta: i campioni di olio da paste denocciolate (1 cor de e 1 ogl de), risultano correlati sia ai composti fenolici che alla maggior parte dei composti

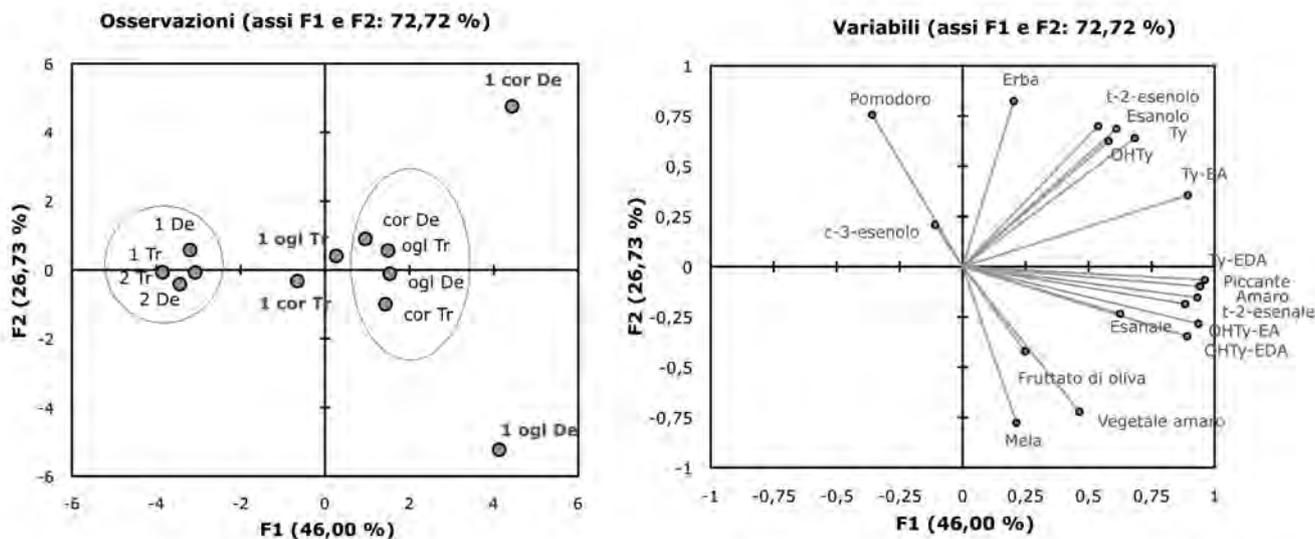


Fig. 4 - Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 73%) effettuata per gli attributi sensoriali, la composizione fenolica ed i principali composti volatili C6 rilevati mediante DHS-GC.
 Fig. 4 - Loading plot (a) and score plot (b) resulting from PCA (total variance explained: 73%) carried out for the sensory attributes, the phenolic composition and major C6 volatile compounds identified by DHS-GC.

volatili considerati oltre che agli attributi sensoriali riconducibili alle note verdi. Nella successiva epoca di raccolta, i campioni denocciolati e non denocciolati, non presentano differenze significative, ed appaiono raggruppati in funzione dell'epoca di raccolta. Gli oli appartenenti alla varietà *Maiatica*, invece, non presentano significative differenze sia alla prima epoca di raccolta che alla seconda.

Conclusioni

L'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione mostra, rispetto alla frangitura tradizionale, un minore stato di ossidazione primaria e un incremento di composti fenolici e volatili fortemente legato al fattore varietale. L'impatto maggiore è stato riscontrato sul profilo sensoriale, in quanto gli oli denocciolati sono apparsi differenziati soprattutto sulla base dell'intensità di percezione del fruttato di oliva, dell'amaro, del piccante e delle note olfattive caratteristiche, risultate più evidenti rispetto ai campioni tradizionali. Inoltre, è possibile affermare che il miglioramento della qualità dell'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione delle paste appare fortemente legato allo stadio di maturazione all'atto della raccolta e trasformazione. Se quest'ultimo risulta avanzato (oltre invaiatura) gli oli non hanno mostrato significative differenze compositive e sensoriali. È coerente presupporre che i cambiamenti chimico-compositivi e strutturali cui il frutto è sottoposto con l'avanzamento dell'invaiatura, possano riflettersi nell'olio prodotto, e non differenziare il profilo qualitativo di un olio tradizionale da uno denocciolato.

Riassunto

La pratica della denocciolazione delle olive è una fase a forte impatto sulla potenziale qualità dell'olio prodotto. Il presente lavoro sperimentale ha avuto l'obiettivo di studiare l'effetto della denocciolazione sulla qualità dell'olio di oliva vergine, impiegando partite di olive di diversa varietà e diverso grado di

maturazione. L'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione ha mostrato, rispetto alla frangitura tradizionale, un minore stato di ossidazione primaria e un incremento di composti fenolici e volatili fortemente legato al fattore varietale. Tali risultati hanno confermato i dati ottenuti mediante panel test, in quanto nei profili sensoriali dei campioni denocciolati si sono osservate, più evidenti, alcune note responsabili del *flavour*. Il miglioramento della qualità dell'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione è apparso, però, influenzato dallo stadio di maturazione delle olive. Se quest'ultimo risulta avanzato, gli oli non hanno mostrato significative differenze compositive e sensoriali.

Parole chiave: olio extravergine di oliva, denocciolazione, maturazione, qualità.

Bibliografia

- AA.VV. 2002. *Innovazione tecnologica per l'estrazione di olio extravergine da paste di olive snocciolate*. I Georgofili Quaderni 2001-IV. Società Editrice Fiorentina, Firenze.
- ANGEROSA F., BASTI C., VITO R., 1999. *Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars*. J. Agric. Food Chem., 47: 836-839.
- FREGA N., CAGLIOTI L., MOZZON M. 1997. *Composizione chimica e parametri di qualità degli oli estratti da paste snocciolate*. Riv. It.Sost.Grassa, 74: 241-245.
- FREGA N., CAGLIOTI L., MOZZON M., 1999. *Oli estratti da olive denocciolate: composizione chimica e parametri di qualità*. Olivo & olio, 1/2: 40-44.
- MATTEI A., MAROTTA F., GIACCHERINI C., MULINACCI N., ROMANI A., INNOCENTI M., VINCERI F., BACCIONI L., FAZIO D., 2001. *Caratteristiche degli extravergini da olive snocciolate*. Olivo & Olio, 1/2: 44-47.
- MORALES M.T., APARICIO R., RIOS J.J., 1994. *Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil*. J. Chromatog. A. 668: 455-462.
- REGOLAMENTO CEE n. 2568/91 del 11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. Gazz. Uff. Com. Europ. 5/9/91 NL 248/1.
- SACCHI R., PADUANO A., FIORE F., DELLA MEDAGLIA D., AMBROSINO M.L., MEDINA I., 2002 *Partition Behavior of virgin olive oil phenolic compounds in Oil-Brine mixtures during thermal processing for fish canning*. J. Agric. Food Chem., 50: 2830-2835.

Abstracts Book

I° Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio

Portici
1-2 Ottobre 2009

*Facoltà di Agraria
Reggia di Portici
Sala Cinese*



Poster-48

Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione.

Paduano A., Ambrosino M.L., Della Medaglia D. A., Monteleone E., Sacchi R.

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Facoltà di Agraria, 80055 Portici (Napoli)

Riassunto

Negli ultimi anni, il mercato dell'olio extra vergine di oliva richiede sempre più prodotti di elevata qualità, in cui siano esaltate le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche. La tendenza a migliorare il livello qualitativo per soddisfare consumatori sempre più esigenti ha riportato, da qualche anno, alla pratica di estrarre olio da paste d'oliva denocciolate per ottenere "olio di sola polpa". La pratica della denocciolazione, che si inserisce nel processo produttivo nel momento della frangitura delle olive, è, indubbiamente, una fase a forte impatto sulla potenziale qualità del prodotto finito. Il panorama degli studi effettuati negli ultimi anni sulla qualità degli oli da olive denocciolate risulta abbastanza eterogeneo e mancano studi sperimentali effettuati sul presupposto di una probabile correlazione tra stadio di maturazione delle drupe e incidenza della denocciolazione sulla qualità dell'olio prodotto. Il presente lavoro sperimentale ha avuto l'obiettivo di studiare l'effetto della denocciolazione delle olive e della tradizionale frangitura, sulla qualità dell'olio di oliva extra vergine, impiegando partite di olive di diversa varietà e grado di maturazione. I campioni di olio sono stati ottenuti da olive monovarietali in due diverse epoche di raccolta. Le olive così ottenute sono state trasformate su due linee parallele, una mediante denocciolatore e l'altra mediante frangitore tradizionale, nelle stesse condizioni operative. Su i campioni di olio sono stati determinati i parametri di qualità ed il panel test secondo i metodi ufficiali di analisi (Reg. CE 2568/91), la frazione fenolica mediante analisi HPLC - DAD e l'analisi delle principali sostanze volatili mediante SPME-GC/MS e DHS-GC. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante analisi delle componenti principali (PCA). Negli oli denocciolati, soprattutto allo stadio di maturazione più precoce, il Numero di Perossidi risulta sempre minore rispetto a quelli tradizionali, indipendentemente dalla varietà delle olive. Così come i composti fenolici, nell'ambito della stessa varietà a primi stadi di maturazione, risultano maggiormente presenti negli oli denocciolati rispetto ai corrispettivi campioni tradizionali. Mentre, nello stadio di maturazione più avanzato, i composti fenolici subiscono un complessivo decremento, che causa un appiattimento delle differenze con i campioni tradizionali. È coerente presupporre che i cambiamenti chimico-compositivi e strutturali cui il frutto è sottoposto con l'avanzamento dell'invecchiamento, possano riflettersi nell'olio prodotto, e non differenziare il profilo qualitativo di un olio tradizionale da uno denocciolato. Dall'analisi della frazione volatile è stato possibile osservare, relativamente ad alcuni composti volatili, evidenti differenze quantitative dovute sia al differente indice di maturazione che alla diversa tecnologia utilizzata. Tali risultati hanno confermato i dati ottenuti mediante panel test, in quanto nei profili sensoriali dei campioni denocciolati si sono osservate, più evidenti, alcune note responsabili del *flavour* nei campioni di olio ottenuti a stadi di maturazione più precoci.

Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione

Paduano A.¹, Ambrosino M.L.², Della Medaglia D. A.¹, Monteleone E.³, Sacchi R.¹

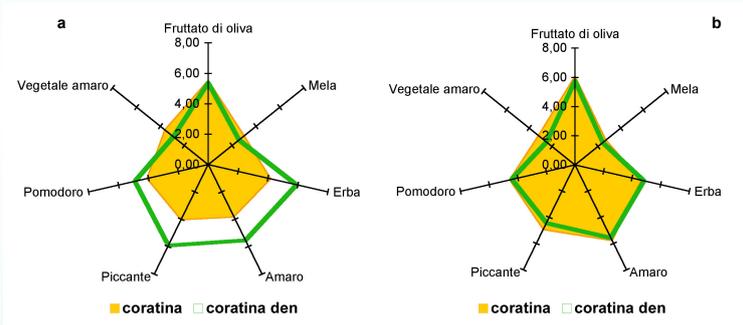
¹ Dip. di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Facoltà di Agraria, 80055 Portici (NA), sacchi@unina.it; ² ASA, Napoli; ³ Dip. di Biotecnologie Agrarie, Università degli Studi di Firenze, 50144 Firenze.

Negli ultimi anni, il mercato dell'olio extra vergine di oliva richiede sempre più prodotti di elevata qualità, in cui siano esaltate le caratteristiche nutrizionali ed organolettiche. L'olio extra vergine di oliva è ormai riconosciuto sia come prodotto salutare contenente apprezzabili quantità di componenti minori aventi un importante ruolo biologico sia per le sue proprietà edonistiche che lo rendono unico tra gli oli alimentari. La tendenza a migliorare il livello qualitativo per soddisfare consumatori sempre più esigenti ha riportato, da qualche anno, alla pratica di estrarre olio da paste d'oliva denocciolate per ottenere "olio di sola polpa" (1, 2). Le caratteristiche peculiari di un olio d'oliva vergine vengono condizionate da diversi fattori: la varietà e il grado di maturazione delle olive, le condizioni pedoclimatiche, le tecniche agronomiche e le modalità di raccolta. Inoltre, a parità di materia prima, durante il processo di lavorazione le olive subiscono modificazioni di tipo enzimatico ed ossidativo nonché la ripartizione dei composti aromatici e antiossidanti tra la fase oleosa e l'acqua di vegetazione, che condizionano quelle che sono le proprietà del prodotto finito. La pratica della denocciolazione, che si inserisce nel processo produttivo nel momento della frangitura delle olive, è, indubbiamente, una fase a forte impatto sulla potenziale qualità del prodotto finito (3, 4, 5). Il panorama degli studi effettuati sulla qualità degli oli da olive denocciolate risulta abbastanza eterogeneo e mancano studi sperimentali effettuati sul presupposto di una probabile correlazione tra stadio di maturazione delle drupe e incidenza della denocciolazione sulla qualità dell'olio prodotto. Il presente lavoro sperimentale ha avuto l'obiettivo di studiare l'effetto della denocciolazione delle olive e della tradizionale frangitura, sulla qualità dell'olio di oliva extravergine, impiegando partite di olive di diversa varietà e grado di maturazione. I campioni di olio sono stati ottenuti da olive monovarietali (*Coratina*, *Ogliarola del Bradano*, *Maiatica*, *Rotondella*) in due diverse epoche di raccolta (I e III decade di novembre).

Le olive sono state trasformate in impianti industriali costituiti da due linee parallele, una con denocciolatore e l'altra con frangitore tradizionale, nelle stesse condizioni operative. Sui campioni di olio sono stati determinati i parametri di qualità ed il panel test secondo i metodi ufficiali di analisi (6), la frazione fenolica mediante analisi HPLC-DAD e l'analisi delle principali sostanze volatili mediante DHS-GC. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata mediante analisi delle componenti principali (PCA) e l'analisi della varianza (ANOVA), con l'utilizzo del software Excel STAT Addinsoft version 6.1.

Dall'analisi dei dati, gli indici analitici (Acidità, Numero di Perossidi, Indici Spettrofotometrici) non sempre sono risultati discriminanti al fine di differenziare il campione tradizionale e quello ottenuto da olive denocciolate. Tuttavia, negli oli da olive denocciolate, allo stadio di maturazione più precoce, il Numero di Perossidi è risultato sempre lievemente ma significativamente ($p < 0,05$) minore rispetto a quelli tradizionali, indipendentemente dalla varietà delle olive.

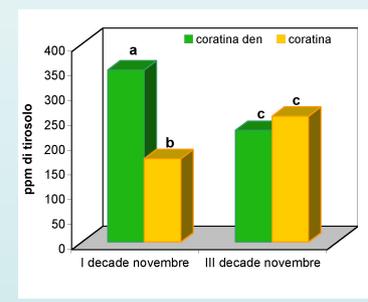
I profili sensoriali degli oli, in tutte le varietà studiate, sono risultati caratterizzati, al primo prelievo, da un fruttato medio-alto e dalla chiara percezione degli attributi di amaro e piccante accompagnata da note di erba/foglia, melà, carciofo e pomodoro. Si è potuto constatare che quasi sempre l'intensità di tali attributi risulti più spiccata nei campioni denocciolati, se confrontati con i corrispondenti campioni tradizionali. I profili sensoriali degli oli prodotti dalla varietà *Maiatica* non sembrano, invece, risentire dell'effetto della denocciolazione. Alla seconda epoca di raccolta, con l'avanzare della maturazione, anche per le altre varietà, i profili non sono apparsi differenziati in funzione del trattamento tecnologico.



Profili sensoriali degli oli prodotti dalla varietà *Coratina* alla I (a) ed alla III (b) decade di novembre

La componente biofenolica degli oli ha evidenziato una dotazione in composti fenolici, sia semplici che complessi, diversificata in funzione delle varietà considerate: in particolare, i campioni prodotti da *Ogliarola*, *Coratina* e *Rotondella* sono caratterizzati da un maggiore contenuto in composti fenolici rispetto a quelli ottenuti dalla varietà *Maiatica*. Per quest'ultima varietà non sono state riscontrate differenze significative ($p > 0,05$) attribuibili al trattamento tecnologico di denocciolazione, né allo stadio di maturazione.

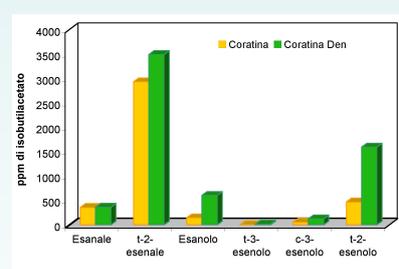
In generale, i campioni denocciolati hanno mostrato un maggiore contenuto di composti biofenolici, soprattutto complessi (OHTy-EDA, Ty-EDA, OHTy-EA, Ty-EA) nei confronti dei corrispettivi campioni tradizionali ($p < 0,05$). Allo stadio di maturazione più avanzato, si osserva negli oli da olive denocciolate un complessivo decremento dei fenoli totali, senza mostrare più significative differenze ($p > 0,05$) in funzione della tecnologia di processo, risultando simili ai campioni tradizionali.



I campioni di *Ogliarola* e di *Coratina* ottenuti con il frangitore tradizionale alla seconda epoca di raccolta sono, inoltre, risultati più ricchi in composti fenolici rispetto ai corrispondenti campioni alla prima epoca. Tutto questo indicherebbe che, per tali varietà, l'operazione di denocciolazione delle olive produrrebbe un reale arricchimento degli oli in composti fenolici, solo allo stadio più anticipato di maturazione delle olive.

Fenoli totali degli oli prodotti dalla varietà *Coratina* alla I ed alla III decade di novembre.

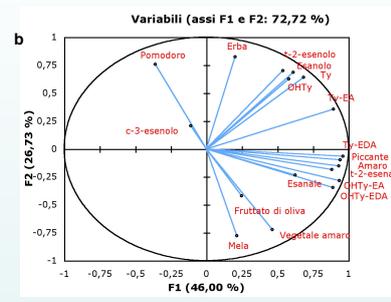
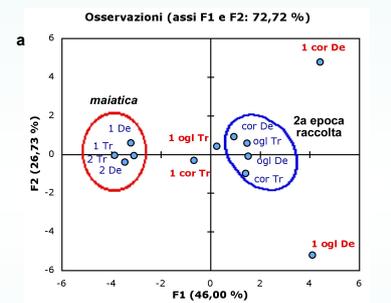
L'analisi DHS-GC dei composti volatili degli oli ha evidenziato oltre 50 composti. Sono stati presi in considerazione i principali composti volatili C6 derivanti dalla via della lipossigenasi, responsabili dei sentori di foglia frutta e vegetali non completamente maturi e, con diverse sfumature, dell'erba appena tagliata (note verdi e fruttate) (4).



Principali composti volatili C6 rilevati negli oli prodotti dalla varietà *Coratina* alla I decade di novembre.

È stato possibile osservare come siano riscontrabili delle differenze, soprattutto al primo prelievo, tra i campioni sottoposti al processo di denocciolazione e quelli ottenuti in maniera tradizionale. In particolare, tra i composti C6, gli alcoli risultano maggiori negli oli denocciolati contribuendo alla loro complessità aromatica.

Di seguito si riportano il *loading plot* e lo *score plot* risultanti dalla PCA effettuata per gli attributi sensoriali, la composizione fenolica ed i principali composti volatili C6 identificati nei campioni di olio ottenuti mediante le due diverse tecnologie (denocciolazione e frangitura tradizionale). Lo *score plot* mette in evidenza nette differenze per le coppie di campioni di *Coratina* e *Ogliarola* ottenuti da olive alla prima epoca di raccolta: i campioni di olio da paste denocciolate (1 cor de e 1 ogl de), risultano correlati sia ai composti fenolici che alla maggior parte dei composti volatili considerati oltre che agli attributi sensoriali riconducibili alle note verdi. Nella successiva epoca di raccolta, i campioni denocciolati e non denocciolati, non presentano differenze significative, ed appaiono raggruppati in funzione dell'epoca di raccolta. Gli oli appartenenti alla varietà *Maiatica*, invece, non presentano significative differenze sia alla prima epoca di raccolta che alla seconda.



Loading plot (a) e score plot (b) risultante dalla PCA (totale varianza spiegata: 73%) effettuata per gli attributi sensoriali, la composizione fenolica ed i principali composti volatili C6 rilevati mediante DHS-GC.

L'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione mostra, rispetto alla frangitura tradizionale, un minore stato di ossidazione primaria e un incremento di composti fenolici e volatili fortemente legato al fattore varietale. L'impatto maggiore è stato riscontrato sul profilo sensoriale, in quanto gli oli denocciolati sono apparsi differenziati soprattutto sulla base dell'intensità di percezione del fruttato di oliva, dell'amaro, del piccante e delle note olfattive caratteristiche, risultate più evidenti rispetto ai campioni tradizionali. Inoltre, è possibile affermare che il miglioramento della qualità dell'olio extra vergine d'oliva prodotto con il sistema della denocciolazione delle paste appare fortemente legato allo stadio di maturazione all'atto della raccolta e trasformazione. Se quest'ultimo risulta avanzato (oltre inavviatura) gli oli non hanno mostrato significative differenze compositive e sensoriali.

Bibliografia

- AA.VV. 2002. Innovazione tecnologica per l'estrazione di olio extravergine da paste di olive snocciolate. I Georgofili *Quaderni* 2001-IV. Società Editrice Fiorentina, Firenze.
- Frega N., Caglioti L., Mozzon M., 1997. Composizione chimica e parametri di qualità degli oli estratti da paste snocciolate. Riv. It.Sost.Grassie, 74: 241-245.
- Frega N., Caglioti L., Mozzon M., 1999. Oli estratti da olive denocciolate: composizione chimica e parametri di qualità. *Olio & olio*, 1/2: 40-44.
- Angerosa, F., Basti C., Vito R. 1999. Virgin olive oil volatile compounds from lipoxygenase pathway and characterization of some Italian cultivars. J. Agric. Food Chem., 47: 836-839.
- Mattei A., Marotta F., Giaccherini C., Mulinacci N., Romani A., Innocenti M., Vinceri F., Baccioni L., Fazio D. 2001. Caratteristiche degli extravergini da olive snocciolate. *Olio & Olio*, 1/2: 44-47.
- Regolamento CEE n. 2568/91 del 11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. Gazz. Uff. Com. Europ. 5/9/91 NL 248/1.



Università di Roma Tor Vergata

Polo delle Scienze e delle Tecnologie

GIORNALE

- [Home](#)
- [Programma](#)
- [Indice Lavori](#)
- [Indice per Area](#)
- [Indice per Autore](#)
- [Comitato Scientifico](#)

TENSOSTRUTTURA

Facoltà di MEDICINA e CHIRURGIA

Facoltà di SCIENZE BIOTECNOLOGICHE

Mercoledì 24 novembre

ORE 14,00-17,00

REGISTRAZIONE ED AFFISSIONE POSTER

I LAVORI SELEZIONATI PER LE COMUNICAZIONI ORALI
NON DOVRANNO ESSERE PRESENTATI COME POSTER

Giovedì 25 novembre

AULA A1

Tensostruttura

ORE 09,00

CERIMONIA DI APERTURA

Saluto del Presidente del Polo delle Scienze e delle Tecnologie
per la Vita

Prof. Luciano Mayol

AULA A1 - ORE 09,00-11,30 I SESSIONE COMUNICAZIONI
ORALI

AULA A2 - ORE 09,00-11,30 II SESSIONE COMUNICAZIONI
ORALI

ORE 12,00-13,00 DISCUSSIONE ITINERANTE DEI POSTER

ORE 13,00-14,00 PAUSA PRANZO

ORE 14,00-15,00 DISCUSSIONE ITINERANTE DEI POSTER

ORE 14,00-15,00 VISIONE POSTER DA PARTE DEL COMITATO
SCIENTIFICO

AULA A1 - ORE 15,30-17,30 III SESSIONE COMUNICAZIONI
ORALI

AULA A2 - ORE 15,30-17,30 IV SESSIONE COMUNICAZIONI
ORALI

Venerdì 26 novembre

AULA A1 - ORE 09,00-11,30 V SESSIONE COMUNICAZIONI ORALI

AULA A2 - ORE 09,00-11,30 VI SESSIONE COMUNICAZIONI ORALI

AULA A1 - ORE 11,00-13,00 VII SESSIONE COMUNICAZIONI ORALI

AULA A2 - ORE 11,00-13,00 VIII SESSIONE COMUNICAZIONI ORALI

ORE 13,00-14,00 PAUSA PRANZO

AULA MAGNA

FACOLTÀ MEDICINA e CHIRURGIA

ORE 14,30 - *Coro Polifonico del Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita*
"Joseph Grima"

ORE 15,30

CERIMONIA CONCLUSIVA

Interverranno

Prof. Massimo Marrelli

Magnifico Rettore Università degli Studi di Napoli Federico II

Prof. Giovanni Persico

Preside Facoltà Medicina e Chirurgia

Prof. Gennaro Piccialli

Preside Facoltà Scienze Biotecnologiche

LETTURA MAGISTRALE

Presentazione del Prof. Fabrizio Pane

Ordinario di Ematologia Università degli Studi di Napoli Federico II

Titolo della Lettura: *"Malattie clonali dell'ematopoiesi"*

Relatore: ***Prof. Lucio Luzzatto,***

Direttore Scientifico Istituto Toscano Tumori

Professore di Ematologia Università degli Studi di Firenze

Intervento del Prof. Silvestro Formisano

Concerto

"Federico II Jazz Ensemble"

LA CAPSAICINA NELL'OLIO AROMATIZZATO AL PEPERONCINO

Della Medaglia D.A., G. Nicoletti, A. Paduano, R. Sacchi*

*Dipartimento di Scienza degli Alimenti – Facoltà di Agraria
Università degli studi di Napoli "Federico II", Portici (NA)*

L'olio aromatizzato al peperoncino fa parte dei "gourmet oils" usati come condimento o esaltatori di sapidità per la cui produzione vengono usati erbe e spezie mediterranee aggiunte ad una base oleosa.

Il peperoncino piccante (fam. *Solanaceae* gen. *Capsicum*) è una delle spezie più conosciute al mondo. Apprezzato per i suoi attributi sensoriali di colore, piccantezza ed aroma, il suo uso come alimento/condimento risale a tempi antichissimi. È molto usato nell'industria alimentare, come agente colorante ed aromatizzante, nella forma in polvere o come oleoresina (estratto concentrato) ed anche come materia prima nell'industria farmaceutica. La specie *Capsicum annum* include la maggior parte dei peperoncini che si trovano in commercio e più comunemente presenti in Italia.

Tra le sostanze antiossidanti presenti nel frutto vi sono dei composti esclusivi di questo genere detti capsaicinoidi: la capsaicina è il prototipo di questa classe di composti.

La capsaicina [(E)-N-4-idrossi-3-metossibenzil-8-metil-6-nonenamide] e la diidrocapsaicina (6,7-diidroderivato della capsaicina) sono i principali responsabili del carattere piccante. La capsaicina è un protoalcaloide molto solubile in grassi e alcoli. Numerose sono le sue proprietà mediche e farmacologiche. Diversi autori si sono occupati dello studio delle sue proprietà antitumorali, antinfiammatorie e antiossidanti in modelli animali e in linee cellulari. Sono certamente ipotizzabili, quindi, effetti nutraceutici di alimenti contenenti la capsaicina, come l'olio aromatizzato al peperoncino.

Lo scopo del presente lavoro è stato lo studio del rilascio della capsaicina dalla polvere di peperoncino a seguito di infusione in olio di oliva.

La messa a punto di un metodo di estrazione liquido-liquido dei capsaicinoidi dal sistema olio/peperoncino e relativo dosaggio mediante analisi HPLC ha consentito una rapida determinazione quantitativa della capsaicina. La valutazione del rilascio della capsaicina nell'olio di oliva, in relazione al tempo di infusione (7, 15 e 30 gg) ed alla concentrazione di polvere di peperoncino in infusione (10% e 20%) ha permesso di definire le condizioni di infusione ottimali al fine di ottenere determinati profili degli estratti concentrati. Si è inoltre verificato che l'attività antiossidante (metodo ABTS+) degli oli dopo infusione, come anche il contenuto in carotenoidi e tocoferoli, è maggiormente influenzata dalla concentrazione in polvere di peperoncino che dal tempo di infusione.

È risultato possibile ridurre notevolmente il tempo di infusione mediante utilizzo di tecnologie innovative nella produzione dei concentrati (pochi secondi nel caso dell'uso di microonde e qualche decina di minuti con la sonicazione), ottenendo oli di elevata qualità sensoriale e nutrizionale.

Keywords: oli aromatizzati, peperoncino, capsaicina, analisi HPLC, attività antiossidante

Area tematica: 13

Pubblicazioni recenti degli autori:

Paduano, A., M.L. Ambrosino, D.A. Della Medaglia, E. Monteleone, & R. Sacchi. – 2009 - Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione. In Abstract Book "I° Convegno Nazionale dell'Olio e dell'Olio", Univ. degli studi di Napoli "Federico II"- Facoltà di Agraria, Portici (NA), p. 85.

Sacchi, R., C.Parisini, A.Paduano, D.A. Della Medaglia, M.Savarese & M.L. Ambrosino, 2010. Relationship between sensory profile and volatile compounds: identification of sensory typicality in PDO Italian olive oils. Proceeding Acts "Agrostat 2010 – 11th European Symposium on Statistical Methods for the Food Industry" (Academy School, eds.) pp. 65-72, Univ. of Sannio, Benevento, Italy. ISBN: 88-901015-8-X

Della Medaglia, D.A., 2010. Volatile markers of Extra Virgin Olive Oil quality and typicality. Proceeding Book "15th WORKSHOP on the development in the Italian PhD research on Food Science Technology and Biotechnology" (Cues, eds.) pp. 231-232, Univ. of Naples "Federico II", Portici (NA), Italy. ISBN: 978-88-95028-62-0

PROFILO SENSORIALE DEGLI OLI EXTRA VERGINI DI OLIVA IN RELAZIONE AI COMPOSTI FENOLICI E VOLATILI

Della Medaglia D.A.¹⁻², Orlando G.¹, Paduano A.¹⁻², Ambrosino M.L.² e Sacchi R.^{1*}

¹Dipartimento di Scienza degli Alimenti – Facoltà di Agraria
Università degli studi di Napoli “Federico II”, Portici (NA)

²Analisti Sensoriali Associati, Napoli

Il profilo aromatico dell'olio extra vergine di oliva è costituito da composti volatili e non volatili che stimolano gli organi di senso dando origine alla percezione olfatto-gustativo-tattile nota col termine di *flavour*.

I composti non volatili sono soprattutto gli agliconi (esteri dell'acido elenolico con il tirosolo e l'idrossitirosolo) di glucosidi amari (oleuropeina e ligstroside) direttamente correlati alla percezione di *amaro* e *piccante*.

L'identificazione della categoria di agliconi a cui attribuire la percezione dell'una e dell'altra sensazione è complicata dal fatto che potrebbero esistere interazioni con composti volatili capaci di stimolare sensazioni simili.

I composti volatili responsabili della maggior parte delle sensazioni organolettiche percepite durante l'assaggio di un olio extra vergine di oliva appartengono a diverse classi chimiche. I composti C6 che si originano dalla “cascata delle lipossigenasi”, ritenuti responsabili delle note di *verde* e di *fruttato* dell'olio di oliva di buona qualità, hanno odori che ricordano quelli dell'erba, delle foglie e dei frutti non completamente maturi. Da diverso tempo i composti minori dell'olio extravergine di oliva sono studiati con riferimento alle singole soglie di percezione per tentare di spiegare l'origine delle percezioni sensoriali sperimentate durante l'assaggio e il possibile ruolo delle interazioni tra i diversi componenti.

In questo studio abbiamo voluto ragionare sul contributo relativo dei composti volatili e fenolici alla percezione degli attributi *amaro* e *piccante*.

Oli extra vergini di oliva di diversa origine sono stati analizzati per la componente fenolica, volatile e sensoriale. L'analisi dei composti fenolici è stata effettuata tramite HPLC dell'estratto idroalcolico. I composti volatili sono stati analizzati mediante DHS/GC-FID. Il profilo sensoriale è stato determinato da un panel secondo il metodo COI (Reg.CE 2568/91) per la quantificazione dei descrittori specifici.

Dall'analisi statistica dei dati ottenuti, effettuata mediante analisi delle componenti principali (XLSTAT Addinsoft version 6.1), si è osservato una più elevata correlazione tra i composti derivati dall'oleuropeina (OHTy-EDA e OHTy-EA) e l'attributo amaro rispetto ai composti derivati dal ligstroside (Ty-EDA e Ty-EA), maggiormente correlati al piccante. Anche il contenuto di *trans-2* esenale appare positivamente correlato all'amaro ed al piccante.

Per verificare se alcuni composti volatili, come la *trans-2* esenale, possono manifestare un effetto sinergico nella percezione delle note amaro e piccante degli oli, è stata effettuata una prova di abbattimento degli aromi da un olio extra vergine di oliva mediante gorgogliamento di azoto. La valutazione sensoriale ha evidenziato una chiara riduzione dell'intensità del fruttato e delle note verdi, oltre ad una significativa riduzione della percezione del piccante. La conferma di questi risultati potrebbero avvalorare una sinergia olfatto/gustativa nella percezione degli attributi sensoriali.

Keywords: olio extravergine di oliva, composti fenolici, composti volatili, analisi sensoriale

Area tematica: 13

Pubblicazioni recenti degli autori:

Paduano, A., M.L. Ambrosino, D.A. Della Medaglia, E. Monteleone, & R. Sacchi. – 2009 - Effetto della denocciolazione sulla qualità degli oli extravergini di oliva in relazione a varietà e grado di maturazione. In Abstract Book “I° Convegno Nazionale dell'Olio e dell'Olio”, Univ. degli studi di Napoli “Federico II”- Facoltà di Agraria, Portici (NA), p. 85.

Sacchi, R., C.Parisini, A.Paduano, D.A. Della Medaglia, M.Savarese & M.L. Ambrosino, 2010. Relationship between sensory profile and volatile compounds: identification of sensory typicality in PDO Italian olive oils. Proceeding Acts “Agrostat 2010 – 11th European Symposium on Statistical Methods for the Food Industry” (Academy School, eds.) pp. 65-72, Univ. of Sannio, Benevento, Italy. ISBN: 88-901015-8-X

Della Medaglia, D.A., 2010. Volatile markers of Extra Virgin Olive Oil quality and typicality. Proceeding Book “15th WORKSHOP on the development in the Italian PhD research on Food Science Technology and Biotechnology” (Cues, eds.) pp. 231-232, Univ. of Naples “Federico II”, Portici (NA), Italy. ISBN: 978-88-95028-62-0

Profilo sensoriale degli oli extra vergini di oliva in relazione ai composti fenolici e volatili

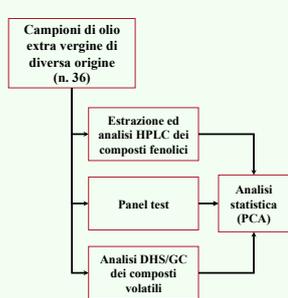
Della Medaglia D.A.^{o#}, Orlando G.^o, Paduano A.^{o#}, Ambrosino M.L.^{o#} e Sacchi R.^o

^oDipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Facoltà di Agraria, I-80055 Portici, Italy; #Analisti Sensoriali Associati, Napoli - e-mail: dellamed@unina.it

Il profilo aromatico dell'olio extra vergine di oliva è costituito da composti volatili e non volatili che stimolano gli organi di senso (papille gustative sulla lingua, terminazioni nervose nella bocca e nel naso, bulbo olfattivo nella cavità nasale) dando origine alla complessiva percezione olfatto-gustativo-tattile nota col termine di *flavour*. I composti non volatili sono soprattutto gli agliconi (esteri dell'acido elenolico con il tirosolo e l'idrossitirosolo) dei glucosidi amari (oleuropeina e ligstroside) naturalmente presenti nelle olive. Gli agliconi si formano in seguito a rottura enzimatica dei glucosidi durante la frangitura delle olive e sono direttamente correlati alla percezione delle note *amaro* e *piccante* percepite durante l'assaggio degli oli extra vergini di oliva. Diversi studi (Andrews *et al.*, 2003; Gutierrez-Rosales *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2004) hanno anche tentato di chiarire a quale categoria di agliconi fosse attribuibile la percezione dell'umidità e dell'altra sensazione. La precisa identificazione, tuttavia, è complicata dal fatto che potrebbero esistere interazioni con composti volatili capaci di stimolare sensazioni simili.

I composti volatili responsabili della maggior parte delle sensazioni organolettiche percepite durante l'assaggio di un olio extra vergine di oliva sono caratterizzati da un basso peso molecolare (< 300 Da), una elevata volatilità ed appartengono a diverse classi chimiche quali aldeidi, chetoni, alcoli, esteri, idrocarburi, eteri. Tra questi, i composti a sei atomi di carbonio (C6) che si originano dalla "cascata delle lipossigenasi", hanno odori che ricordano l'erba appena tagliata, la foglia o frutti non completamente maturi, con diverse sfumature. Per questo motivo sono ritenuti responsabili delle cosiddette note di *verde* e di *fruttato* dell'olio di oliva di buona qualità (Aparicio e Morales, 1998; Angerosa *et al.*, 2004). Da diverso tempo i composti minori dell'olio extravergine di oliva sono studiati con riferimento anche alle soglie di percezione dei singoli composti per tentare di spiegare l'origine delle percezioni sensoriali sperimentate durante l'assaggio (Guth e Grosh, 1993; Aparicio *et al.*, 1996) e il possibile ruolo delle interazioni tra i diversi componenti (Caporale *et al.*, 2004).

In questo studio abbiamo voluto ragionare sul contributo relativo dei composti volatili e fenolici alla percezione degli attributi amaro e piccante



Vari oli extra vergini di oliva di diversa origine sono stati analizzati per la componente fenolica, volatile e sensoriale. L'analisi dei composti fenolici è stata effettuata tramite HPLC dell'estratto idroalcolico (Sacchi *et al.*, 2002).

I composti volatili sono stati analizzati mediante DHS/GC-FID (Morales *et al.*, 1994 modificato). I composti C6 sono stati considerati per la successiva elaborazione statistica.

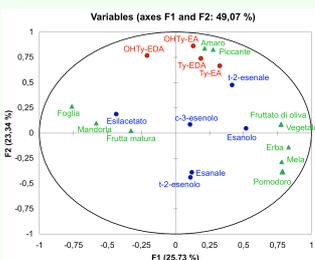
Il profilo sensoriale è stato determinato da un panel addestrato secondo il metodo COI (Reg.CE 2568/91) utilizzando una scala di 10 cm per la quantificazione dei descrittori specifici.

L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata mediante analisi delle componenti principali (XLSTAT Addinsoft version 6.1 - Parigi, Francia).

Analisi delle componenti principali

La disposizione relativa delle variabili utilizzate per l'analisi sul piano individuato dalle prime due componenti principali (F1 ed F2) fornisce una stima delle correlazioni esistenti tra le stesse.

È possibile osservare che tutti gli agliconi occupano una zona omogenea del grafico nelle immediate vicinanze degli attributi sensoriali amaro e piccante. In particolare dall'esame della matrice di correlazione di Pearson si può osservare una più elevata correlazione tra i composti derivati dall'oleuropeina (OHTy-EDA e OHTy-EA) e l'attributo amaro rispetto ai composti derivati dal ligstroside (Ty-EDA e Ty-EA), maggiormente correlati al piccante. Anche il contenuto di *trans-2* esenale, il composto volatile solitamente più abbondante negli oli di qualità, appare positivamente correlato all'amaro ed al piccante.



Matrice di correlazione (Pearson)

Variabili	OHTy-EDA	Ty-EDA	OHTy-EA	Ty-EA	t-2-esenale
Fruttato di oliva	-0,023	0,196	0,090	0,220	0,208
Mela	-0,365	-0,152	-0,188	-0,005	0,196
Frutta matura	0,065	-0,101	-0,052	-0,252	-0,050
Foglia	0,443	-0,020	0,089	-0,126	-0,205
Erba	-0,230	0,019	-0,076	0,090	0,313
Amaro	0,657	0,488	0,698	0,518	0,571
Piccante	0,455	0,610	0,648	0,726	0,724
Mandorla	0,009	-0,102	-0,161	-0,039	-0,067
Pomodoro	-0,374	-0,281	-0,343	-0,100	0,181
Vegetale	0,029	0,027	0,169	0,114	0,352

I valori in grassetto sono significativamente diversi da 0 al livello di significatività alfa=0,05



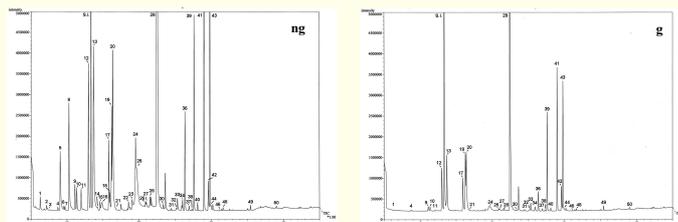
Questi dati sono sufficienti a concludere che alcuni composti volatili, ad esempio la *trans-2* esenale, possono manifestare un effetto sinergico nella percezione delle note amaro e piccante degli oli?

Sappiamo che solitamente oli ottenuti da olive verdi sono caratterizzati da un fruttato più intenso spesso associato ad una maggiore concentrazione di composti fenolici, e quindi più amari, rispetto ad oli ottenuti nelle medesime condizioni, ma da olive invaiate. Le correlazioni individuate potrebbero pertanto essere dovute alla fisiologia dell'oliva piuttosto che ad un reale impatto sensoriale sull'uomo.

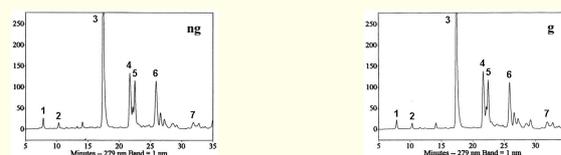
Per tentare di chiarire tali aspetti è stata effettuata una prova di abbattimento degli aromi da un olio extra vergine di oliva. Utilizzando una bottiglia di Drechsler collegata ad una bombola di azoto è stato fatto gorgogliare il gas nell'olio per 24 ore.

Sull'olio prima (ng) e dopo (g) lo strappaggio sono stati analizzati il profilo sensoriale, i composti volatili (SPME/GC/MS) e i composti fenolici.

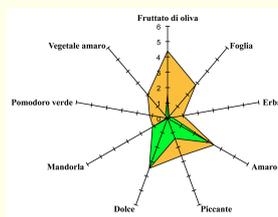
Il gorgogliamento ha determinato un significativo allontanamento di composti volatili dalla matrice oleosa, mentre non ha avuto alcun effetto sulla componente fenolica.



Corrente Ionica Totale (TIC) dei composti volatili determinati tramite analisi SPME/GC/MS nel campione di olio ottenuto dalla varietà "Tonda", sottoposto alla prova di "strappaggio" con flusso di azoto per 24h, prima (ng) e dopo (g) gorgogliamento. Identificazione dei principali picchi: 20 = esanale; 29 = *trans-2*-esenale; 31 = esilacetato; 39 = esanolo; 41 = *cis-3*-esenolo; 43 = *trans-2*-esenolo.



Profili HPLC DAD dei composti fenolici ottenuti dagli oli della varietà "Tonda" prima (ng) e dopo (g) gorgogliamento con flusso di azoto. Identificazione dei picchi: 1 = idrossitirosolo; 2 = tirosolo; 3 = forma dialeideica della decarbossimetiloleuropeina aglicone; 4 = forma dialeideica del decarbossimetilglicoside aglicone; 5 = pinoresinolo; 6 = forma aldeidica dell'oleuropeina aglicone; 7 = forma aldeidica del decarbossimetilglicoside aglicone



Confronto tra i profili sensoriali prima (ng) e dopo (g) il trattamento con azoto.

La valutazione effettuata dal panel di assaggiatori ha evidenziato una chiara riduzione dell'intensità del fruttato e delle note verdi. Inoltre si osserva una significativa riduzione della percezione del piccante, mentre quella dell'amaro resta invariata.

La conferma di questi risultati a seguito di ulteriori prove potrebbe avvalorare l'esistenza di una sinergia olfatto/gustativa nella percezione degli attributi sensoriali, ed in particolare del piccante, degli oli extra vergini di oliva.

Bibliografia

Angerosa F., Sevvaggi R., Taticchi A., Esposto S., Montedoro G. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*. 1054: 17-31.
 Andrews P., Johanneke L.H.C.B., De Joode T., Groenewegen A., Alexandre H. 2003. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1415-1420.
 Aparicio R., Morales M.T., Alonso V. 1996. Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *J.A.O.C.S.* 73: 1253-1264.
 Aparicio R., Morales M.T. 1998. Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1116-1122.
 Caporale G., Policastro S., Monteleone, E. 2004. Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food quality and Preference*. 15: 219-227.
 Guth H., Grosh W. 1993. Quantitation of a potent odorant of virgin olive oil by stable isotope dilution assay. *J.A.O.C.S.* 70: 513-518.
 Gutierrez-Rosales F., Rios, J.J., Gomez-Rey, M.L. 2003. Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on line HPLC electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6021-6025.
 Mateos R., Cert A., Perez-Camino M.C., Garcia J.M. 2004. Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *J.A.O.C.S.* 81: 71-75.
 Morales M. T., Aparicio R., Rios J. J., 1994. Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J. Chromatog. A*. 668: 455-462.
 Sacchi R., Paduano A., Fiore F., Della Medaglia D., Ambrosino M.L. and Medina I. 2002. Behavior of virgin olive oil phenolic compounds during the thermal processing of a Oil Brine-Model System. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 2830-2835.

Società Italiana di Scienze Sensoriali



Riassunti

**CONVEGNO NAZIONALE
DI SCIENZE SENSORIALI**

Portici (NA) 1-2 Dicembre 2010



Università degli Studi di Napoli Federico II
Aula Cinese - Facoltà di Agraria
Via Università, 100 Portici (NA)

Adacta

marketing research & sensory analysis

ADRIANT[®]

Research and Sensory Marketing



Centro Italiano
di Analisi Sensoriale



CONSORZIO
TUTELA



La Perla del Mediterraneo



CAMO



FACOLTÀ DI AGRARIA

fresystem[®] S.p.A.
Industria prodotti surgelati dolci e salati



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita

www.scienzeensoriali.it



RELAZIONE TRA TIPICITÀ SENSORIALE E COMPOSTI VOLATILI IN ALCUNI OLI EXTRAVERGINI DOP ITALIANI

R. Sacchi¹, C. Parisini², A. Paduano¹, D.A. Della Medaglia¹, M. Savarese², M.L. Ambrosino³

¹ Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II

² CRIOL, Centro Ricerche per l'Industria Olearia, Industria Olearia Biagio Mataluni; Montesarchio (BN)

³ ASA, Analisti Sensoriali Associati, Napoli

sacchi@unina.it

I profili sensoriali di oli extravergini di oliva di alcune Denominazione di Origine Protetta (DOP) e di oli ottenuti da varietà di olive "tradizionali" di alcune regioni italiane hanno mostrato tipiche note sensoriali quali 'pomodoro verde' (o 'foglie di pomodoro'), 'rosmarino' (o 'origano'), 'mandorla amara', 'basilico'. L'analisi della frazione volatile dello spazio di testa (DHS e SPME) eseguita mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), ha permesso l'identificazione e la valutazione semi-quantitativa di un ampio numero di composti volatili legati alla percezione del fruttato di oliva, derivanti dalle vie metaboliche della lipossigenasi e dei terpenoidi.

Tenendo conto delle concentrazioni relative dei singoli composti volatili, misurate mediante GC/MS, e delle soglie di percezione (threshold) dei principali composti, è stato calcolato l'*Odour Activity Value* (OAV) e le molecole presenti a livelli compatibili con un possibile impatto sensoriale sono state prese in considerazione per una valutazione statistica multivariata (PCA, PLS). La PLS del set di dati sensoriali e compositivi ha permesso di individuare alcune molecole-chiave in grado di spiegare alcune note sensoriali tipiche. Tra queste, percezioni fortemente legate ad oli ottenuti da varietà tradizionali, come "foglie di pomodoro" nella varietà Ravece (DOP "Irpina") e Nocellara (DOP "Valle del Belice"), la nota di rosmarino-balsamico nella varietà Minucciola della DOP "Penisola Sorrentina", quella basilico nella DOP "Bruzio", hanno mostrato forti correlazioni rispettivamente con alcune aldeidi (E-3-esenale), alcoli (E-3-esenolo, esanolo), terpeni (limonene, eucaliptolo, beta-pinene) e con il linalolo.

Ipotesi sul ruolo eco-fisiologico di questi composti potrebbero essere la chiave per comprendere la base molecolare della tipicità degli oli vergini di oliva, soprattutto in relazione alle interazioni tra varietà di oliva ed ambiente.

Parole chiave: Aroma, olio extra vergine di oliva, DHS, SPME, GC/MS, DOP, PCA, PLS, composti volatili

Relazione tra tipicità sensoriale e composti volatili in alcuni oli extravergini DOP italiani

R. Sacchi¹, C. Parisini², A. Paduano¹, D. A. Della Medaglia¹, M. Savarese² e M. L. Ambrosino³

¹Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, I-80055 Portici, Italy;

²CRIOI, Centro Ricerche per l'Industria Olearia, Industria Olearia Biagio Mataluni, Montesarchio (BN), Italy;

³Analisti Sensoriali Associati, Napoli - e-mail: sacchi@unina.it

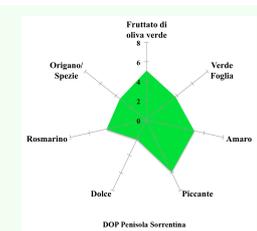


I profili sensoriali di oli extravergini di oliva di alcune Denominazione di Origine Protetta (DOP) e di oli ottenuti da varietà di olive "tradizionali" di alcune regioni italiane hanno mostrato tipiche note sensoriali quali 'pomodoro verde' (o 'foglie di pomodoro'), 'rosmarino' (o 'origano'), 'mandorla amara', 'basilico'. L'analisi della frazione volatile dello spazio di testa (DHS e SPME) eseguita mediante gas-cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), ha permesso l'identificazione e la valutazione semi-quantitativa di un ampio numero di composti volatili legati alla percezione del fruttato di oliva (aldeidi, alcoli, esteri e terpeni), derivanti dalle vie metaboliche della lipossigenasi e dei terpenoidi.

Tenendo conto delle concentrazioni relative dei singoli composti volatili, misurate mediante GC/MS, e delle soglie di percezione (threshold) dei principali composti, è stato calcolato l'Odour Activity Value (OAV) e le molecole presenti a livelli compatibili con un possibile impatto sensoriale sono state prese in considerazione per una valutazione statistica multivariata (PCA, PLS).

La PLS del set di dati sensoriali e compositivi ha permesso di individuare alcune molecole-chiave in grado di spiegare alcune note sensoriali tipiche. Tra queste, percezioni fortemente legate ad oli ottenuti da varietà tradizionali, come "foglie di pomodoro" nella varietà Ravece (DOP "Irpina") e Nocellara (DOP "Valle del Belice"), la nota di rosmarino-balsamico nella varietà Minucciola della DOP "Penisola Sorrentina", quella basilico nella DOP "Bruzio", hanno mostrato forti correlazioni rispettivamente con alcuni aldeidi (E-3-esenale), alcoli (E-3-esenolo, esanolo), terpeni (limonene, eucaliptolo, beta-pinene) e con il linalolo. Ipotesi sul ruolo eco-fisiologico di questi composti potrebbero essere la chiave per comprendere la base molecolare della tipicità degli oli vergini di oliva, soprattutto in relazione alle interazioni tra varietà di oliva ed ambiente.

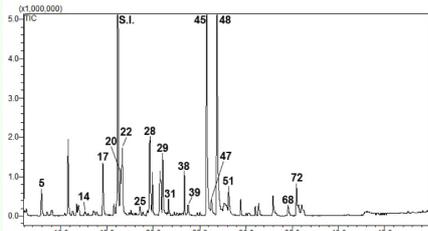
Oli extra vergini di oliva (OEO) DOP di diversa origine sono stati analizzati per la componente volatile e sensoriale. I composti volatili sono stati analizzati mediante DHS-GC/MS e SPME-GC/MS (Morales *et al.*, 1994; Vichi *et al.*, 2003). Il profilo sensoriale è stato determinato da un panel addestrato secondo il metodo COI (Reg.CE 2568/91) utilizzando una scala di 10 cm per la quantificazione dei descrittori specifici. L'analisi statistica dei dati ottenuti è stata effettuata mediante analisi delle componenti principali (XLSTAT Addinsoft version 6.1 - Parigi, Francia).



La Figura 1 mostra, come esempio, il tipico profilo sensoriale di un olio DOP "Penisola Sorrentina" caratterizzato dagli attributi sensoriali di "rosmarino" e "origano-spezie".

L'analisi effettuata mediante DHS-GC/MS ha permesso l'identificazione e la valutazione quantitativa di un gran numero di composti volatili relativi al flavour di "fruttato" che derivano dalla via della lipossigenasi e dei terpenoidi. Il cromatogramma dell'analisi GC/MS dello spazio di testa è riportato in Figura 1.

Figura 1. Esempio di profilo sensoriale (mediane per i principali attributi sensoriali) e cromatogramma della corrente ionica totale (TIC) ottenuto dall'analisi DHS-GCMS di un campione di OEO (DOP "Penisola Sorrentina").



Identificazione dei picchi: 5, octane, 14, ethanol, 17, 3-pentanone, 20, alfa-pinene, 22, 1-penten-3-one, 25, camphene, 28, hexanal, 29, beta-Pinene, 31, beta-phellandrene, 38, 3-Pentenol, 39, beta-Myrcene, 45, D-limonene, 47, eucalyptol, 48, trans-2-hexenal, 51, cis-beta-ciochinone, 68, cis-3-hexenol, 72, trans-2-hexenol.

L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) effettuata su un set di dati sensoriali e di composti volatili determinati sui campioni di olio DOP ha permesso di individuare in alcuni alcoli, aldeidi ed esteri e in alcuni composti terpenici, le molecole chiave in grado di spiegare alcuni attributi delle percezioni sensoriali (Figura 2). L'analisi statistica multivariata (PLS) ha confermato la stretta relazione tra le percezioni sensoriali e alcuni marcatori molecolari (Figura 3).

I principali risultati evidenziano che le note sensoriali di "rosmarino" e "spezie" percepite negli oli DOP "Penisola Sorrentina" (ottenuti dalla tradizionale varietà di olive Minucciola) hanno mostrato una stretta correlazione con gli alcoli (esanolo) e a molecole quali beta-pinene, eucaliptolo e D-limonene.

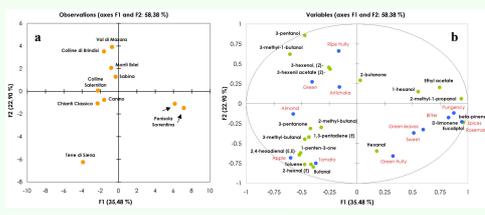


Figura 2. Score plot (a) e Loading plot (b) della PCA effettuata sui dati DHS GC/MS e sensoriali riscontrati negli oli DOP.

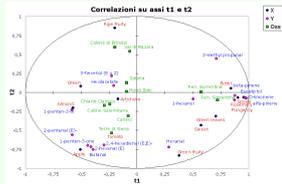


Figura 3. Partial Least Square (PLS) effettuata sui composti volatili ed i dati sensoriali.

Anche la tecnica analitica della SPME-GC/MS è stata utilizzata per l'analisi dei composti volatili degli OEO. L'SPME ha il vantaggio di essere sensibile, semplice, ripetibile, specifica e non comporta l'uso di solventi. In Figura 4 sono riportati alcuni esempi di cromatogrammi SPME-GC/MS di alcuni oli. Marcate differenze possono essere rilevate tra i diversi profili cromatografici per alcune aldeidi, alcoli e terpenoidi.

L'OEO della DOP 'Bruzio' ha mostrato la presenza di alcoli C6 (esanolo e trans-2-esenolo) e la rilevante presenza del cis-3-esenil estere dell'acido n-valerico e del beta-linalolo (Figura 4a). Il DOP 'Penisola Sorrentina' è caratterizzato dalla presenza di limonene ed eucaliptolo (Figura 4d). Gli oli caratterizzati dalle note sensoriali di "pomodoro" (ottenuti dalle varietà 'Biancolilla' e 'Ravece') sono caratterizzati per la presenza di elevate quantità di cis-3-esenale (Figura 4b e 4c).

L'analisi PLS effettuata può essere un utile strumento per comprendere la base chimica delle note sensoriali tipiche che si trovano nei diversi OEO. Nella Figura 5 è mostrata la PLS eseguita sui dati delle sostanze volatili e sensoriali di oli ottenuti dalle varietà Ravece, Ortice, Rotondella, Coratina e Tonda. Il sentore di pomodoro risulta essere correlato ai campioni di Ravece e Ortice.

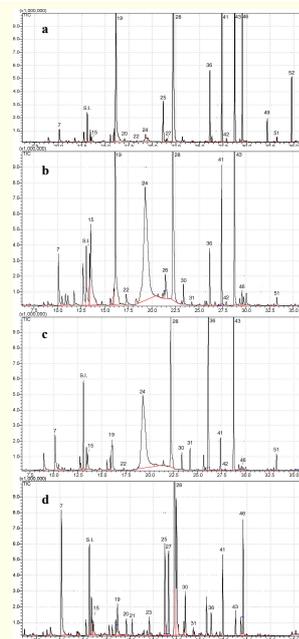


Figura 4. Corrente Ionica Totale (TIC) dei composti volatili determinati tramite analisi SPME GC/MS di alcuni oli: a) DOP Bruzio, b) varietà Biancolilla (Sicilia), c) DOP Irpinia-Colline dell'Ufita, d) DOP Penisola Sorrentina. Identificazione dei picchi: 7) ethanol, 15) 3 pentenone, 19) hexanal, 20) beta-pinene, 21) beta-phellandrene, 22) trans-2-pentalal, 23) beta-myrcene, 24) cis-3-hexenal, 25) D-limonene, 26) 3-methyl butanol, 27) Eucalyptol, 28) trans-2-hexenal, 30) beta-ciochinone, 31) n-hexyl acetate, 36) cis-3-hexenyl acetate, 41) hexanol, 42) trans-3-hexenol, 43) cis-3-hexenol, 46) trans-2-hexenol, 49) n-valeric acid cis-3-hexenyl ester, 51) copanene, 52) beta-linalool.

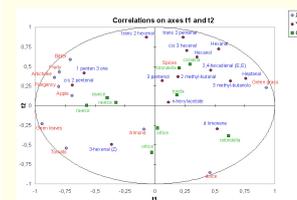


Figura 5. Partial Least Square (PLS) sui composti volatili ed i dati sensoriali.

Conclusioni

L'analisi dei dati sensoriali e strumentali tramite tecniche di statistica multivariata potrebbe consentire di evidenziare composti volatili che potrebbero essere utili per descrivere, e proteggere, le produzioni tipiche di oli extra vergini di oliva DOP. L'identificazione delle molecole-chiave legate a particolari attributi sensoriali potrebbe permettere anche di esaltare alcuni aromi caratteristici dell'olio attraverso la modulazione delle pratiche agronomiche e tecnologiche, al fine di ottenere un prodotto dalle migliori qualità sensoriali.

Una suggestiva ipotesi nasce da queste osservazioni preliminari. È noto che le piante "rispondono" agli artropodi con una emissione indotta di sostanze volatili, quali i terpenoidi (Mumm *et al.*, 2008) in grado di attrarre, ad esempio, carnivori predatori e parassitoidi. Il fatto che alcune varietà di olivo sono adattate ad ambienti particolari in cui le condizioni climatiche sono favorevoli allo sviluppo della mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*) e quindi al danneggiamento dei frutti (es. "Minucciola" nella DOP "Penisola Sorrentina") può essere spiegato dalla biosintesi e dall'emissione di composti volatili specificatamente coinvolti nei meccanismi di comunicazione oliva-insetto (Cheng *et al.*, 2007).

La combinazione di studi eco-fisiologici e molecolari, statistici e ecogenomici, sensoriali e metabolomici, potrebbe contribuire a comprendere le funzioni di difesa indiretta delle piante, le non visibili interazioni tra varietà e ambiente di crescita, che probabilmente sono alla base della tipicità sensoriale di molti alimenti di origine vegetale.

Bibliografia

- Aparicio, R., & Morales, M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1116-1122.
- Cheng A.X., Lou Y.G., Mao Y.B., Lu S., Wang L.J., Chen X.Y. (2007). Plant Terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49: 179-186.
- European Economic Community Regulation 2568/91. Off. J. Eur. Communities 1991, L 248, (1991).
- Luna G., Morales M.T., Aparicio R. (2006). Characterization of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98: 243-252.
- Morales, M.T., Aparicio, R., & Rios, J.J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J. Chromatogr. A.*, 668(2), 455-462.
- Mumm R., Posthumus M.A., Dicke M. (2008). Significance of terpenoids in induced indirect plant defence against herbivorous arthropods. *Plant, Cell and Environment*, 31: 575-585.
- Vichi, S., Castellote, A. I., Pizzale, L., Conte, L.S., Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2003) Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phaseMicroExtraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 19-33.

QUALITÀ SENSORIALE DI POMODORINI SEMI-DRY SOTT'OLIO PRODOTTI CON DIVERSI OLI ALIMENTARI

R. Sacchi, M. Ascione, A. Paduano, D.A. Della Medaglia

Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II

sacchi@unina.it

La tradizionale procedura di conservazione che prevede la sistemazione sott'olio degli alimenti non deve intendersi come tecnica di conservazione vera e propria. La preparazione nell'olio di molti prodotti orticoli (pomodori, melanzane, peperoni, ecc.) non ne assicura la conservazione nel tempo. L'olio non agisce sull'acqua contenuta nell'alimento, come altri sistemi di conservazione, ma serve ad isolare il prodotto dal contatto con l'aria bloccando l'azione dei batteri aerobi. La sistemazione degli ortaggi sott'olio è pertanto preceduta da trattamenti in grado di inibire lo sviluppo batterico (scottatura in aceto, essiccazione) e seguita dalla sterilizzazione/pastorizzazione, per assicurarsi l'eliminazione delle forme sporigene e degli enzimi.

Questo metodo di conservazione determina dunque una trasformazione del prodotto, ottenendo una matrice alimentare diversa dalle singole componenti, quali olio e vegetale, in cui l'olio di copertura è un mezzo per renderne più gradevole il sapore.

Nel presente lavoro si è valutato la qualità sensoriale di pomodorini parzialmente essiccati (semi-dry) preparati sott'olio con diversi oli alimentari (olio extravergine di oliva, olio di oliva e olio di girasole) stimandone l'accettabilità attraverso la conduzione di Preference Test e del Profilo Sensoriale definito da un panel analitico; si è inoltre studiato il profilo aromatico iniziale degli oli di copertura, e le modifiche dopo trattamento termico e stabilizzazione delle conserve per 6 mesi.

L'accettabilità, valutata attraverso la conduzione di un Preference Test, ed il Profilo Sensoriale delle conserve hanno consentito di individuare nel prodotto confezionato in olio extravergine di oliva la maggiore qualità percepita e di attribuire tale preferenza alla permanenza di attributi sensoriali dell'olio originario (fruttato di oliva, amaro, piccante) in equilibrio con i sentori tipici del pomodoro fresco ed essiccato.

Il Profilo Aromatico degli oli di copertura, valutato mediante SPME-GC/MS dei composti volatili, ha confermato nel prodotto sott'olio extravergine la presenza di molecole odorose dell'olio extravergine e del pomodoro, confermando la maggiore qualità sensoriale rilevata in queste produzioni mediante il Preference Test.

Parole chiave: Pomodorini semi-dry, qualità sensoriale, preference test, composti volatili

QUALITÀ SENSORIALE DI POMODORINI SEMI-DRY SOTT' OLIO PRODOTTI CON DIVERSI OLI ALIMENTARI

Raffaele Sacchi, Marcello Ascione, Antonello Paduano, Dorotea Anna Della Medaglia
Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli "Federico", Portici (NA)



La tradizionale procedura di conservazione che prevede la sistemazione sott'olio degli alimenti non deve intendersi come tecnica di conservazione vera e propria. La preparazione nell'olio di molti prodotti orticoli (pomodori, melanzane, peperoni, ecc.) non assicura la conservazione nel tempo. L'olio non agisce sull'acqua contenuta nell'alimento, come altri sistemi di conservazione, ma serve ad isolare il prodotto dal contatto con l'aria bloccando l'azione dei batteri aerobi.

La sistemazione degli ortaggi sott'olio è pertanto preceduta da trattamenti in grado di inibire lo sviluppo batterico (scottatura in aceto, essiccazione) e seguita dalla sterilizzazione/pastorizzazione, per assicurarsi l'eliminazione delle forme sporigene e degli enzimi. Questo metodo di conservazione determina dunque una trasformazione del prodotto, ottenendo una matrice alimentare diversa dalle singole componenti, quali olio e vegetale, in cui l'olio di copertura è un mezzo per renderne più gradevole il sapore.



Si è valutato la qualità sensoriale di pomodorini parzialmente essiccati (semi-dry) preparati sott'olio con diversi oli alimentari (olio extravergine di oliva, olio di oliva e olio di girasole) stimandone l'accettabilità attraverso la conduzione di Preference Test e del Profilo Sensoriale definito da un panel analitico; si è inoltre studiato il profilo aromatico iniziale degli oli di copertura, e le modifiche dopo trattamento termico e stabilizzazione delle conserve per 6 mesi.

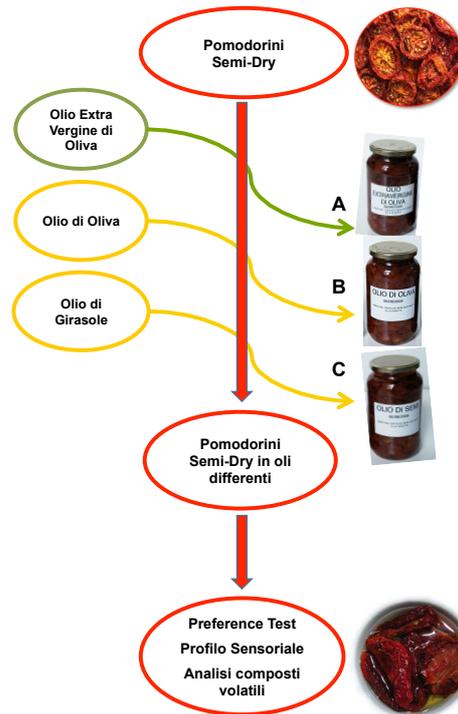
Preference Test Per effettuare l'analisi sensoriale dei campioni oggetto di studio è stato effettuato un primo approccio per valutare la preferenza dei consumatori utilizzando il metodo dell'ordinamento multiplo; questo tipo di test è indicato per discriminare, in ordine di preferenza due o più campioni. Ad un gruppo di 40 assaggiatori non addestrati (consumatori) sono stati presentati, in una sola seduta e simultaneamente i tre campioni da ordinare in base alla propria preferenza.

Il protocollo di lavoro seguito ha permesso di ottimizzare le condizioni operative:

- ✓ Identificazione dei campioni con codici numerici a tre cifre
- ✓ Identificazione di tutte le possibili sequenze di assaggio
- ✓ Ordine randomizzato



Assaggiatore	Codice campione			Ordine di assaggio
1	855	367	524	A - B - C
2	364	542	834	B - C - A
3	549	859	389	C - A - B
...
40	829	374	536	A - B - C



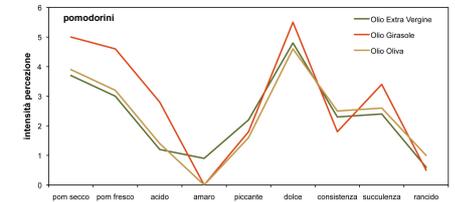
I campioni analizzati sono stati prodotti utilizzando pomodorini del tipo "cherry" presso l'Azienda "DE CARLO s.r.l.", Bitritto, Bari.

Gli oli utilizzati come liquido di copertura sono stati Olio Extra Vergine d'Oliva "DE CARLO s.r.l.", Olio d'Oliva e Olio di Semi di Girasole "AUCHAN".

Sono stati prodotti, per ogni tipo di olio, 10 vasetti di vetro dal peso netto di 1Kg/cdu seguendo tale proporzione: 660 g di pomodorini semi-dry + 330 g di olio.

Profilo Sensoriale I profili sensoriali dei pomodorini semi-dry sgocciolati hanno confermato la netta differenza nei diversi attributi evidenziando:

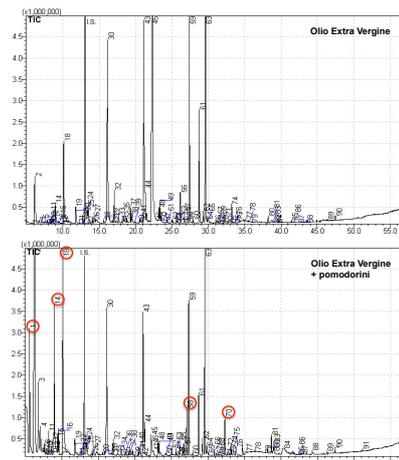
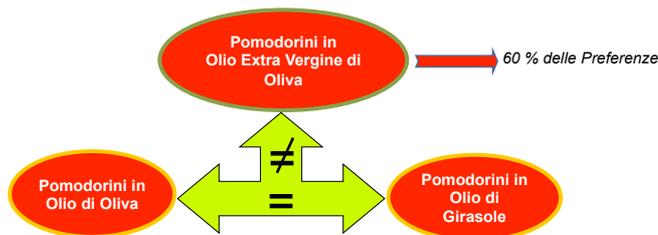
- ✓ Il prodotto in olio di girasole, presenta una maggior percezione degli attributi di pomodoro fresco, del carattere dolce e succulento (associato ad una minor consistenza);
- ✓ Il prodotto in extra vergine mostra un equilibrio delle caratteristiche sensoriali del pomodoro con quelle amare e pungenti tipiche dell'Olio Extra Vergine d'Oliva;
- ✓ Il prodotto in olio d'oliva mostra un profilo simile all'extra, con l'eccezione del carattere amaro, che risulta nullo come per l'olio di semi di girasole.



L'analisi statistica dei risultati ottenuti è stata effettuata mediante il Test di Friedman calcolando il valore del parametro Chi-Quadrato χ^2 , in funzione del numero di campioni e del numero di assaggiatori utilizzati. Confrontando il valore ottenuto con il valore critico tabulato per $\alpha = 0,05$ e numero dei gradi di libertà (df) del parametro, si è potuto stabilire la significatività delle differenze tra i campioni.

$$\chi^2_{\text{calcolato}} > \chi^2_{\text{critico}} \rightarrow \text{Differenze significative tra i campioni}$$

Volendo determinare se la differenza nella classificazione di preferenza risulta significativa, sono state confrontate le differenze tra i ranghi con la Minima Differenza Significativa di Classificazione (MDSC), si è potuto quindi verificare quale campione differisse dagli altri risultando essere: $A \neq C = B$. Si è verificato, inoltre, che la preferenza espressa dai consumatori è stata attribuita ai campioni di conserva in olio extra vergine (60% delle preferenze).



Composti volatili Il Profilo Aromatico degli oli di copertura, valutato mediante SPME-GC/MS dei composti volatili, ha confermato nel prodotto sott'olio extravergine la presenza sia di molecole odorose dell'olio extravergine che del pomodoro, confermando la maggiore qualità sensoriale rilevata. L'Olio Extra Vergine d'Oliva di copertura presenta anche dopo il trattamento termico la prevalenza dei composti aromatici originari dell'olio, come l'esanale (30), l'esanolo (59), cis-3 esenolo (61) e trans-2 esenolo (63). La presenza del pomodoro a contatto con l'olio ha determinato l'arricchimento nei componenti caratteristici del pomodoro, in particolare si osserva la presenza di dimetil-sulfide (1), metanolo (14), etanolo (18), 6-metil-5-epiten-2-ono (58), furfurale (70).

Bibliografia

- European Economic Community Regulation 2568/91. Off. J. Eur. Communities, L248, 1991
Pagliarini Ella. Valutazione sensoriale. Aspetti teorici, pratici e metodologici. Hoepli, 2002
Porretta Sebastiano. Analisi sensoriale & consumer science. Chirioti, 2000
Vichi S., Castellote A. I., Pizzale L., Conte L. S., Buxaderas S., Lopez-Tamames E. Analysis of virgin olive oil volatile compounds by SPME coupled to GC with MS and FI detection. *Journal of Chromatography A*, 983, 2003

II Convegno Nazionale dell'Olivo e dell'Olio

Perugia 21 - 23 Settembre 2011
Facoltà di Agraria
Complesso Monumentale di San Pietro



RIASSUNTI



Dipartimento di Scienze Agrarie e
Ambientali
Università degli Studi di Perugia



Accademia Nazionale
dell'Olivo e dell'Olio



Società Ortoflorofrutticoltura
Italiana
GdL "Olivo ed Olio"

MARCATORI DI TIPICITÀ DEGLI OLI D'OLIVA DELLA PENISOLA SORRENTINA

Cimmino A., Paduano A., Della Medaglia D.A., Sacchi R.

*Dipartimento di Scienza degli Alimenti – Facoltà di Agraria
Università degli studi di Napoli “Federico II”, Portici (NA)*

Un olio extravergine di oliva è tipico quando, oltre ad essere tradizionalmente legato ad un territorio e ad una materia prima particolare, presenta caratteri compositivi e sensoriali nettamente distinguibili rispetto a prodotti simili: a tale definizione corrispondono diversi oli monovarietali e cultivar di origine protetta, la cui composizione varietale e le condizioni pedoclimatiche sono sufficientemente caratterizzate.

Il profilo sensoriale è una caratteristica tipicizzante. Le biogenesi dei diversi componenti di impatto sensoriale dell'olio extra vergine sono da attribuire all'oliva che li produce in diverse situazioni ambientali, di stress biotico e abiotico e in diverse condizioni agronomiche: l'individuare quindi questi marcatori molecolari della tipicità potrebbe fornire un utile strumento di difesa delle produzioni nazionali di pregio.

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di individuare i composti volatili legati alle note sensoriali tipiche degli oli prodotti a partire da olive della cultivar Minucciola nell'area della DOP “Penisola Sorrentina” e di valutare la variabilità delle note sensoriali di “rosmarino, erbe balsamiche” negli oli in relazione all'effetto annata.

Dai risultati ottenuti si è osservato che i composti volatili più caratteristici degli oli prodotti a partire da olive della cultivar Minucciola nell'area della DOP della “Penisola Sorrentina” sono il Limonene e l'Eucaliptolo, che possono in parte spiegare le note di erbe aromatiche (rosmarino, salvia, timo) che sono state evidenziate attraverso l'analisi sensoriale. La produzione di queste molecole capaci di conferire delle note sensoriali di “rosmarino e di erbe balsamiche” potrebbe essere legata alle condizioni climatiche (temperatura, pioggia) in funzione alla necessità della pianta di difendersi dagli attacchi parassitari.

CARATTERIZZAZIONE DI OLI DI OLIVA DI VARIETÀ CALABRESI**Robertiello R., Della Medaglia D.A., Paduano A., Sacchi R.***Dipartimento di Scienza degli Alimenti – Facoltà di Agraria**Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Portici (NA)*

L'olivicoltura in Calabria è diffusa su tutto il territorio regionale; nelle aree interne rappresenta la principale fonte di reddito per le aziende agricole. L'impostazione colturale produttiva è basata su sistemi ancora tradizionali, legati alle ridotte dimensioni e alla eccessiva frammentazione delle aziende. Sono da evidenziare rilevanti sforzi messi in atto in alcune realtà al fine di migliorare gli aspetti qualitativi della produzione. Il patrimonio varietale risulta alquanto diversificato annoverando più di trenta varietà presenti sul territorio regionale.

Questo lavoro ha avuto come obiettivo lo studio delle caratteristiche compositive e qualitative delle principali varietà calabresi trasformate presso lo stesso impianto estrattivo. Le varietà studiate sono: Carolea, una delle cultivar più importanti del panorama olivicolo calabrese; Cassanese, molto diffusa nella piana di Sibari; Ottobratica, diffusa principalmente nella Piana di Gioia Tauro-Palmi.

In particolare gli aspetti studiati sono stati la definizione del profilo lipidico e biofenolico al fine di valutare la stabilità ossidativa degli oli ottenuti da diverse cultivar e la caratterizzazione del profilo sensoriale e delle sostanze volatili al fine di valutare la tipicità dei diversi oli.

In relazione ai risultati ottenuti, pur da considerarsi preliminari per il ridotto numero di campioni analizzati, è stato possibile trarre alcune considerazioni conclusive.

Gli oli delle varietà prese in esame hanno mostrato un contenuto biofenolico non elevato che, associato ad un contenuto tocoferolico nella media, lascia presupporre un rapido decadimento della qualità complessiva dovuto a processi degradativi ossidativi.

Il profilo sensoriale dei diversi oli ha evidenziato come le cultivar Cassanese e Carolea si distinguano per i sentori erbacei e di pomodoro. Denominatore comune di tutte le varietà prese in esame è la scarsa percezione dell'amaro e del piccante contrapposta ad un'elevata percezione del dolce.

Caratterizzazione di oli di oliva di varietà calabresi

Robertiello R., Della Medaglia D. A., Paduano A., Sacchi R.

¹ Dip. di Scienza degli Alimenti, Università di Napoli Federico II, Facoltà di Agraria, 80055 Portici (NA), sacchi@unina.it;



L'olivicultura in Calabria è diffusa su tutto il territorio regionale; nelle aree interne rappresenta la principale fonte di reddito per le aziende agricole. L'impostazione colturale produttiva è basata su sistemi ancora tradizionali, legati alle ridotte dimensioni e alla eccessiva frammentazione delle aziende. Il patrimonio varietale risulta alquanto diversificato annoverando più di trenta varietà presenti sul territorio regionale.

Questo lavoro ha avuto come obiettivo lo studio delle caratteristiche compositive e qualitative di tre delle principali varietà calabresi, trasformate presso lo stesso impianto estrattivo. Le varietà studiate sono state: *Carolea*, una delle cultivar più importanti del panorama olivicolo calabrese; *Cassanese*, molto diffusa nella piana di Sibari; *Ottobratica*, diffusa principalmente nella Piana di Gioia Tauro-Palmi.

Le olive sono state trasformate presso il frantoio dell' "Olearia San Giorgio" dei fratelli Fazari (San Giorgio Morgeto – RC), utilizzando un frangitore a martelli e decanter a tre fasi (Alfa Laval). Sui campioni di olio sono stati determinati i parametri di qualità, la composizione in acidi grassi ed il profilo sensoriale secondo i metodi ufficiali di analisi, la frazione fenolica e la composizione in tocoferoli mediante analisi HPLC - DAD e l'analisi delle principali sostanze volatili mediante SPME-GC/MS.

Dall'analisi degli indici analitici (Acidità, Numero di Perossidi, Indici Spettrofotometrici) non si evidenziano differenze tra i campioni di olio se non quelle dovute alla differente epoca di raccolta e, in alcuni casi, a danni delle drupe dovuti ad agenti fitopatogeni.

Il contenuto in tocoferoli risulta più basso negli oli della cultivar *Carolea* mentre nei restanti oli si evidenziano discreti valori di tocoferoli totali, in relazione alla varietà.

La componente biofenolica degli oli ha evidenziato, per le tre varietà, una bassa dotazione in composti fenolici, sia semplici che complessi: in particolare, i campioni ottenuti da *Cassanese* e *Ottobratica* sono caratterizzati da un contenuto in fenoli totali più elevato rispetto a quelli ottenuti dalla varietà *Carolea*.

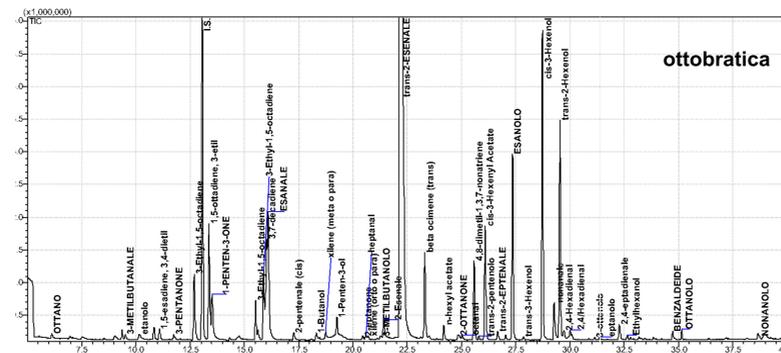
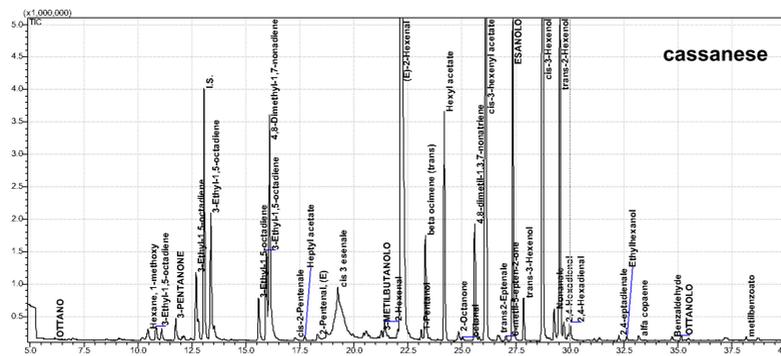
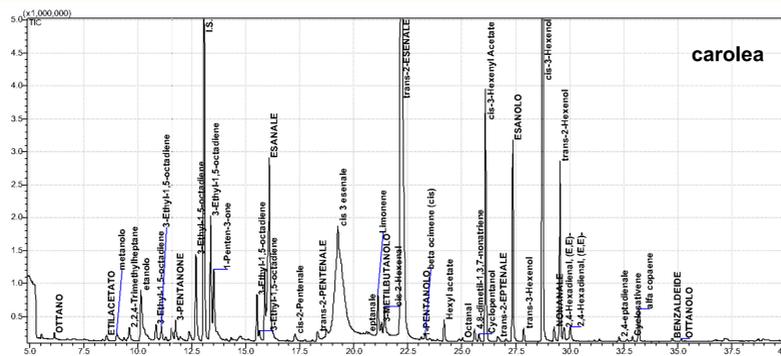
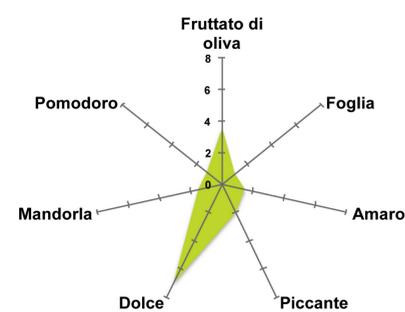
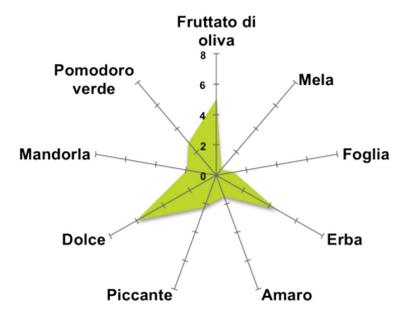
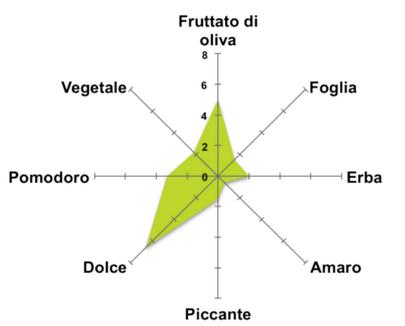
Dalla composizione in acidi grassi risulta evidente come la percentuale di acido oleico di tutti i campioni presi in esame risulti essere non elevata. Interessante notare come nei campioni di *Cassanese* e *Ottobratica* si abbia un valore di acido palmitico sensibilmente elevato, correlato ai valori più bassi di acido oleico.

Indici di qualità e contenuto in tocoferoli e biofenoli rilevati negli oli prodotti dalle varietà *Carolea*, *Cassanese* e *Ottobratica*.

Varietà Olive	I.M.	Data raccolta	Acidità % ac. oleico	NP meq O ₂ /Kg	UV			tocoferoli tot	fenoli totali
					K232	K270	ΔK		
Carolea 1	2,1	30-ott	0,2	5,1	1,458	0,106	-0,002	191	32
Carolea 2	2,5	10-nov	0,4	7,2	2,027	0,174	-0,006	154	39
Cassanese 1	1,0	18-ott	0,2	10,3	2,107	0,165	-0,099	308	61
Cassanese 2	1,4	28-ott	0,2	7,3	1,738	0,118	-0,003	280	91
Ottobratica 1	2,1	20-ott	0,3	6,0	1,416	0,116	-0,003	346	57
Ottobratica 2	3,1	13-nov	0,3	4,7	1,391	0,114	-0,004	260	67

Composizione percentuale degli acidi grassi riscontrati negli oli prodotti dalle varietà *Carolea*, *Cassanese* e *Ottobratica*.

Varietà Olive	C 14:0	C 16:0	C 16:1 ω9	C 16:1 ω7	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:1 ω7	C 18:2	C 20:0	C 18:3	C 20:1	C 22:0	squalene	C 24:0
	palmitico	palmitoleico	palmitoleico	eptadecanico	eptadecanico	stearico	oleico	vacenico	linoleico	arachico	linolenico	eicosanico	behenico		lignoceric	
Carolea 1	0,01	14,66	0,13	1,41	0,18	0,35	2,48	67,94	3,67	6,94	0,42	0,59	0,27	0,13	0,75	0,07
Carolea 2	0,01	14,18	0,12	1,63	0,23	0,45	3,07	66,94	3,69	7,42	0,51	0,52	0,29	0,15	0,67	0,08
Cassanese 1	0,21	26,53	0,16	1,21	0,14	0,12	2,79	56,01	2,44	8,33	0,18	0,83	0,18	0,13	0,69	0,07
Cassanese 2	0,04	23,03	0,17	1,18	0,09	0,12	2,19	60,73	2,47	7,96	0,19	0,73	0,22	0,12	0,69	0,08
Ottobratica 1	0,15	27,22	0,16	2,04	0,22	0,34	2,22	57,02	2,84	6,26	0,23	0,48	0,19	0,13	0,39	0,08
Ottobratica 2	0,02	25,41	0,19	1,75	0,29	0,37	2,81	57,61	2,51	7,46	0,28	0,41	0,19	0,15	0,49	0,08



I profili sensoriali degli oli, in tutte le varietà studiate, sono risultati caratterizzati da un elevato attributo di dolce, che per la varietà *Carolea* risulta essere armonizzato dalla elevata nota di fruttato di oliva e sentori di pomodoro e di vegetale. L'olio ottenuto dalla cultivar *Cassanese* presenta anch'esso elevate percezioni di fruttato di oliva, di erba e pomodoro verde con note di mandorla. L'olio della cultivar *Ottobratica* ha presentato un profilo dolce accompagnato da una media percezione di fruttato di oliva e leggere note di foglia e mandorla. Tutti gli oli hanno mostrato una leggera percezione di amaro e piccante, confermando la scarsa dotazione in biofenoli di queste varietà.

Per quanto riguarda la componente volatile è possibile osservare come gli oli della varietà *Cassanese* si presentino più ricchi di alcoli come l'esanolo, il *trans-2*-esanolo, *cis-3*-esanolo che risultano associati alle percezioni di fruttato e foglia verde. Si evidenzia anche come gli oli ottenuti dalla *Carolea* e dalla *Cassanese* presentino la *cis-3*-esanolo, responsabile di note di frutta, mela e pomodoro, assente nell'olio di *Ottobratica*. Inoltre si osserva la presenza di terpeni, quali il limonene e l'alfa murolene, riscontrati negli oli di *Carolea*.

Profili sensoriali e cromatogrammi SPME della frazione volatile degli oli prodotti dalla varietà oli prodotti dalle varietà *Carolea*, *Cassanese* e *Ottobratica*.

Bibliografia

- Aparicio R., Morales M.T., Alonso V. 1996. Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel. *J.A.O.C.S.* 73: 1253-1264.
- Baldioli M., Servili M., Perretti G. and Montedoro G.F. (1996). Antioxidant Activity of Tocopherols and Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil. *JAOCs*, 73: 1589-1593.
- Caporale G., Policastro S., Monteleone, E. 2004. Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food quality and Preference*. 15: 219-227.
- Montedoro G., Garofolo L. (1984). Caratteristiche qualitative degli oli vergini di oliva. *Riv. Ital. Sost. grasse*, 61: 157-168.
- Regolamento CEE n. 2568/91 del 11 luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché ai metodi ad essi attinenti. *Gazz. Uff. Com. Europ.* 5/9/91 NL 248/1.
- Sacchi R., Paduano A., Fiore F., Della Medaglia D., Ambrosino ML and Medina I. 2002. Behavior of virgin olive oil phenolic compounds during the thermal processing of a Oil Brine-Model System. *J. Agr. Food Chem.*, 50, 2830-2835.
- Tsimidou M., Papadopoulos G. and Boskou D. (1992). Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.*, 44: 53-60.
- Vichi S., Castellote A. I., Pizzale L., Conte L. S., Buxaderas S., López-Tamames E., (2003). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase MicroExtraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*. 983: 19-33.