

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**Facoltà di Agraria**

**Dipartimento di Scienze degli Alimenti**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEGLI ALIMENTI  
(AGR/15)**

**Coordinatore: Prof. Claudio Cavani**

**Tutor: Prof. Giovanni Lercker**

**Co-Tutor: Dr. Alessandra Bendini**

**STUDY OF THE ANTIOXIDANT FRACTION IN  
EDIBLE OLIVE OILS OBTAINED FROM DIFFERENT  
TECHNOLOGICAL SYSTEMS AND PARAMETERS**

**Dott.ssa Alba Poerio**

**Il Coordinatore**

**Prof. Claudio Cavani**

**Il Tutor**

**Dr. Giovanni Lercker**

**Il Co-Tutor**

**Dott.ssa Alessandra Bendini**

**Esame finale, anno 2007 – XIX Ciclo**

## 1. Sommario

Questo lavoro di tesi è stato suddiviso in tre parti.

L'argomento principale è stato lo "Studio della componente antiossidante di oli ottenuti da olive mediante l'utilizzo di diversi sistemi e parametri tecnologici".

E' ben noto come la qualità ossidativa di un olio di oliva dipenda oltre che dalla sua composizione in acidi grassi, dalla presenza di composti caratterizzati da un'elevata attività antiossidante, ovvero le sostanze fenoliche. I composti fenolici contribuiscono quindi in maniera preponderante alla shelf life dell'olio extravergine di oliva. Inoltre sono state riscontrate delle forti correlazioni tra alcune di queste sostanze e gli attributi sensoriali positivi di amaro e piccante.

E' poi da sottolineare come il potere antiossidante dei composti fenolici degli oli vergini di oliva, sia stato negli ultimi anni oggetto di considerevole interesse, poiché correlato alla protezione da alcune patologie come ad esempio quelle vascolari, degenerative e tumorali.

Il contenuto delle sostanze fenoliche negli oli di oliva dipende da diversi fattori: cultivar, metodo di coltivazione, grado di maturazione delle olive e ovviamente dalle operazioni tecnologiche poiché possono variare il quantitativo di questi composti estratti. Alla luce di quanto appena detto abbiamo valutato l'influenza dei fattori agronomici (metodi di agricoltura biologica, integrata e convenzionale) e tecnologici (riduzione della temperatura della materia prima, aggiunta di coadiuvanti in fase di frangitura e di gramolatura, confronto tra tre oli extravergini di oliva ottenuti mediante diversi sistemi tecnologici) sul contenuto in composti fenolici di oli edibili ottenuti da olive (paper 1-3-4).

Oltre alle sostanze fenoliche, negli oli di oliva sono presenti altri composti caratterizzati da proprietà chimiche e nutrizionali, tra questi vi sono i fitosteroli, ovvero gli steroli tipici del mondo vegetale, che rappresentano la frazione

dell'insaponificabile quantitativamente più importante dopo gli idrocarburi. La composizione quali-quantitativa degli steroli di un olio di oliva è una delle caratteristiche analitiche più importanti nella valutazione della sua genuinità; infatti la frazione sterolica è significativamente diversa in funzione dell'origine botanica e perciò viene utilizzata per distinguere tra di loro gli oli e le loro miscele. Il principale sterolo nell'olio di oliva è il  $\beta$ -sitosterolo, la presenza di questo composto in quantità inferiore al 90% è un indice

approssimativo dell'aggiunta di un qualsiasi altro olio. Il  $\beta$ -sitosterolo è una sostanza importante dal punto di vista della salute, poiché si oppone all'assorbimento del colesterolo. Mentre in letteratura si trovano numerosi lavori relativi al potere antiossidante di una serie di composti presenti nell'olio vergine di oliva (i già citati polifenoli, ma anche carotenoidi e tocoferoli) e ricerche che dimostrano invece come altri composti possano promuovere l'ossidazione dei lipidi, per quanto riguarda il potere antiossidante degli steroli e dei 4-metilsteroli, vi sono ancora poche informazioni. Per questo è stata da noi valutata la composizione sterolica in oli extravergini di oliva ottenuti con diverse tecnologie di estrazione e l'influenza di questa sostanza sulla loro stabilità ossidativa (paper 2).

E' stato recentemente riportato in letteratura come lipidi cellulari evidenziati attraverso la spettroscopia di risonanza nucleare magnetica (NMR) rivestano una importanza strategica da un punto di vista funzionale e metabolico. Questi lipidi, da un lato un lato sono stati associati allo sviluppo di cellule neoplastiche maligne e alla morte cellulare, dall'altro sono risultati anche messaggeri di processi benigni quali l'attivazione e la proliferazione di un normale processo di crescita cellulare.

Nell'ambito di questa ricerca è nata una collaborazione tra il Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" ed il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna. Infatti, il gruppo di lipochimica del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, a cui fa capo il Prof. Giovanni Lercker, da sempre si occupa dello studio delle frazioni lipidiche, mediante le principali tecniche cromatografiche. L'obiettivo di questa collaborazione è stato quello di caratterizzare la componente lipidica totale estratta dai tessuti renali umani sani e neoplastici, mediante l'utilizzo combinato di diverse tecniche analitiche: la risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN), la cromatografia su strato sottile (TLC), la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e la gas cromatografia (GC) (paper 5-6-7)

<b>1. Sommario .....</b>	<b>2</b>
<b><u>2. Indice.....</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b>3. Lista delle Pubblicazioni .....</b>	<b>5</b>
<b>4 Introduzione .....</b>	<b>6</b>
<b>4.1 Oli vegetali: principali differenze tra gli oli extravergini di oliva e gli altri oli vegetali .....</b>	<b>6</b>
<b>4.2 Le Alterazioni dell'olio di oliva .....</b>	<b>12</b>
4.2.1 L'idrolisi enzimatica.....	12
4.2.2 Irrancidimento ossidativo .....	13
4.2.3 Gli antiossidanti .....	17
<b>4.3 Composizione chimica dell'olio extravergine di oliva .....</b>	<b>18</b>
4.3.1 Costituenti principali: acidi grassi e gliceridi .....	19
4.3.2 Costituenti secondari.....	20
4.3.2.1 La frazione sterolica .....	22
4.3.2.2 La componente antiossidante degli oli di oliva: composti a struttura fenolica.....	24
4.3.2.3 Componente antiossidante degli oli di oliva: tocoferoli. ....	28
<b>4.4 L'influenza dei fattori agronomici sulla qualità degli oli vergini di oliva .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 L'influenza dei fattori tecnologici sulla produzione degli oli vergini di oliva .....</b>	<b>31</b>
4.5.1 Operazioni preliminari .....	31
4.5.1.1 Un'operazione preliminare particolare: la denocciolatura .....	32
4.5.2 La frangitura.....	35
4.5.3 La gramolatura .....	37
4.5.4 La separazione .....	39
4.5.4.1 Sistema di estrazione per pressione (sistema tradizionale).....	39
4.5.4.2 La separazione nei sistemi continui .....	40
4.5.5 Frantoi su piccola scala .....	42
<b>4.6 Produzione, scambio e consumi degli oli di oliva .....</b>	<b>43</b>
<b>4.7 Le caratteristiche dell'acido citrico: un additivo alimentare .....</b>	<b>48</b>
<b>4.8 Gli agrumi .....</b>	<b>49</b>
4.8.1 Il bergamotto.....	50
4.8.2 Il limone .....	51
<b>4.9 Alimenti funzionali e nutraceutici .....</b>	<b>52</b>
<b>4.10 Il freddo nella conservazione degli alimenti .....</b>	<b>53</b>
4.10.1 Refrigerazione .....	54
4.10.2 Congelamento .....	54
<b>4.11 Alimentazione e patologie di tipo neoplastico .....</b>	<b>59</b>
4.11.1 Utilizzo di tecniche cromatografiche nell'analisi della frazione lipidica in tessuti umani sani e neoplastici. ....	61
<b>5. Conclusioni .....</b>	<b>65</b>
<b>6. Bibliografia.....</b>	<b>67</b>
<b>Pubblicazioni Allegate</b>	

### 3. Lista delle Pubblicazioni

#### Quality of edible olive oil in relation to chemical composition, agricultural parameters and technological system

- Paper 1** A. Bendini, L. Cerretani, A. Poerio, M. Bonoli-Carbognin, T. Gallina Toschi, G. Lercker. "*Oxidative stability of virgin olive oils, produced by organic, integrated or conventional agricultural methods*" **Progr. Nutr.** 8: 104-115 (2006).
- Paper 2** L. Cercaci, G. Passalacqua, A. Poerio, M.T. Rodriguez-Estrada, G. Lercker. "*Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability*" **Food Chem.** 102: 66-76 (2007).
- Paper 3** Poerio A., Cerretani L., Bendini A., Cardinali A., Gallina Toschi T, Lercker G "*Effect of olive freezing on phenolic content and oxidative stability of virgin olive oil*". **Eur. J. Lipid Sci. Technol. (Inviata a Rivista)**
- Paper 4** A. Poerio, L.Cerretani, A Bendini,G. Lercker "*Study of antioxidant fraction in edible olive oils obtained from different technological systems and parameters*" **Eur. Food. Res. Technol. (Inviata a Rivista)**

#### Determination of lipids in functional and neoplastic tissues

- Paper 5** A. Trincherro, M.T. Rodriguez-Estrada, A. Poerio, A. Reggiani, M.R. Tosi, V. Tugnoli, G. Lercker "*Alterazioni lipidiche in tessuti renali neoplastici*" **Progr. Nutr.** 5: 221-227 (2003)
- Paper 6** M.R. Tosi, M.T. Rodriguez-Estrada, G. Lercker, A. Poerio, A. Trincherro, A. Reggiani, V. Tugnoli "*Magnetic resonance spectroscopy and chromatographic methods identify altered lipid composition in human renal neoplasms*" **Int. J. Mol. Med.** 14:93-100 (2004).
- Paper 7** M.T. Rodriguez-Estrada, A. Poerio, M. Mandrioli, G. Lercker, A. Trincherro, M. R. Tosi, V. Tugnoli. "*Determination of coenzyme Q10 in functional and neoplastic human renal tissues*" **Anal. Biochem.** 357: 150-152 (2006).

## 4. Introduzione

### 4.1 Oli vegetali: principali differenze tra gli oli extravergini di oliva e gli altri oli vegetali

I lipidi, nella maggior parte degli alimenti, consistono in una combinazione di grassi animali e vegetali. La composizione complessiva dipenderà dalle proporzioni in cui questi grassi sono presenti nonché dall'esatta natura dei grassi stessi. E' significativo notare come gli oli estratti dalle piante siano utilizzati sin dai tempi più antichi. Gli oli ed i grassi di origine vegetale vengono utilizzati sia per scopi di tipo culinario, ma anche per usi di tipo medico, farmaceutico, industriale.

Di seguito è riportato un elenco ed una breve descrizione delle principali tipologie di oli vegetali utilizzati nel campo dell'alimentazione a confronto con l'olio di oliva.

- *Olio di arachidi*: si ricava dalla pianta *Arachis hypogaea* L., probabilmente originaria dell'America Latina (Brasile), appartenente alla famiglia delle Leguminose e diffusa in climi tropicali e subtropicali. Quest'olio rappresenta una delle principali risorse agricole dell'Africa, dell'India, della Cina e degli Stati Uniti, con una produzione mondiale che supera i quattro milioni di tonnellate. I semi sono racchiusi in baccelli che si sviluppano nel terreno; lo stato di conservazione dei baccelli è importante, poiché i semi con umidità superiore al 15% possono venire attaccati principalmente dalla muffa *Aspergillus flavus*, in grado di produrre micotossine denominate appunto aflatossine; queste sono termostabili ed estremamente tossiche per gli organismi animali (soprattutto a livello epatico e polmonare). Le aflatossine presenti nell'olio vengono inattivate con la raffinazione. L'olio, liquido a temperatura ambiente, viene estratto per pressione e con solventi dai semi, con una resa del 38-50 %; l'olio grezzo ha una colorazione giallo-oro, mentre quello raffinato è giallo-chiaro. Per quanto riguarda la composizione chimica, gli acidi grassi presenti in maggiore quantità sono l'acido oleico (35-72 %) e il linoleico (13-45 %); è caratteristica la presenza dell'acido arachico (1-2,5 %), presente in percentuali minori negli altri oli. Tra gli steroli prevale il  $\beta$ -sitosterolo (64 %). I quantitativi di acido oleico e di  $\beta$ -sitosterolo si avvicinano a quelli dell'olio di oliva e per questa ragione esso è considerato, tra gli oli di semi, il più pregiato. I

principali impieghi dell'olio di arachide sono come olio da condimento o per frittura e secondariamente per la produzione di margarina e grassi idrogenati usati soprattutto in pasticceria; la farina sgrassata è impiegata nell'alimentazione animale, in quanto contiene una elevata quantità di proteine digeribili.

- *L'olio di girasole*: si ricava dai semi della pianta *Helianthus annuus L.* originaria dell'America, introdotta in Europa nel XVI secolo. Pianta annuale che matura in quattro mesi; alcune varietà sono ricche di acido linolenico, altre di acido oleico. I fiori vengono raccolti meccanicamente, quando l'umidità si è ridotta a circa il 9%-10%. Il seme è provvisto di un epicarpo legnoso che viene rimosso con un decorticatore prima di procedere all'estrazione dell'olio. L'olio si presenta di colore giallo chiaro e viene estratto da semi conservati in silos anche per lungo tempo. L'olio di girasole di qualità elevata viene impiegato come olio da tavola, da cucina, e per la fabbricazione delle margarine. Come olio da tavola subisce un processo idoneo per rimuovere le cere. L'olio di bassa qualità viene impiegato nell'industria cosmetica (dopo idrogenazione) e in quella delle vernici e delle resine.

- *Olio di mais*: si ricava dalla pianta annuale *Zea Mays*, coltivata principalmente come foraggio ma in parte anche per l'alimentazione umana e per usi industriali. La cariosside contiene circa il 5% di olio, di cui l'80% è concentrato nel germe. Il germe viene isolato per macinazione umida, un processo usato anche nella produzione di amido di mais, zucchero e sciroppo. L'olio di mais si ottiene combinando l'estrazione per pressione con l'estrazione mediante solventi e la resa è di circa il 5% rispetto al peso della cariosside intera. L'olio grezzo si presenta di colore rosso-ambra scuro, ha un'acidità inferiore al 3%, contiene quantità elevate di fosfolipidi e tracce di cere. L'olio raffinato, privo di cere e fosfolipidi, è uno degli oli di semi più utilizzati. Questo prodotto viene impiegato infatti come olio da tavola, da cucina e anche nella fabbricazione delle margarine, in alcuni casi dopo essere stato parzialmente idrogenato.

- *Olio di palma*: si ricava dalla pianta *Elaeis Guineensis*, originaria dell'Africa, ma successivamente diffusasi anche in Asia, America ed Europa. Il frutto è un gheriglio che contiene da 20 a 200 frutti singoli, dal cui mesocarpo si ottiene l'olio di palma e dai cui noccioli si ottiene l'olio di palmisto. L'olio di palma grezzo viene ottenuto dal mesocarpo dei frutti, sia per centrifugazione sia per pressione idraulica della polpa opportunamente trattata. La resa è del 75% circa rispetto al peso secco della polpa. L'olio grezzo si presenta

di colore arancio per l'elevata presenza dei carotenoidi e di consistenza diversa a seconda del tipo di estrazione usato. L'olio grezzo viene normalmente neutralizzato, decolorato e deodorato in unico stadio. Spesso l'olio di palma viene sottoposto a una idrogenazione parziale. Questo prodotto viene impiegato come olio da cucina e specie dopo frazionamento nell'industria delle margarine e in quella dei cosmetici.

- *Olio di soia*: si ricava da una delle piante più antiche coltivate dall'uomo ed è diffusa in Asia, Europa e America. L'olio grezzo viene ottenuto principalmente per estrazione con solventi (specialmente *n*-esano) dai semi, con una resa del 18-22%. Il residuo dell'estrazione è un farina che costituisce la principale fonte proteica destinata all'alimentazione animale. L'olio grezzo che proviene dai semi di soia alterati è scuro, ad elevato contenuto di acidi grassi liberi e di lipidi modificati; quando è di buona qualità si presenta di colore ambra. Esso viene degommato mediante l'aggiunta di acqua (2% del peso dell'olio) per recuperare i fosfatidi idratibili (pari all'1,5%-3%) che rappresentano un sottoprodotto di valore non trascurabile. L'olio degommato viene raffinato e sovente parzialmente idrogenato. Una volta raffinato viene impiegato come olio da tavola, olio da frittura, e nell'industria delle margarine. La tendenza dell'olio di soia all'ossidazione è dovuta al suo elevato tenore in acido linolenico, tendenza che viene ridotta quando l'olio viene sottoposto all'idrogenazione parziale. L'olio di soia viene utilizzato dall'industria chimica per la preparazione di resine, plastiche, lubrificanti, adesivi ecc.....).

- *Olio di vinaccioli*: si ricava da un sottoprodotto dell'industria enologica. I semi della pianta *Vitis Vinifera L.* vengono recuperati dal resto dell'acino, seccati e destinati all'estrazione dell'olio. L'estrazione viene effettuata con solventi, i vinaccioli delle uve bianche hanno una resa in olio pari al 20%; certe uve rosse arrivano al 6% circa. Non sono disponibili dati recenti sulla produzione mondiale di olio di vinaccioli.

- *Olio di colza*: si ricava dalle piante appartenenti alla famiglia delle Brassicaceae ed in particolare dalle specie: *Brassica napus L.*, *Brassica rapa L.*, *Brassica campestris L.* Nell'ultimo ventennio la natura del commercio della colza e dell'olio di colza è cambiata radicalmente, in seguito alla scoperta del rischio tossicologico dovuto all'acido erucico. In Europa e in Canada sono consentiti soltanto gli oli di colza con una percentuale di acido erucico inferiore al 5%. L'olio di colza si ottiene per pressione o per estrazione con solventi o anche combinando i due sistemi. La resa oscilla tra il 40 e il 60%. L'olio grezzo è di color ambra, con un contenuto di elevato di fosfatidi, pigmenti, (clorofilla) e composti solforati.

L'olio raffinato è di colore giallo-pallido, privo di cere, fosfatidi, e composti solforati. L'olio di colza a basso contenuto di acido erucico (ottenuto mediante selezione genetica) è impiegato come olio da tavola, da cucina e nella fabbricazione di margarine "shortening". In ambito industriale viene usato come lubrificante.

Oltre agli oli vegetali più importanti precedentemente citati vi è anche: l'*olio di sesamo* (*Sesamum indicum* L.), l'*olio di cotone* (*Gossypium hirsutum* L.) che viene principalmente usato per la fabbricazione di margarina e di "shortenings", l'*olio di lino* (*Linum usitatissimum* L.) usato principalmente come componente di colori, vernici, linoleum e inchiostri, l'*olio di ricino* (*Ricinus communis* L.) di prima pressione ha un impiego farmaceutico ed inoltre viene utilizzato dall'industria dei colori e delle vernici, dopo disidratazione per le sue proprietà ingiallenti, ed ancora come lubrificante, come plasticizzante e anche polimerizzante ad alta temperatura [1].

- L'*olio vergine da olive* si ottiene dalle olive, drupe della pianta *Olea Europea* L, appartenente alla famiglia dell'Oleacea. La coltivazione degli olivi risale a tempi biblici ed ancora oggi insieme alla relativa produzione dell'olio, resta nel bacino del Mediterraneo, una pratica agricola essenziale.

Negli oliveti dell'Europa del sud, l'olivo fiorisce in primavera e produce un piccolo germoglio ovoidale, che si sviluppa nelle drupe mature fra ottobre e gennaio, secondo la zona in cui si trova [2].

A differenza degli altri oli vegetali, quello di oliva si ottiene soltanto attraverso fasi meccaniche (frangitura, gramolatura e separazione delle fasi ottenute) viene quindi successivamente consumato senza alcun processo di raffinazione o altri trattamenti chimici.

Fra i vari oli e grassi alimentari l'olio d'oliva risulta il più facilmente digeribile, grazie alla sua composizione, che è molto simile a quella del grasso e del latte umano; infatti, ponendo 100 il coefficiente di digeribilità dell'olio d'oliva, si ottiene 83 per l'olio di girasole, 81 per l'olio di arachide, 57 per l'olio di sesamo, 36 per l'olio di mais [3]. Dato che la digeribilità è espressa dalla differenza tra quantità ingerita (I) e quantità escreta (E), il coefficiente di digeribilità percentuale per definizione è dato da:

$$\frac{I - E}{I} \times 100$$

Gli acidi grassi contenuti nell'olio di oliva hanno un grado di insaturazione intermedio; inoltre il basso contenuto in acidi grassi saturi rappresenta un vantaggio dal punto di vista nutrizionale e salutistico. L'acido oleico (C18:1) è il più abbondante tra gli acidi presenti

(70-80%) e ad esso vengono attribuiti i vantaggi legati all'elevata digeribilità dell'olio crudo e gli effetti benefici sull'apparato cardiocircolatorio: alcuni autori [3] lo considerano un acido essenziale, almeno in determinate circostanze, in quanto l'organismo animale lo sintetizza molto lentamente. Infine, l'elevato contenuto di questo acido grasso monoinsaturo determina un indice di iodio abbastanza basso (circa 80), che rende l'olio di oliva particolarmente stabile alle degradazioni ossidative [4].

I trigliceridi, sottoposti all'azione dell'alta temperatura durante la cottura, originano composti nocivi alla salute umana; anche da questo punto di vista l'olio d'oliva si differenzia, producendo meno perossidi e polimeri rispetto agli altri oli. Un altro particolare che rende prezioso l'olio di oliva è dato dalla presenza simultanea di più composti ad effetto antiossidante, principalmente sostanze fenoli e tocoferoli, che possono agire anche sinergicamente [5].

L'olio di oliva ha anche la capacità di defluire rapidamente dai cibi sottoposti a frittura, riducendo i rischi connessi agli eccessi di grassi all'interno dell'alimento. Dal punto di vista pratico, l'elevato costo dell'olio di oliva, rispetto ai più comuni oli di semi, limita il suo utilizzo a produzioni particolari, prodotti tipici locali e alle frittiture casalinghe. Invece, a livello industriale trovano maggiore impiego gli oli di arachide, mais e girasole: esistono poi una serie di prodotti realizzati appositamente per costituire l'olio di frittura ideale, come ad esempio l'olio di girasole modificato (ad alto contenuto di acido oleico) e frazionato con percentuali minime di olio di palma o palmisto (mandorla di noce di palma), oli ad alto oleico privi di acidi grassi *trans*, oppure olio di colza, ottenuto per selezione genetica (0% erucico, 60% e 25% di acido oleico e linoleico rispettivamente).

L'olio extravergine di oliva è una delle principali fonti di grassi nella cosiddetta dieta Mediterranea ed ha una composizione chimica del tutto peculiare e una qualità nutrizionale del tutto superiore rispetto agli altri oli ottenuti dai semi. Di seguito sono riportati la composizione media e le temperature di solidificazione dei principali grassi e oli. (Tabella 1)

Acido Grasso (%)	Olio di Oliva	Olio di Arachide	Olio di Soia	Olio di Mais	Olio di Girasole	Olio di Colza
Capronico C6:0	-	-	-	-	-	-
Caprilico C8:0	-	-	-	-	-	-
Caprico C10:0	-	-	-	-	-	-
Laurico C12:0	-	0,0-0,1	0,0-0,1	0,0-0,3	0,0-0,1	-
Miristico C14:0	0,0-0,05	0,0-0,1	0,0-0,2	0,0-0,3	0,0-0,2	0,0-0,2
Palmitico C16:0	7,5-20,0	8,3-14,0	8,0-13,3	8,6-16,5	5,6-7,6	1,5-6,0
Stearico C18:0	0,5-5,0	1,9-4,4	2,4-5,4	1,0-3,3	2,7-6,5	0,5-3,1
Oleico C18:1	55,0-83,0	36,4-67,1	17,7-26,1	20,0-42,2	14,0-39,4	8,0-60,0
Linoleico C18:2	3,5-21,0	14,0-43,0	49,8-57,1	39,4-62,5	48,3-74,0	11,0-23,0
Linolenico C18:3	0,0-1,0	0,0-0,1	5,5-9,5	0,5-1,5	0,0-0,2	5,0-13,0
Arachico C20:0	0,0-0,6	1,1-1,7	0,1-0,6	0,3-0,6	0,2-0,4	0,0-3,0
Eicosenoico C20:1	0,0-0,4	0,7-1,7	0,0-0,3	0,2-0,4	0,0-0,2	3,0-15,0
Behenico C22:0	0,0-0,2	2,1-4,4	0,3-0,7	0,0-0,5	0,5-1,3	0,0-2,0
Erucico C22:1	-	0,0-0,3	0,0-0,3	0,0-0,1	0,0-0,2	>2,0-60,0
Lignocerico C24:0	0,0-0,2	1,1-2,2	0,0-0,4	0,0-0,4	0,2-0,3	0,0-2,0
Tetracosenoico C24:1	-	0,0-0,3	-	-	-	0,0-3,0
T. Solidificazione (°C)	-6	3	-10 a -16	-10 a -20	-17	-10

Acido Grasso (%)	Olio di Cocco	Olio di Palma	Olio di Palmisto	Olio di Cotone	Olio di Vinaccioli	Burro
Capronico C6:0	0,0-0,6	-	0,0-0,8	-	-	1,0-5,0
Caprilico C8:0	4,6-9,4	-	2,4-6,2	-	-	2,0-4,0
Caprico C10:0	5,5-7,8	-	2,6-5,0	-	-	2,0-3,0
Laurico C12:0	45,1-50,3	0,0-0,4	41,0-55,0	0,0-0,2	0,0-0,5	3,0-3,2
Miristico C14:0	16,8-20,6	0,5-2,0	14,0-18,0	0,6-1,0	0,0-0,3	10,0-11,5
Palmitico C16:0	7,7-10,2	41,0-47,5	6,5-10,0	21,4-26,4	5,5-11	25,0-30,0
Stearico C18:0	2,3-3,5	3,5-6,0	1,3-3,0	2,1-3,3	3,0-6,0	10,0-10,5
Oleico C18:1	5,4-8,1	36,0-44,0	12,0-19,0	14,7-21,7	12,0-28,0	20,0-27,0
Linoleico C18:2	1,0-2,1	6,5-12,0	1,0-3,5	46,7-58,2	58,0-78,0	3,0-3,5
Linolenico C18:3	0,0-0,2	0,0-0,5	-	0,0-0,4	0,0-1,0	0,4-2,0
Arachico C20:0	0,0-0,2	0,0-1,1	-	0,2-0,5	0,0-1,0	0,2-0,3
Eicosenoico C20:1	0,0-0,2	-	-	0,0-0,1	-	-
Behenico C22:0	-	-	-	0,0-0,6	0,0-0,3	-
Erucico C22:1	-	-	-	0,0-0,3	-	-
Lignocerico C24:0	-	-	-	0,0-0,1	0,0-0,1	-
Tetracosenoico C24:1	-	-	-	-	-	-
T. Solidificazione (°C)	14 a 22	35 a 42	20 a 25	2 a 4	-18	20 a 23

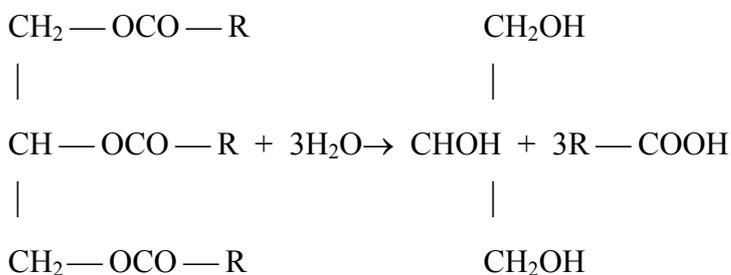
Tabella 1 (a) e (b). Composizione media e temperatura di solidificazione dei principali oli e grassi (ROSSEL J. B., 2001).

## 4.2 Le Alterazioni dell'olio di oliva

L'olio di oliva può subire delle alterazioni che consistono in modificazioni di carattere chimico, dovute a reazioni idrolitiche ed ossidative che portano all'irrancidimento del prodotto. Queste alterazioni possono avere luogo durante tutto il processo tecnologico di estrazione dell'olio dalla drupa e protrarsi durante la conservazione dell'olio estratto.

### 4.2.1 L'idrolisi enzimatica

Rappresenta la prima fase del processo di deterioramento della qualità dell'olio; è di origine enzimatica, poiché causata dalla lipasi. Questo enzima è presente nelle cellule oleaginose del mesocarpo della drupa e rimane inattivo fino a quando le cellule sono intatte ed integre; non appena si ha la rottura di queste, vi è la fuoriuscita dell'enzima che si trova a stretto contatto con i trigliceridi e l'acqua di costituzione della drupa. L'inizio della sua azione determina la rottura del trigliceride in presenza dell'acqua secondo il seguente schema:



L'azione della lipasi causa il distacco degli acidi grassi dal trigliceride, con un meccanismo che prevede l'allontanamento di un solo acido grasso per volta, questi composti una volta staccati causano un aumento dell'acidità libera dell'olio.

Nelle olive raccattate o abbacchiate, in quelle raccolte con mezzi meccanici (scuotitori) o attaccate dalla mosca dell'olivo (*Dacus olea* L.), l'attività della lipasi è più elevata poiché la rottura o le ammaccature delle drupe consentono la fuoriuscita dell'enzima, venendosi così a creare le condizioni ottimali per l'attività di questo enzima. Anche il sistema di oleificazione influisce sul cosiddetto irrancidimento idrolitico; infatti a parità di tutti gli altri parametri;

esso è maggiore quanto più dura il processo di estrazione, giacché la lipasi, ormai fuori dalle cellule oleaginose, può esercitare l'attività sui trigliceridi per un tempo superiore.

#### **4.2.2 Irrancidimento ossidativo**

E' un fenomeno molto complesso e non ancora chimicamente definito in tutti i suoi aspetti; si basa sulla combinazione dell'ossigeno con la molecola degli acidi grassi mediante un processo autocatalitico, che per questo prende il nome di autossidazione.

L'autossidazione dell'olio d'oliva può aver luogo a partire dall'estrazione dell'olio dalla drupa, ma si sviluppa prevalentemente durante i trattamenti e la conservazione del prodotto, determinando la produzione di odori e sapori sgradevoli detti "sapori e odori di rancido". Si elencano di seguito i principali fattori che favoriscono l'ossidazione della matrice lipidica e che devono pertanto essere controllati per contenere l'instaurarsi di tale modificazione indesiderata:

a) *Presenza dell'ossigeno*: è ovviamente condizione indispensabile per questa alterazione, visto che essa è una reazione di ossidazione. L'ossigeno, insieme all'aria che lo contiene, può arrivare all'olio in vari modi: è in parte disciolto nell'olio e può essere presente nello spazio di testa del contenitore, oppure può arrivare (in tempi lunghi) all'olio, solubilizzandosi in esso, attraverso le pareti del contenitore. Il materiale che offre maggior protezione contro l'ingresso dell'ossigeno nell'olio è il metallo. L'olio disaerato prima del confezionamento offre maggior garanzia di stabilità rispetto ad un olio confezionato in presenza d'aria.

b) *Grado di "insaturazione" dell'olio*: influisce notevolmente sul fenomeno di ossidazione; questa risulta tanto più spinta quanto più elevato è il contenuto di acidi grassi insaturi dell'olio.

c) *Presenza di metalli*: in particolare quelli con valenza maggiore di uno, favoriscono la reazione di ossidazione; infatti i metalli (Fe, Cu, Co, Mn, Ni), anche se presenti in tracce, agiscono da catalizzatori, attraverso complessi meccanismi di trasporto di cariche. Una concentrazione, anche se dell'ordine di ppb, è sempre presente nell'olio di oliva, sia perché i metalli sono presenti in varie forme nell'oliva, sia perché possono essere assunti nelle varie fasi di oleificazione attraverso il contatto con le attrezzature utilizzate nella lavorazione.

d) *Luce*: è un altro importante fattore che influenza l'autossidazione. Alcuni composti minori dell'olio (come le clorofille) possono essere eccitati elettronicamente in seguito all'assorbimento di luce. Conseguentemente, la molecola eccitata è in grado di trasferire la sua energia in eccesso ad una molecola di ossigeno, aumentandone la reattività.

e) *Temperatura*: questo fattore ha una duplice importanza nei fenomeni ossidativi. Da una parte costituisce un parametro fondamentale della termodinamica che facilita tutte le trasformazioni chimiche caratterizzate da un aumento dell'entropia del sistema (tra queste, la maggior parte dei fenomeni degradativi quali l'ossidazione).

D'altra parte la temperatura agisce come principale variabile cinetica secondo l'equazione di Arrhenius:

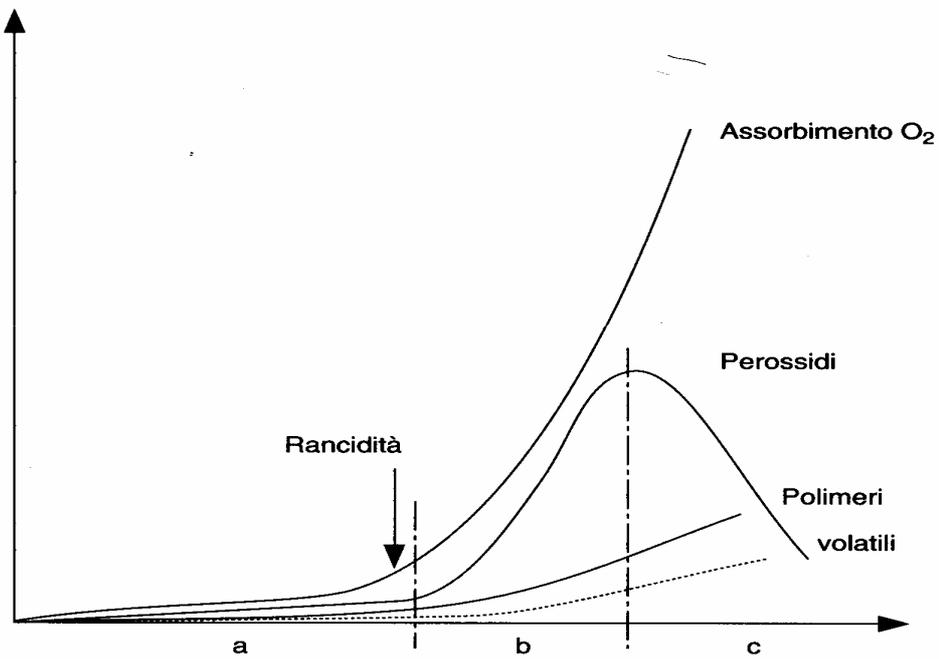
$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$$

laddove  $k$  rappresenta la costante di velocità delle reazioni chimiche,  $E_a$  è l'energia di attivazione relativa.

Secondo questa equazione si osserva chiaramente che, all'aumentare della temperatura, la costante di velocità della reazione aumenta di conseguenza. Il ruolo catalitico della temperatura è comune a tutte le reazioni.

L'irrancidimento ossidativo viene schematicamente suddiviso in tre fasi:

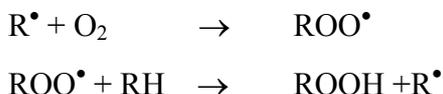
fase iniziale o primaria chiamata *di induzione*, fase secondaria detta *di propagazione*, ed in ultimo, la fase finale chiamata impropriamente *di terminazione*; impropriamente poiché i prodotti finali sono comunque sottoposti ad una continua trasformazione autocatalitica .



**Figura 1** Andamento dei principali parametri relativi all'ossidazione delle sostanze grasse: in ascissa il tempo, in ordinata l'incremento dei singoli sviluppi. Caratterizzazione dei vari periodi: a) induzione (iniziazione); b) propagazione; c) terminazione. Fonte: Capella et al., 1997

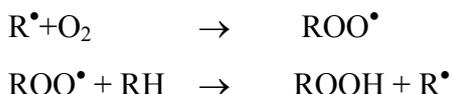
Di seguito sono riportate le fasi dell'irrancidimento ossidativo:

#### INIZIAZIONE

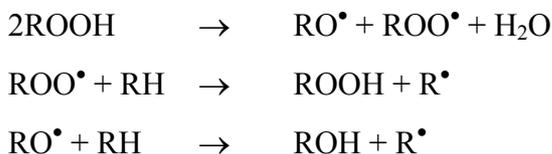


#### PROPAGAZIONE:

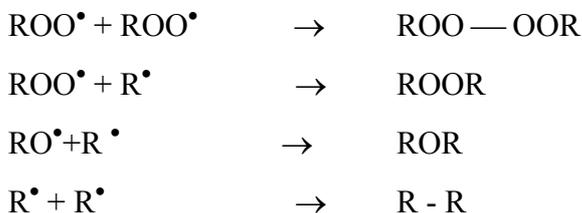
##### a) FASE MONOMOLECOLARE



##### b) FASE BIMOLECOLARE:



#### TERMINAZIONE



R= catena idrocarburica dell'acido grasso

Nel periodo di induzione si ha la formazione degli idroperossidi (ROOH) che costituiscono i prodotti primari dell'autoossidazione. Questa prima fase fornisce un elemento valido per valutare il grado di resistenza all'ossidazione dell'olio; normalmente si ricorre alla determinazione degli idroperossidi, tramite titolazioni e/o test spettrofotometrici. Questa fase di innesco è poco chiara poiché l'attacco diretto dell'ossigeno atmosferico alla catena di un acido grasso insaturo è dal punto di vista termodinamico improbabile, poiché questa reazione richiede un'elevata energia di attivazione (da 35 a 65 kcal/mole). La formazione di un idroperossido è quindi dovuta all'intervento di qualche fattore esterno. Secondo molti studi effettuati in merito, questo fattore esterno è rappresentato dall'ossigeno allo stato di "singoletto" che si può formare

attraverso una reazione fotochimica in presenza di un “sensibilizzatore”, quale può essere la clorofilla nel caso dell’olio d’oliva. L’ossigeno allo stato di singoletto si forma quando la molecola nello stato di tripletto assorbe energia a sufficienza ed uno degli elettroni di valenza è spostato ad un livello energetico superiore, dando origine ad una specie eccitata ed instabile, che reagisce con maggiore velocità.

Dopo la formazione e l’accumulo degli idroperossidi, questi cominciano ad essere demoliti dando origine ad una reazione a catena nella fase di propagazione. In questa fase si formano i prodotti secondari, responsabili dell’odore e del gusto sgradevoli tipici dell’olio rancido (off-flavours).

I prodotti secondari hanno una bassissima soglia di percettibilità olfattiva e sono rappresentati soprattutto da aldeidi sature ed insature, chetoni, alcoli volatili, idrocarburi, composti ossigenati ciclici, etc.

La decomposizione degli idroperossidi avviene a due velocità; ad una prima fase lenta (propagazione monomolecolare), ne segue una seconda più veloce (propagazione bimolecolare) durante la quale da ogni molecola neutra si ottengono due radicali.

La reazione prosegue a cascata fino all’esaurimento dell’ossigeno nel sistema, quando si ha l’unione di due radicali che reagiscono tra loro per formare molecole dimeriche o polimeriche (fase di terminazione, conosciuta anche come fase di “spegnimento” o “quenching”).

### **4.2.3 Gli antiossidanti**

Gli antiossidanti agiscono anche a concentrazioni molto basse e sono molto importanti per rallentare l’insorgenza dei processi di ossidazione [1]. A seconda della fase di ossidazione nella quale intervengono sono classificati in tre gruppi:

1) *Antiossidanti di tipo I*: inattivano i radicali liberi donando loro idrogeno e trasformandosi essi stessi in radicali, che però risultano molto più stabili per effetto di delocalizzazione dell’elettrone spaiato nell’anello aromatico; l’effetto atteso consiste nell’aumento del periodo di induzione a fronte di una diminuzione della velocità delle reazioni radicaliche in proporzione alla concentrazione dell’antiossidante usato. Se l’antiossidante viene aggiunto ad una matrice già ossidata non risulta più in grado di ostacolare il progredire della degradazione ossidativa [1]. I tocoferoli ed in generale tutte le sostanze a struttura fenolica sono antiossidanti presenti nell’olio vergine di oliva in grado di esplicare questo tipo di protezione.

2) *Antiossidanti del tipo II*: agiscono prima della fase di propagazione, influenzando sulla velocità di iniziazione e regolando le fonti dei radicali liberi. Sono per lo più agenti chelanti che agiscono sui metalli, catalizzatori delle reazioni di ossidazione, inattivandoli: tra questi agenti c'è anche l'acido citrico. Una caratteristica negativa di questi antiossidanti è la scarsa efficacia ad alte temperature.

3) *Antiossidanti del tipo III*: è un termine improprio, perché non agiscono sulle reazioni di ossidazione ma sui fattori tecnologici e ambientali che le favoriscono, come la temperatura, l'umidità, la luce, la disponibilità di ossigeno.

### **4.3 Composizione chimica dell'olio extravergine di oliva**

Prima di entrare nel merito della composizione chimica dell'olio extravergine di oliva, è utile fornire alcune elementari indicazioni sui grassi o lipidi. La caratteristica principale dei lipidi è quella di risultare insolubili in acqua e solubili in solventi organici non polari (etere di etilico, *n*-esano, cloroformio ecc..). I lipidi possono essere classificati in lipidi semplici a cui appartengono i gliceridi (esteri degli acidi grassi con la glicerina), ceridi (esteri degli acidi grassi con alcoli superiori), steridi (esteri degli acidi grassi con gli steroli) e in lipidi complessi a cui appartengono i fosfolipidi ed i glicolipidi.

In gran parte la frazione lipidica è costituita dal gruppo dei gliceridi detti anche acilgliceroli, ovvero esteri risultanti dall'esterificazione delle funzioni alcoliche della glicerina con gli acidi grassi.

I gliceridi si definiscono in:

- Trigliceridi: tre acidi grassi legati alla glicerina
- Digliceridi: due gli acidi grassi legati alla glicerina
- Monogliceridi: un solo acido grasso legato alla glicerina.

Gli acido grassi costituiscono quindi la base per la formazione dei trigliceridi che rappresentano il 95%-97% della frazione lipidica dell'olio di oliva che a sua volta rappresenta il 98-99% della composizione totale dell'olio da oliva.

Gliceridi, ceridi, steridi, fosfolipidi e glicolipidi rappresentano la cosiddetta frazione saponificabile, ovvero la frazione che per idrolisi alcalina libera saponi, cioè i sali alcalini degli acidi grassi.

#### 4.3.1 Costituenti principali: acidi grassi e gliceridi

Come appena detto i costituenti principali dell'olio sono i trigliceridi, solitamente in percentuale superiore al 95% [6], in piccola percentuale sono presenti anche i digliceridi, i monogliceridi e gli acidi grassi liberi. Gli acidi grassi sono costituiti da catene di atomi di carbonio ed idrogeno, con una terminazione carbossilica che fornisce la funzione acida. Gli atomi di carbonio, lungo la catena degli acidi grassi, possono essere uniti tra loro da legami singoli ed in questo caso vanno a costituire i cosiddetti acidi grassi saturi tra cui i principali nell'olio d'oliva sono l'acido palmitico (7-17%), l'acido stearico (1-4%) e l'acido miristico (0,1%) [1]. Quando invece nella catena è presente un doppio legame o più doppi legami gli acidi grassi si definiscono rispettivamente monoinsaturi e polinsaturi. In natura, ed in particolar modo nell'olio d'oliva, sono diffusi gli acidi grassi insaturi con configurazione cis, mentre il legame trans può essere prodotto a seguito di modificazioni causate da trattamenti chimico-fisici quali quelli applicati durante il processo di raffinazione degli oli. I principali acidi grassi insaturi presenti nell'olio d'oliva sono l'acido oleico e l'acido linoleico. La presenza di doppi legami rende gli acidi grassi sensibili alle reazioni di autossidazione, che sono alla base del deterioramento ossidativo dell'olio d'oliva. Gli acidi grassi insaturi hanno un ruolo importantissimo nell'alimentazione, infatti l'acido linoleico e linolenico sono acidi grassi essenziali (rispettivamente precursori degli acidi grassi  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3), ovvero essi devono essere introdotti con l'alimentazione in quanto l'organismo umano non è in grado di sintetizzarli. La composizione degli acidi grassi in un olio d'oliva è variabile entro certi limiti. E' determinata soprattutto dalla cultivar e dalla temperatura della zona di coltivazione della pianta; infatti, allontanandosi dall'equatore e aumentando l'altitudine, a parità di cultivar, il contenuto in acidi grassi insaturi aumenta. Anche il grado di maturazione influisce sulla percentuale degli acidi grassi; più precisamente, con la maturazione aumenta la percentuale relativa di acido oleico, a discapito dell'acido palmitico, mentre durante lo stadio di sovraturazione aumenta l'acido linoleico a scapito dell'oleico [7-8]. Infine, è bene ricordare che il contenuto percentuale degli acidi grassi liberi viene utilizzato come indice per la classificazione merceologica degli oli da olive [9-10].

I gliceridi sono costituiti in media per il 90-95% da trigliceridi, per il 2-10% da digliceridi e per lo 0,2-4% da monogliceridi [11]. A seconda del tipo di acidi grassi che esterificano le tre posizioni alcoliche della glicerina, i trigliceridi possono essere distinti

in semplici, quando l'esterificazione avviene con lo stesso acido grasso ed in trigliceridi misti quando avviene con acidi grassi diversi.

Dall'idrolisi dei trigliceridi, in genere si formano 1,3-digliceridi, mentre i digliceridi che provengono dalla biosintesi sono del tipo 1,2-digliceridi; è possibile inoltre una trasposizione dalle forme 1,2 alle forme 1,3 in seguito all'azione di acidi, alcali, calore, luce ed ossigeno. Questo effetto di isomerizzazione è importante ai fini della valutazione della freschezza degli oli extravergini d'oliva. Le quantità di digliceridi presenti negli oli d'oliva a bassa acidità sono in genere comprese tra il 2 ed il 3% [1] e si tratta prevalentemente di 1,2-digliceridi. Il contenuto di monogliceridi e digliceridi di un olio varia a seconda della tipologia: ad esempio l'olio d'oliva lampante può contenere il 5-10% di digliceridi e l'1,5-4% di monogliceridi, mentre l'olio di sansa addirittura l'8-20% di digliceridi e le stesse quantità di monogliceridi dell'olio di oliva lampante [1].

I trigliceridi presenti in quantità rilevanti nell'olio d'oliva sono la trioleina (40-60%), la palmitoil-diolenina (18-28%), oleil-linoleil-oleina (5-11%), stearil-diolenina (5,5-9%), palmitoil-oleil-linoleina (2,5-6%) e la dipalmitoil-oleina (1,5-3%) [11-12].

#### **4.3.2 Costituenti secondari**

I costituenti secondari dell'olio d'oliva sono presenti in modeste quantità, variabili dallo 0,5% al 2% [6] e sono rappresentati dalla frazione di natura non gliceridica. Questi componenti presentano un grande interesse da un punto di vista merceologico, analitico e nutrizionale. La quantità di questi costituenti minori varia in funzione di diversi fattori ed in particolar modo essa è influenzata dal periodo di raccolta delle olive. Un ritardo nella raccolta può ad esempio provocare una diminuzione del contenuto di idrocarburi, un aumento del tenore dei tocoferoli e una diminuzione del contenuto di sostanze coloranti. Possiamo dividere questi componenti secondari in costituenti saponificabili (fosfolipidi, cere e sfingolipidi), ed in costituenti insaponificabili (idrocarburi, tocoferoli e tocotrienoli, alcoli alifatici superiori, steroli, metilsteroli, alcoli diterpenici-e triterpenici, vitamine, pigmenti ed ubiquinoni).

I fosfolipidi presenti nell'olio d'oliva sono rappresentati dalla fosfatidilcolina e dalla fosfatidiletanolamina; chimicamente sono dei derivati dell'acido glicerofosforico, presenti in quantità variabili, ma mai elevate. Questi composti sono assenti negli oli raffinati poiché vengono eliminati durante il processo di raffinazione. Le cere sono delle

miscele complesse di esteri di acidi grassi a lunga catena con gli alcoli superiori e costituiscono il rivestimento protettivo della drupa . Infine, altri composti minori saponificabili sono gli sfingolipidi, ammidi di acidi grassi con basi a lunga catena.

Gli alcoli alifatici superiori si trovano nell'olio d'oliva prevalentemente esterificati con acidi grassi, e formano le cere che ricoprono il frutto; quelli presenti in maggiore quantità sono il docosanolo, il tetracosanolo e l'esacosanolo [1]. Al gruppo degli alcoli terpenici; appartengono diversi composti, caratterizzati da strutture chimiche complesse, simili alle strutture degli steroli. Vi sono nell'olio d'oliva alcoli diterpenici, triterpenici e dialcoli triterpenici. Tra i triterpenici il più importante è il cicloartenolo, la cui azione favorisce l'escrezione fecale del colesterolo, in quanto provoca un aumento della sintesi degli acidi biliari. I dialcoli diterpenici presenti nell'olio d'oliva sono: l'eritrodiolo e l'uvaolo; questi composti provengono essenzialmente dalla buccia, ed infatti il loro tenore dipende dal sistema di estrazione utilizzato.

Gli idrocarburi sono componenti minori insaponificabili che rappresentano un gruppo eterogeneo di composti saturi ed insaturi presenti nelle sostanze grasse. In particolare modo, nell'olio extravergine d'oliva costituiscono oltre il 50% dell'insaponificabile [1]. Tra gli idrocarburi saturi il nonacosano è il predominante, mentre tra gli insaturi il componente più presente è lo squalene, terpene a 30 atomi di carbonio con sei doppi legami [1]. Questo composto è molto importante dal punto di vista biologico poiché è il precursore biosintetico di tutti gli steroli.

Altri componenti minori presenti nell'olio d'oliva sono i pigmenti. Questi possono essere suddivisi in due categorie: i carotenoidi ( $\beta$ -carotene e luteina) e le clorofille (clorofille e feofitine), responsabili i primi delle tonalità gialle ed i secondi di quelle verdi. Il  $\beta$ -carotene dal punto di vista nutrizionale è molto importante poiché a livello della mucosa intestinale viene trasformato in trans-retinolo, ovvero nella vitamina A, ed essendo precursore di questa, svolge sia pure indirettamente un'azione stimolante sulla crescita ed un'attività protettiva sui lobi oculari.

Mentre i carotenoidi svolgono un'azione antiossidante neutralizzando l'ossigeno singoletto, le clorofille esplicano un'azione pro-ossidante, catalizzando in presenza di luce, la produzione di ossigeno allo stato di singoletto. E' quindi essenziale per la stabilità dell'olio nei confronti dell'ossidazione, un giusto rapporto tra pigmenti clorofilliani e carotenoidi.

Altre sostanze presenti nell'olio d'oliva, anche se in tracce, sono gli ubichinoni. Questi sono chimicamente costituiti da un nucleo 2,3-dimetossi-5-metilbenzochinone, con una

catena laterale (in posizione 6) formata da 6 a 10 unità isopreniche. Un ubichinone presente nell'olio d'oliva è il coenzima Q<sub>10</sub>, che svolge un ruolo metabolico fondamentale, funzionando da trasportatore di elettroni. E' presente in quantità variabili da 0 a 40 ppm, in funzione dell'epoca di raccolta, del periodo di sosta delle olive prima della frangitura e del periodo di conservazione. La raffinazione favorisce l'eliminazione degli ubichinoni.

Gli acidi triterpenici sono dei composti presenti sulla superficie dell'epicarpo della drupa. Questi componenti sono insieme ai dialcoli triterpenici caratteristici dell'epicarpo, dal momento che essi risultano assenti nell'estratto lipidico del mesocarpo e dell'endocarpo. Gli acidi triterpenici conosciuti sono: acido oleanolico, acido ursolico, acido maslinico. Molto probabilmente essi svolgono una funzione di stabilizzazione delle proprietà fisiche della drupa ed un ruolo nell'attività biologica esercitata nei confronti di eventuali parassiti.

#### **4.3.2.1 La frazione sterolica**

E' ben noto come negli oli di oliva siano presenti diversi composti caratterizzati da interessanti proprietà chimiche e nutrizionali, come gli antiossidanti ed i fitosteroli, steroli tipici del mondo vegetale. Questi ultimi rappresentano la frazione dell'insaponificabile quantitativamente più importante dopo gli idrocarburi. Sono dei composti ad alto peso molecolare, contenenti una funzione alcolica, caratterizzati dalla presenza nella loro molecola del sistema ad anelli del ciclopentanperidrofenantrene; essi vengono sintetizzati in natura dall' acetil-CoA via squalene. I fitosteroli sono presenti nell'olio d'oliva in una concentrazione variabile tra lo 0,2% e lo 0,5 %, in parte liberi ed in parte esterificati con gli acidi grassi [1]. La composizione quali-quantitativa degli steroli di un olio d'oliva è una delle caratteristiche analitiche più importanti nella valutazione della sua genuinità; infatti la frazione sterolica è significativamente diversa in funzione dell'origine botanica, e perciò viene utilizzata per distinguere gli oli tra di loro e le loro miscele.

Il principale sterolo nell'olio d'oliva è il  $\beta$ -sitosterolo, la presenza di questo componente in quantità inferiore al 90% è un indice approssimativo dell'aggiunta di qualsiasi altro olio all'olio di oliva. Il  $\beta$ -sitosterolo è una sostanza importante dal punto di vista della salute, poiché si oppone all'assorbimento intestinale del colesterolo. Gli altri fitosteroli

presenti in quantità rilevanti nell'olio d'oliva sono: il campesterolo, lo stigmasterolo ed il  $\Delta 5$ -avenasterolo.

Negli ultimi anni gli steroli vegetali stanno destando interesse per la loro importanza nell'alimentazione umana. E' infatti stato provato che queste sostanze riducono il contenuto delle lipoproteine a bassa densità (colesterolo LDL) nel sangue. Infatti, gli steroli sono risultati in grado di diminuire l'assorbimento del colesterolo endogeno ed esogeno nell'intestino, aumentandone l'escrezione fecale [13]. E' stato stimato che l'assunzione giornaliera degli steroli con la dieta dovrebbe essere compresa tra 250 e 500 mg [14].

I metilsteroli, come gli steroli, sono derivati del ciclopentanperidrofenantrene, quindi strutturalmente sono molto simili ad essi possedendo però un metile in posizione 4.

I metil steroli sono presenti nell'olio d'oliva in quantità molto basse (circa 150 ppm), rispetto agli steroli (1500 ppm) [1]. Sono stati identificati alcuni componenti di questa classe (mediante spettrometria di massa), ed è stato constatato come essi differiscano tra di loro soprattutto per la struttura della catena laterale, per la presenza dell'anello del ciclopropano e per la posizione occupata dal doppio legame. Si possono elencare tra i metilsteroli identificati: l'obtusifoliolo, il gramisterolo, il citrostadienolo, l'isocitrostadienolo ed il 31-norciclartanolo.

Con la raffinazione o l'idrogenazione degli oli, similamente a come avviene per gli alcoli triterpenici, si ha un'isomerizzazione in posizione 24 dei metilsteroli che può essere utilizzata per scoprire eventuali aggiunte di oli raffinati agli oli venduti come oli vergini d'oliva.

Mentre in letteratura si trovano numerosi lavori relativi al potere antiossidante di una serie di composti presenti nell'olio vergine di oliva come polifenoli, carotenoidi e tocoferoli [15-18] e ricerche che dimostrano invece come altri composti (trigliceridi, acidi grassi liberi, clorofille e metalli) possano promuovere l'ossidazione dei lipidi [19-21]. per quanto riguarda il potere antiossidante degli steroli e dei 4-metil steroli vi sono poche informazioni [13]. Alcuni studi hanno dimostrato come gli alcoli triterpenici, gli idrocarburi (squalene) ed alcuni steroli possano ritardare la degradazione di oli sottoposti ad un prolungato surriscaldamento [22-24] hanno valutato il contenuto dell'acido linoleico ed il valore dei perossidi di un olio di soia addizionato di avenasterolo e scaldato ad alte temperature, confermando l'attività antiossidante dell'avenasterolo. Altri lavori hanno riportato come il  $\delta$ -avenasterolo, il fucosterolo ed il citrostadienolo possano agire da antiossidanti in oli mantenuti alla temperatura di

180°, mentre lo stigmasterolo ed il colesterolo non hanno mostrato alcuna attività antiossidante. In alcuni casi è stato osservato che un più alto contenuto di steroli con un gruppo etilenico in posizione 24 della catena laterale ha portato ad un aumento dell'attività antiossidante [25]. Il  $\beta$ -sitosterolo ed il campesterolo non hanno mostrato quest'attività. È stato ipotizzato che il primo gruppo di steroli sia in grado di reagire più rapidamente con i radicali liberi, portando alla formazione di composti radicalici più stabili. Tuttavia deve essere preso in considerazione che molti degli studi citati sono stati effettuati con quantitativi di steroli molto più elevati di quelli riscontrabili negli oli vegetali [13].

È ben noto come, a causa della loro struttura chimica, i fitosteroli siano suscettibili all'ossidazione, portando alla formazione dei cosiddetti ossisteroli; questo fenomeno è stato studiato in sistemi modello, in oli vegetali ed in prodotti alimentari [26-29].

Il metodo più usato per la separazione della classe degli steroli è la Thin Layer Chromatography [30]. Questo metodo di separazione degli steroli, presenta però degli svantaggi, poiché si ha un recupero basso ed i tempi di analisi sono molto lunghi. Dutta e i co-autori [27], hanno confrontato due diversi metodi per la separazione degli steroli, nell'olio di nocciola e nell'olio di oliva. In questo lavoro del 2006, la separazione della classe degli steroli mediante TLC è stata confrontata con quella attraverso il metodo Solid Phase Extraction (SPE). Quest'ultimo metodo è stato sviluppato, caratterizzandolo con una graduale eluizione attraverso l'aumento della polarità della miscela dei solventi utilizzata. Dai risultati ottenuti è emerso come il metodo SPE, abbia permesso dei recuperi molto più elevati per le diverse classi steroliche, rispetto al metodo convenzionale mediante TLC.

#### **4.3.2.2 La componente antiossidante degli oli di oliva: composti a struttura fenolica**

I fenoli sono gli antiossidanti naturali presenti in maggior quantità nell'olio di oliva. Sono comunque presenti anche altri composti antiossidanti quali tocoferoli e caroteni. [31].

Nel 1906 Canzoneri [32] fu il primo ricercatore a dimostrare la presenza dei composti fenolici nell'olio extravergine di oliva, (VOO) e solo successivamente, quasi 40 anni dopo, fu impostato il primo studio quali-quantitativo su queste sostanze [31, 33,34]. Queste molecole sono caratteristiche dell'olio non raffinato ed apprezzabili per il loro

apporto funzionale dal punto di vista biologico e nutrizionale[2, 35-38]. I composti fenolici e polifenolici presenti nell'VOO, detti anche biofenoli [39] sono comunemente distinti in cinque classi principali: tra i composti a struttura più semplice si considerano gli alcoli feniletilici, i cui rappresentanti peculiari sono idrossitirosolo e tirosolo e gli acidi fenolici, derivati sia dell'acido benzoico (es. acido vanillico) che dell'acido cinnamico (es. gli acidi caffeico, ferulico e p-cumarico); tra le molecole a struttura più complessa vi sono i flavoni luteolina ed apigenina, i secoiridoidi che derivano dall'oleuropeina e ligstroside aglicone ed i lignani, di più recente identificazione (es. pinoresinolo ed 1-acetossipinoresinolo).

I secoiridoidi sono caratteristici sia dell'oliva che dell'olio vergine di oliva e dei suoi sottoprodotti, ma mentre nella drupa e nelle acque di vegetazione sono presenti in elevata quantità e principalmente in forma glicosidica, nell'olio si ritrovano in minore concentrazione e quasi esclusivamente in forma agliconica; nell'olio quindi passa solo quella piccola frazione di molecole che, avendo perso a seguito di un processo di idrolisi ( $\beta$ -glucosidasi) lo zucchero originariamente legato, risultano meno polari e quindi parzialmente affini all'olio. Tale trasferimento è in relazione al coefficiente di ripartizione di ogni molecola fenolica tra la frazione acquosa e quella lipidica; inoltre, è importante specificare che le molecole fenoliche, proprio in virtù della loro struttura chimica, non si trovano solubilizzate nell'olio, ma risultano in fase di micro-dispersione o micro-emulsione insieme ad una piccola quantità di acqua (1000-2000 ppm). Molteplici studi hanno dimostrato la più elevata attività antiossidante delle molecole aventi un gruppo catecolico (*o*-difenoli) rispetto a quelle con un solo ossidrile sull'anello fenolico, in relazione alla maggiore capacità di stabilizzazione del rispettivo radicale [37]

A causa della rottura delle catene e dei meccanismi di "radical scavenging" queste molecole giocano un ruolo importante nel prolungamento della shelf life dell'VOO, rallentando il processo di ossidazione del prodotto.

La frazione fenolica di un olio di oliva dipende da molteplici fattori, quali: cultivar [41-47], metodo di coltivazione, [48-50], grado di maturazione della drupa [37, 42,44,46,51,52] , tecnologia di estrazione utilizzata [17, 52-56], nonché modalità di conservazione dell'olio.

Fondamentale è la valutazione dei parametri tecnologici al fine di massimizzare il contenuto fenolico dell'VOO. E' da sottolineare come la modificazione e la

degradazione della frazione fenolica possano sopraggiungere durante la separazione dell'olio dalla fase acquosa, alterando così la shelf life del prodotto [37].

Molto importante è l'azione dei fenoli da un punto di vista salutistico, in virtù della loro attività antiossidante. Diversi studi effettuati ne riportano le proprietà vasoprotettive, antinfiammatorie, anticoagulanti, antitumorali ed antiallergeniche [57,58].

Grazie alla capacità antiradicalica, fenoli e polifenoli, giocano un ruolo protettivo fondamentale nella difesa dell'organismo tenendo sotto controllo la formazione e l'azione di alcune specie chimiche dell'ossigeno denominate ROS (Reactive Oxygen Species) altamente aggressive nei confronti delle principali macromolecole dell'organismo quali lipidi, glucidi, protidi e DNA. Inibendo i ROS, gli antiossidanti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva contribuiscono a contrastare il cosiddetto "stress ossidativo" [58-59]. I ROS, tra cui il radicale superossido  $O_2^{\bullet}$ , il radicale idrossilico  $OH^{\bullet}$ , il perossido d'idrogeno  $H_2O_2$ , il radicale perossilico  $ROO^{\bullet}$  e quello alcossilico  $RO^{\bullet}$ , sono normali prodotti di scarto dei processi metabolici dell'organismo, ad esempio si formano all'interno delle cellule quando l'ossigeno viene utilizzato per produrre energia. Sono molecole fortemente instabili e questa instabilità determina la sottrazione di un elettrone dalle molecole con le quali vengono a contatto, che a loro volta cedendolo diventano instabili innescando un meccanismo di instabilità a "catena". L'azione deleteria dei radicali liberi quando indirizzata sui lipidi che formano le membrane cellulari ne causa l'ossidazione e quindi l'alterazione della fluidità della membrana, quando rivolta ad enzimi, proteine e DNA, (acido desossiribonucleico) diventa responsabile anche di alterazioni delle informazioni genetiche. L'azione continua dei radicali liberi, si estrinseca nel precoce invecchiamento delle cellule e nel favorire l'insorgere di varie patologie gravi, quali le malattie aterosclerotiche, i tumori del seno, della prostata, del colon e della cute ed anche diabete, sclerosi multipla, artrite, reumatoide, enfisema polmonare, cataratta, morbo di Parkinson e Alzheimer. Le reazioni e i fenomeni che ne derivano possono almeno in parte essere inibiti, prevenuti, ridimensionati, mediante l'assunzione con l'alimentazione di sostanze antiossidanti come fenoli e polifenoli, di cui sono ricchi gli alimenti di origine vegetale e l'olio extravergine d'oliva tra i grassi ed oli da condimento.

In un recente studio [46] è stata riportata l'azione antinfiammatoria esercitata da un composto antiossidante presente nell'olio extravergine di oliva, chiamato oleocantale. In particolare, questi ricercatori hanno messo in evidenza come l'(-) – oleocanthal, derivato del ligstroside aglicone, sia in grado di esplicare un'azione antinfiammatoria

del tutto simile simile all'ibuprofene, uno dei più comuni antinfiammatori non steroidei. Inoltre, la presenza di questa molecola è stata correlata con la sensazione di amaro percepibile tipicamente negli oli vergini di oliva.

Un aspetto molto importante per l'olio vergine di oliva è rappresentato dalla dotazione in sostanze a struttura fenolica in relazione al loro fondamentale contributo alle sue peculiari proprietà organolettiche; non bisogna infatti dimenticare che l'intensità degli attributi positivi percepibili al gusto quali amaro e piccante sono stati correlati positivamente alla presenza di specifiche molecole fenoliche. [62] anche se non è ancora del tutto chiaro il contributo che ogni singolo composto fenolico è in grado di apportare [21]. Nel 2001 Garcia e altri ricercatori [63] hanno evidenziato una correlazione fra la concentrazione dei derivati dell'oleuropeina e l'intensità dell'amaro, mentre nello stesso anno Tovar et al. [48], rilevavano un rapporto diretto tra la presenza nell'olio di un secoiridoide derivato dal ligstroside e l'intensità delle percezioni di amaro e piccante. Altre ricerche, hanno suggerito una relazione sia tra i secoiridoidi derivati dell'oleuropeina e l'attributo di amaro [63-65], che tra l'amaro ed uno dei principali derivati del ligstroside quale il già citato oleocantale conosciuto anche come decarbossimetil-ligstroside aglicone [65]. Per stabilire l'esatto contributo organolettico che i diversi fenoli apportano ad un olio vergine di oliva, è quindi necessario procedere sintetizzando o isolando il singolo composto e successivamente analizzarlo sensorialmente. Non essendo ancora disponibili in commercio i principali secoiridoidi, l'unico processo possibile è l'isolamento e la purificazione dall'olio vergine di oliva. E' possibile trovare moltissima letteratura sull'elaborazione di metodi per l'analisi, isolamento e l'identificazione dei fenoli dalle olive e dagli oli [53; 64; 66-77] anche se tali approcci analitici sono stati prevalentemente utilizzati al fine di controllare le differenze in merito alla frazione fenolica causate dall'impiego di diverse varietà di olive, da un diverso stadio di maturazione delle drupe o dall'applicazione di differenti tecnologie di produzione dell'olio. L'isolamento dei singoli composti fenolici è stato intrapreso anche per la valutazione della loro capacità antiossidante [67,78].

#### 4.3.2.3 Componente antiossidante degli oli di oliva: tocoferoli.

I tocoferoli vengono considerati come i più importanti agenti antiossidanti naturali delle frazioni lipidiche, poiché prevengono la perossidazione lipidica neutralizzando i radicali liberi specialmente a livello delle membrane cellulari e delle lipoproteine polasmatiche.[79]. Il termine vitamina E è usato in riferimento ad un gruppo minore, ma onnipresente in natura, di composti liposolubili, comprendente quattro tocoferoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -T) e quattro tocotrienoli ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - TTR). A tale proposito è importante ricordare che tra tutti i tocoferoli, quello a più alto potenziale biologico è l' $\alpha$ -tocoferolo. Oltre ciò, va aggiunto che il meccanismo di azione dei tocoferoli non è ancora stato chiaramente compreso, anche se esistono prove fondate dell'importante ruolo svolto a prevenzione di alcune malattie croniche come quelle cardiovascolari o determinati tipi di tumore. Questo perché alte concentrazioni di Vitamina E inibiscono l'ossidazione degli acidi grassi poliinsaturi delle lipoproteine del plasma, la cui ossidazione è una delle cause responsabili dell'aterosclerosi. Si reputa inoltre che questa Vitamina riduca l'attività della Proteina Chinasi C, oltre che modulare positivamente i diversi meccanismi coinvolti nell'aterogenesi [80]. A tale proposito è stato calcolato che il livello di  $\alpha$ -tocoferolo che andrebbe assimilato per ottenere effetti benefici dovrebbe essere pari a 17-40 mg/giorno, ben oltre quindi al livello assimilabile attraverso una normale alimentazione [81]. Va comunque ricordato che, sebbene l' $\alpha$ -tocoferolo rappresenti il più presente ed interessante dei tocoferoli, non vanno in alcun modo trascurati gli altri. In questo senso, infatti, sono state effettuate sperimentazioni che mostrano come il  $\gamma$ -tocoferolo eserciti un'importante azione protettiva, nei confronti di pericolosi radicali quali la perossinitrite, in ugual modo rispetto all' $\alpha$ -tocoferolo [82].

I tocoferoli presenti nell'olio di oliva sono: l' $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ - T. [59,83] e sono responsabili, assieme ai composti fenolici, della stabilità ossidativa dell'olio di oliva quindi della sua shelf-life. Un contributo particolarmente importante a queste caratteristiche deriva proprio dall' $\alpha$ -tocoferolo [84]. che è, tra l'altro, il più presente nell'olio di oliva, come già precedentemente accennato. [58,82]. A questo proposito è importante sottolineare che in letteratura è riportato come il contenuto di  $\alpha$ -tocoferolo diminuisca durante la maturazione delle drupe; al contrario, il  $\beta$ -tocoferolo mostra una sostanziale stabilità mentre il  $\gamma$ - tocoferolo presenta un leggero incremento.

#### 4.4 L'influenza dei fattori agronomici sulla qualità degli oli vergini di oliva

Un olio di grande pregio non si ottiene per caso, ma trae origine dalla combinazione di una serie di fattori che interagiscono tra di loro in maniera estremamente complessa. Alcuni di questi fattori dipendono dalle scelte dell'agricoltore e del frantoiano e per questo motivo sono chiamati *fattori antropici*; altri invece sono influenzati dalle condizioni climatiche e pedologiche dell'area di coltivazione e sono quindi indicati come *fattori naturali*. Le cosiddette pratiche agronomiche, che comprendono tutte le operazioni che l'agricoltore esegue durante la coltivazione dell'olivo e le successive fasi di stoccaggio e conservazione delle olive, rientrano tra i fattori antropici.

Fra le pratiche agronomiche che influenzano le caratteristiche organolettiche e la qualità complessiva del prodotto vi sono:

- la potatura
- la concimazione
- la difesa fitosanitaria
- la raccolta
- la modalità di conservazione delle olive prima della molitura

Questi fattori non rivestono tutti la medesima importanza ai fini della qualità globale dell'olio extravergine di oliva; in particolare tutte le pratiche colturali che favoriscono il mantenimento dell'integrità del frutto incidono in maniera più marcata; per cui la difesa fitosanitaria, l'epoca e le modalità di raccolta, il tempo di conservazione delle olive ed i sistemi di stoccaggio sono elementi di primaria importanza

E' noto come l'infestazione da parte della cosiddetta "mosca delle olive" o *Dacus Olea* (*Bactrocera Oleae*) influisca sulla qualità dell'olio, provocando un danno al frutto che favorisce tanto i successivi attacchi di batteri e funghi quanto l'azione di enzimi lipolitici e perossidasi, con conseguente aumento dell'acidità libera, della suscettibilità all'autossidazione e della comparsa di difetti sensoriali; tra l'altro è stato verificato un calo significativo di antiossidanti quali tocoferoli e fenoli in relazione alla percentuale di infestazione. [86-87].

La resa in olio è favorita da una potatura che permetta di avere chiome ben illuminate e arieggiate, ma anche dalla sufficiente presenza di acqua nel terreno.

Fondamentale è poi la raccolta delle olive, la cui conduzione è critica fino al punto di poter compromettere la bontà delle operazioni precedenti. Questa fase racchiude due

momenti operativi: la scelta del giusto grado di maturazione delle olive e la loro raccolta vera e propria

Per quanto riguarda il giusto grado di maturazione, 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 surmaturazione. La maturazione tecnologica delle drupe si ottiene in momenti stagionali caratteristici delle cultivar, leggermente differenti da cultivar a cultivar, in relazione anche all'andamento climatico dell'annata. Il periodo ottimale della maturazione corrisponde al momento dell'anno nel quale le drupe raggiungono un grado di maturazione medio, al quale corrisponde la massima quantità di olio e il peso massimo delle drupe. In queste condizioni, considerate ottimali, si possono ottenere oli di pregio, a bassa acidità, con sufficiente patrimonio antiossidante ed ottime caratteristiche organolettiche [44]. Nei periodi successivi della maturazione, le drupe tendono a perdere acqua a causa del vento e del clima diminuendo contemporaneamente sia la quantità in olio che il contenuto in polifenoli. Da una parte la perdita di acqua fa sembrare la drupa più ricca di olio, diminuendo di peso più rapidamente della diminuzione del contenuto di olio, aumentando così la resa "apparente"; dall'altra, il raggrinzire del frutto porta alla rottura di molte delle membrane vacuolari che racchiudono l'olio nella polpa, permettendo il contatto e l'azione dei diversi enzimi sulle strutture lipidiche quando ancora la drupa è attaccata alla pianta. Questo conduce alla produzione di oli con una più elevata acidità libera, in parte anche ossidati e con caratteristiche poco stabili nel tempo, indipendentemente dalla tecnologia di lavorazione.

Una raccolta anticipata, rispetto al momento ottimale, fornisce una minore resa in olio ma può dare oli più ricchi di molecole fenoliche, caratterizzati da una maggiore intensità degli attributi gustativi di amari e piccante e contemporaneamente più stabili durante la conservazione.

I sistemi di raccolta sono una delle cause più influenti nella produzione di oli scadenti. L'ammaccatura della drupa provoca infatti rotture delle membrane dei vacuoli permettendo un precoce contatto tra gli enzimi e l'olio e compromettendo così la qualità futura del prodotto. Anche sistemi di raccolta violenti o affidati alla cascola delle olive possono rappresentare la causa di produzione di oli scadenti o poco conservabili.

Il tempo e le modalità di conservazione delle olive sono molto importanti ai fini della qualità organolettica dell'olio prodotto e della sua serbevolezza. Le drupe dell'olivo come tutti i frutti "respirano" durante la conservazione, con sviluppo di calore e

consumo di fenoli. Lo sviluppo di calore, spesso localizzato, nei punti di contatto e di pressione, frutto contro frutto, si può fronteggiare dissipando il calore con una buona aerazione dei contenitori, che devono avere lo strato di olive ridotto al minimo possibile. Il consumo di fenoli è progressivo, per cui l'unico modo per evitarlo è lavorare il più presto possibile le olive, tanto più rapidamente, quanto più sono compromesse (ammaccate, raggrinzite, ammuffite). In generale esiste una relazione lineare fra la stabilità dell'olio all'invecchiamento accelerato e tempo di conservazione delle olive (in condizioni ottimali) [87,88-87]

#### **4.5 L'influenza dei fattori tecnologici sulla produzione degli oli vergini di oliva**

Fondamentali per l'ottenimento di un olio extravergine di oliva di valore, sono i fattori legati alle scelte dell'operatore (fattori antropici) inerenti le tecnologie e le tecniche estrattive. Per semplicità e necessità di schematizzazione le diverse tipologie di impianto vengono divise in tre categorie:

- Impianto a pressione (sistema tradizionale).
- Sistema continuo con decanter a 2 o a 3 fasi (è attuabile anche una forma intermedia che in maniera semplificativa viene detto a due fasi e mezzo).
- Sistema continuo con separazione per percolazione.

##### **4.5.1 Operazioni preliminari**

Le operazioni tecnologiche connesse con l'estrazione dell'olio prevedono alcuni interventi preliminari che pur rivestendo una importanza notevole nell'economia complessiva del processo di estrazione, si possono considerare facoltative. Le fasi preliminari sono comuni a tutte le tipologie di impianto.

Tra gli interventi che precedono la molitura rientrano la rimozione delle foglie e dei corpi estranei ed il lavaggio delle olive. La separazione dei corpi estranei più leggeri (come foglie, erba e ramoscelli) viene operata da aria insufflata da un ventilatore, mentre quelli più pesanti si allontanano per precipitazione immergendo le olive in un bagno di acqua. I frutti più leggeri, galleggiano e vengono separati successivamente dall'acqua attraverso una griglia forata. La rimozione delle foglie ed il lavaggio delle olive hanno lo scopo di allontanare quei corpi estranei (vegetali: foglie, erba o

ramoscelli- minerali: terra, polvere e frammenti di pietra) che molto spesso si trovano insieme ai frutti, acquisiti durante le operazioni di raccolta. In particolare i corpi estranei più duri, come i rami o le impurezze minerali possono danneggiare i macchinari a causa della loro azione meccanica e abrasiva a carico degli organi del frangitore e del separatore centrifugo orizzontale (decanter). Per quanto riguarda la presenza di foglie, la loro eliminazione è da considerarsi obbligatoria nei sistemi di raccolta meccanica che provocano una maggiore cascola fogliare. L'effetto della presenza eccessiva di foglie sui caratteri chimico organolettici dell'olio è variabile a secondo del tipo di frangitura praticata. Le molazze in pietra, che generalmente risultano abbinata agli impianti tradizionali a pressione, operano una frangitura poco violenta e lenta che non provoca una rottura completa delle foglie, a differenza dei frangitori più moderni che attuando una rottura più energica le riducono in piccoli frammenti, aumentando la superficie di contatto con l'olio, e quindi estraendo una maggior quantità di composti capaci di modificare le caratteristiche legate al colore, all'aroma e al sapore dell'olio.

I risultati di un lavoro sperimentale, condotto al fine di studiare l'influenza delle foglie (in %) sulla qualità dell'olio, prodotto mediante un impianto continuo dotato di un frangitore a martelli fissi e di un decanter a tre fasi, hanno mostrato come siano in grado di aumentare il contenuto di pigmenti clorofilliani e di alcuni composti aromatici. E' da sottolineare come però non sia stato evidenziato un miglioramento nella stabilità ossidativa del prodotto; inoltre considerando che i pigmenti clorofilliani rappresentano un elemento pro-ossidante in presenza di luce, emerge che la conservazione di oli prodotti con una maggiore quantità di foglie all'interno di contenitori inadeguati favorisce l'innesco dei processi ossidativi e di conseguenza l'invecchiamento precoce del prodotto.

#### **4.5.1.1 Un'operazione preliminare particolare: la denocciolatura**

La particolare distribuzione delle attività enzimatiche endogene della drupa, lascia intravedere la possibilità di attivare gli enzimi endogeni del frutto in forma differenziata cercando di intervenire selettivamente, in fase di frangitura, sulle parti costitutive del frutto. Si basa su questo concetto il processo di denocciolatura delle olive che, eliminando la mandorla, limita la liberazione dell'attività perossidasi nelle paste e quindi l'ossidazione delle sostanze fenoliche nell'olio [89].

Mediante questa operazione preliminare è possibile ottenere oli ad alto tenore in sostanze fenoliche, quindi più ricchi di composti a più alto impatto sensoriale e con un maggior valore nutrizionale-salutistico rispetto a quelli ottenuti dalle lavorazioni convenzionali. Inoltre gli oli ottenuti attraverso il processo di denocciolatura, essendo più ricchi di composti antiossidanti, sono dotati di una maggiore shelf-life. L'eliminazione del nocciolo infatti, comporta la riduzione dell'attività delle polifenolossidasi senza incidere su quella delle lipossigenasi. Le polifenolossidasi infatti, sono localizzate prevalentemente nella mandorla e catalizzano la degradazione degli antiossidanti di natura fenolica nel corso dell'estrazione meccanica degli oli vergini di oliva.

In un recente studio [90] sono stati riportati i valori relativi a: acidità libera, numero di perossido,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  (secondo regolamento EEC/1989/2003), determinazione dei composti fenolici, dei carotenoidi, della clorofilla, dell' $\alpha$ -tocoferolo, dell'attività antiossidante degli estratti fenolici di oli ottenuti da olive appartenenti alla cultivar Bosana, prodotti da materia prima intera e da drupe preventivamente denocciolate. Per quanto concerne l'acidità libera, il numero di perossido, il  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  i valori riscontrati erano compresi all'interno di quelli stabiliti dal regolamento EEC/1989/2003 per gli oli extravergini di oliva. Per quanto riguarda il contenuto di clorofilla non sono state riscontrate delle differenze significative nel confronto tra i due campioni. E' stato trovato, invece, un contenuto di carotenoidi più elevato nel campione ottenuto da olive denocciolate, rendendo così l'olio più resistente agli attacchi dei radicali liberi, essendo i carotenoidi degli antiossidanti naturali [15] In questo lavoro il contenuto dei fenoli totali riscontrato non è in accordo con quanto riportato in altre pubblicazioni [89,91,92] infatti non sono state riscontrate differenze significative tra il campione ottenuto da olive intere e quello da olive denocciolate. Inoltre alcuni studi [89-90] riportano che il valore dell' $\alpha$ -tocoferolo è più elevato per il campione da olive denocciolate. Significative differenze sono state riscontrate per la stabilità ossidativa, valutata mediante Rancimat, in accordo con gli altri lavori riportati in letteratura [20, 91] avendo ottenuto un valore più elevato per il campione prodotto da olive denocciolate. Anche per quanto riguarda l'attività antiossidante, valutata mediante test DPPH, [90] riportano valori più elevati per il campione ottenuto da olive previa denocciolatura.

In un recente lavoro [89] sono riportati i valori relativi a acidità libera, numero di perossidi, indici spettrofotometrici (secondo Regolamento EEC/1989/2003), polifenoli totali ed *o*-difenoli di oli ottenuti da olive intere e previa denocciolatura delle cultivar

Leccino, Frantoio, Carolea, Coratina, Moraiolo ed Ogliarola. In questo lavoro, inoltre, è stata determinata la frazione fenolica delle parti costitutive del frutto e delle paste gramolate, sia previa denocciolatura che da olive intere. Dall'esame HPLC per via spettrofluorimetrica della composizione in lignani delle differenti parti del frutto si è evidenziato come il composto (+)-1-acetossipinoresinolo sia localizzato principalmente nella polpa mentre il (+) pinoresinolo si trovi soprattutto nel nocciolo. La mandorla invece risulta priva di entrambe le frazioni. Dall'analisi della composizione delle paste gramolate tal quali e denocciolate è emerso come la seconda presenti un quantitativo di fenoli maggiore rispetto a quella ottenuta dalle drupe intere. La sottrazione del nocciolo ricco di enzimi perossidasi, potrebbe essere la spiegazione di questi incrementi: la pasta denocciolata risulterebbe quindi più stabile ai fenomeni ossidativi di natura enzimatica. Nelle stesse paste le frazioni del gruppo dei lignani, sono risultate quantitativamente piuttosto stabili. È stato riscontrato un lieve incremento di (+)-pinoresinolo nelle paste gramolate denocciolate, risultato inaspettato data la presenza di questa sostanza soprattutto nel nocciolo della drupa. Secondo gli autori questo potrebbe essere spiegabile ipotizzando che tale sostanza non venga rilasciata nel mezzo durante il processo di estrazione meccanica dell'olio ma possa essere presente nelle paste in forma legata o glucosilata.

Nella valutazione dei parametri di base più importanti degli oli, hanno rilevato che la denocciolatura non incide negativamente sulla qualità merceologica del prodotto e che i valori di acidità, numero di perossidi e costanti spettrofotometriche rimangono praticamente inalterate. Relativamente alla composizione fenolica ed *o*-difenolica degli oli, i dati ottenuti hanno mostrato un buon incremento di tali sostanze, soprattutto nei campioni prodotti da drupe appartenenti alla cultivar Coratina. I composti che hanno subito maggiori variazioni grazie all'eliminazione del nocciolo, sono l'isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EA) e la forma dialdeidica dell'acido elenolico legato al 3,4 DHPEA (3,4 DHPEA-EDA). I valori dei lignani rispecchiano l'andamento visto nelle paste denocciolate, infatti in tutti i casi studiati le concentrazioni dei due composti risultano leggermente più elevate negli oli da paste denocciolate. A conferma di un possibile impedimento del passaggio del (+)-pinoresinolo dal nocciolo alla pasta in fase di estrazione, i dati ottenuti evidenziano che le concentrazioni di questa sostanza nell'olio sembrano non risentire dell'eliminazione della parte del frutto (nocciolo) che maggiormente lo contiene. Dallo stesso studio [89] è emerso che non in tutte le cultivar l'aumento delle sostanze fenoliche negli oli di oliva ottenuti da paste denocciolate è

uguale, infatti nelle varietà Moraiolo e Ogliarola l'effetto della denocciolatura in relazione all'aumento dei fenoli è stato più modesto.

#### **4.5.2 La frangitura**

Tutti i sistemi in uso per l'estrazione dell'olio dalle olive prevedono la frangitura delle drupe. Grazie alla dilacerazione delle pareti cellulari vi è la fuoriuscita dell'olio contenuto nelle cellule oleifere, che sarà estratto con i diversi metodi successivamente illustrati. La dimensione dei frammenti di polpa, a seguito della frantumazione delle olive, rappresenta un elemento di grande importanza con risvolti sia sul rendimento dell'impianto che sulle caratteristiche chimico fisiche ed organolettiche dell'olio prodotto. Una pasta costituita da particelle di grandi dimensioni determina una minore resa e una più bassa estrazione delle componenti fenoliche e dei pigmenti clorofilliani. Anche una pasta formata da particelle troppo piccole interferisce negativamente sulla resa per effetto dei fenomeni di colloidismo, che determinano la formazione di emulsioni e rendono più difficoltose le fasi estrattive. In linea di massima si ritiene che una frangitura correttamente eseguita debba determinare frammenti della parte solida (nocciolo) di 2-3mm. Di seguito sono riportati i sistemi di frangitura più utilizzati:

- Molazze: l'impianto è costituito da una vasca, con bordi in acciaio laminato e base in granito (macello), al cui interno si muovono in senso rotatorio delle ruote, anch'esse in pietra (molazze), variabili sia nel numero che nel peso. Ciascuna delle 2-4 molazze, montate perpendicolarmente al piano e collegate ad un asse di rotazione centrale, ha infatti un peso compreso tra 2 e 4 tonnellate. Le molazze sono sfalsate in modo da agire su tutta la superficie della vasca e mantenute leggermente sollevate dal basamento. Trovano impiego soprattutto in abbinamento al sistema di estrazione tradizionale a presse, ma, sovente, vengono utilizzate anche nei processi estrattivi continui, per ottenere oli con caratteri organolettici armonici più equilibrati. I limiti delle molazze sono rappresentati dal costo elevato e dall'ampio spazio occupato, nonché dalla discontinuità arrecata all'intero processo. E' consigliabile l'uso in abbinamento con finitori, per ottenere una pasta di pezzatura più omogenea, adeguata all'estrazione con decanter.

- Molitore continuo a rulli: è costituito da una coppia di rulli in pietra controrotanti, a cui può far seguito un finitore a dischi. Produce oli armonici, per via di

una minore estrazione delle sostanze amare rispetto al frangitore a martelli. Presenta un'elevata capacità lavorativa pur limitando le dannose emulsioni. Lo caratterizzano ingombri limitati e costi contenuti. Il limite è rappresentato dalla forte usura e dalle frequenti rotture, causate dalla presenza di corpi estranei.

- Frangitore a martelli: sono costituiti da martelli (fissi o snodati) montati un disco ruotante. Le olive vengono schiacciate contro una griglia forata la cui dimensione della maglie è variabile a seconda della pezzatura della pasta che si intende ottenere. La griglia può essere fissa, ruotare nello stesso senso dei martelli o in direzione contraria (griglia controrotante). Presenta una elevata capacità lavorativa e favorisce, a seguito di una violenta rottura, l'estrazione dei pigmenti clorofilliani e delle sostanze fenoliche, Gli oli presentano caratteri organolettici marcati con sentori più elevati di amaro.

- Frangitori a dischi dentati: operano una frangitura ottimale grazie all'assenza di emulsioni ed alla capacità di estrarre buoni quantitativi di sostanze fenoliche e di pigmenti clorofilliani. Il limite è rappresentato da una relativa fragilità dei denti, che si possono spezzare in presenza di corpi estranei. Alcuni lavori scientifici hanno messo a confronto diversi sistemi di frangitura a parità di impianto di estrazione.

**Tabella 2.** Caratteristiche qualitative degli oli vergini di oliva prodotti con diversi metodi di frangitura (Angerosa *et al.*, 1995; Alloggio *et al.*, 1996; Caponio *et al.*, 2003).

Cultivar di olive	Metodo di frangitura	Acidità libera [%]	Numero di perossido [meqO <sub>2</sub> /kg]	K232	Valutazione sensoriale (punteggio)	Fenoli totali [mg/l]	Tempo di induzione [h]	Intensità di amaro (punteggio)
Coratina	Molino a molazze	0,40	6,5	1,18	–	228	9,2	–
	Frangitore a martelli fissi	0,37	5,4	1,20	–	411	11,9	–
Peranzana	Molino a molazze	0,23	11,5	1,87	7,4	133	7,8	1,8
	Frangitore a dischi metallici	0,23	11,7	1,90	7,2	247	10,6	2,4
Coratina	Frangitore a martelli fissi	0,29	10,5	1,38	–	323,1	19,7	–
	Frangitore a dischi metallici	0,24	6,9	1,32	–	326,9	20,1	–

E' stato riscontrato come i frangitori più moderni producano rispetto al molino a molazze, oli con una maggiore stabilità ossidativa, (in termini di tempo di induzione) dovuta principalmente al maggior contenuto in composti fenolici. Inoltre è emerso come dal confronto tra frangitore a martelli fissi e a dischi, quest'ultimo permetta di ottenere un minimo (seppur significativo) aumento della stabilità ossidativa e per questo una minore ossidazione indotta nell'olio. Per il molino a molazze è importante la valutazione del tempo di svolgimento dell'operazione, infatti la molitura protratta per un tempo maggiore (30 minuti invece che 15 minuti) porta ad un significativo abbassamento della stabilità ossidativa.

#### **4.5.3 La gramolatura**

Questa operazione, che ha lo scopo di favorire l'estrazione attraverso la coalescenza delle gocce di olio, assume un ruolo centrale nella produzione dell'olio con i più moderni impianti continui. E' in questa fase, infatti, che il rimescolamento continuo della pasta di olive porta alla produzione dei composti volatili responsabili della ricchezza aromatica degli da olive. Inoltre, in questa fase, si ha la trasformazione dei composti fenolici dalla forma glicosilata (che ha una grande polarità e quindi una maggiore affinità con la fase acquosa) a composti meno polari che si ripartiscono tra l'acqua e l'olio. E' importante controllare il tempo di durata e la temperatura di svolgimento dell'operazione, al fine di ottimizzare la qualità dell'olio. Sono state condotte diverse sperimentazioni in questa direzione. Da questi studi è emerso, come la percentuale di olio estratto sul totale di quello presente nel frutto, aumenti all'aumentare dei tempi di gramolatura; questo andamento continua sino al raggiungimento di un plateau, inferiore alla totalità dell'olio presente, che è legato ad un limite fisico determinato dal sistema di estrazione scelto.

**Tabella 3** Risultati ottenuti per oli prodotti con lo stesso impianto e alle stesse condizioni, variando i tempi di gramolatura (Di Giovacchino *et al.*, 2002b).

Determinazioni	Tempo di gramolatura*		
	15 min	45 min	90 min
Resa di estrazione in olio [%]	78,5 <sup>a</sup>	82,8 <sup>b</sup>	85,7 <sup>b</sup>
Olio nelle sanse [kg/100 kg di olive]	3,1 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>
Olio nelle acque di vegetazione [kg/100 kg di olive]	0,7 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>
Olio disperso nei sottoprodotti -totale [kg/100 kg di olive]	3,8 <sup>a</sup>	3,1 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>b</sup>
Acidità libera [%]	0,37	0,36	0,38
Numero di perossido [meqO <sub>2</sub> /kg]	4,5	4,8	4,5
K <sub>232</sub>	1,49	1,49	1,49
K <sub>270</sub>	0,10	0,10	0,11
Valutazione organolettica (punteggio)	6,9	7,0	7,0
Fenoli totali [mg/L come acido gallico]	293	275	253
Tempo di induzione [h]	14,3	13,3	12,3

**Tabella. 4** Caratteristiche di oli vergini di oliva ottenuti con un impianto continuo operante la gramolatura a diverse temperature (25° C e 35° C) (Gallina Toschi *et al.*, 2004).

Determinazioni	cv. Peranzana	
	Molitura	
	25° C	35° C
Acidità libera [%]	0,34	0,40
Numero di perossido [meqO <sub>2</sub> /kg]	15,06	16,80
K <sub>232</sub>	1,729	1,780
K <sub>270</sub>	0,116	0,133
Fenoli totali [mg/kg]	539,77	531,81
Tempo di induzione con OSI [h]	22,94	22,89

Inoltre è emerso come all'aumentare del tempo di gramolatura, diminuisca la quantità di olio residua nei sottoprodotti. L'aumento del tempo di gramolatura da 15 a 90 minuti non ha determinato una grande variazione sulla qualità dell'olio in termini di acidità libera, stato ossidativo (numero di perossido, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub>) e qualità sensoriale. Il prolungamento del tempo di gramolatura ha determinato, però, delle variazioni sul contenuto in composti antiossidanti presenti nell'olio. In particolare è stata registrata una diminuzione passando da 15 a 45 fino a 90 minuti. Anche la stabilità ossidativa, valutata mediante ossidazione forzata, ha seguito una riduzione progressiva all'aumentare dei tempi di gramolatura

Anche per la valutazione dell'effetto della temperatura di macinatura sono state effettuate molte sperimentazioni. È stato evidenziato che le basse temperature (18-20°C) non permettono di ottenere delle rese di estrazione soddisfacenti e, allo stesso tempo, non facilitano l'estrazione dei composti fenolici.

Le varie ricerche, condotte con diverse varietà di olive, hanno evidenziato quanto sia forte l'influenza varietale sulle caratteristiche chimico/compositive degli oli di oliva e come quindi non sia possibile generalizzare indicando dei parametri di processo validi per la lavorazione di tutte le tipologie di olive. Ogni cultivar, in relazione anche al grado di maturazione, richiede quindi una lavorazione personalizzata.

#### **4.5.4 La separazione**

Questa operazione ha lo scopo di separare l'olio, dall'acqua di vegetazione e dalla sansa. Questa fase differisce sostanzialmente, in termini di principi di funzionamento, negli impianti tradizionali per pressione rispetto a quelli continui.

##### **4.5.4.1 Sistema di estrazione per pressione (sistema tradizionale)**

Nel sistema tradizionale per pressione la macinatura è generalmente operata da un molino a macine. L'operazione ha una durata variabile tra i 15 e i 30 minuti, durante i quali il rimescolamento continuo favorisce la coalescenza delle goccioline di olio in modo da favorirne la separazione nelle fasi successive di lavorazione. In questo tipo di impianto la macinatura rappresenta quindi un'operazione secondaria. La peculiarità del sistema tradizionale è la separazione delle fasi liquide da quella solida attuata tramite pressa idraulica.

In questa tipologia di impianti, l'operazione di separazione è divisa in due parti, la prima per allontanare le fasi liquide da quella solida e la seconda per separare l'olio dall'acqua. La prima di queste due operazioni è effettuata mediante una pressa che opera lo schiacciamento della pasta di olive, ottenuta dopo la macinatura e la separazione, previa disposizione su superfici drenanti (fiscoli), atte a trattenere la parte solida. La seconda fase è attuata mediante l'uso di un separatore centrifugo. Per la separazione, la pasta viene distribuita (con l'ausilio di un'apposita apparecchiatura chiamata dosafiscolatrice) su superfici di supporto drenanti, i cosiddetti fiscoli, i quali vengono

impilati su di un carrello, munito di un asse centrale metallico forato (foratina), attraverso i quali drena la frazione liquida. La pressione generata (fino a 400 atmosfere) provoca la ritenzione della fase solida (sansa) ed il drenaggio delle fasi liquide (mosto oleoso). Si giunge alla pressione massima progressivamente, che viene mantenuta, al massimo per un'ora.

Il mosto oleoso è costituito da due componenti: l'olio dalle olive, l'acqua di vegetazione. Per separare le due frazioni ed i modesti residui solidi presenti, si impiega un separatore centrifugo verticale che sfrutta la forza centrifuga che agisce sul diverso peso specifico delle varie frazioni presenti. Si ottiene così l'olio vergine di oliva che, nell'ipotesi in cui presenti i parametri chimico fisici ed organolettici previsti dalla categoria merceologica "extravergine", può essere direttamente consumato.

#### **4.5.4.2 La separazione nei sistemi continui**

Nei sistemi più moderni, che operano in continuo, la separazione è condotta mediante l'ausilio di separatori meccanici che sfruttano la forza centrifuga. Queste macchine sono di due tipologie, in funzione della posizione dell'asse centrale: si distinguono in separatori centrifughi ad asse orizzontale (chiamati anche decanter) e ad asse verticale (questi ultimi utilizzati anche negli impianti a pressione per la separazione finale delle due fasi liquide). Esistono diverse tipologie di decanter, in funzione del tipo di separazione attuata.

Il sistema di separazione a pressione e quello che utilizza il decanter sono molto diversi ed i limiti del primo risiedono nella discontinuità dell'operazione e nell'impossibilità di una completa pulizia delle superficie drenanti. Ciò può ripercuotersi sulla qualità sensoriale del prodotto finale a causa di fermentazioni che possono instaurarsi nei fiscoli e che possono portare alla formazione di composti volatili sgradevoli che passano all'olio.

La differenza tra i diversi sistemi di separazione con decanter è rappresentata dalla quantità di acqua aggiunta in fase di separazione. Quest'ultimo fattore ha un effetto sulla qualità dell'olio ed in particolare sul suo contenuto in composti fenolici, che calano con il maggior impiego di acqua.

Gli impianti continui che prevedono la separazione dei componenti della pasta di olive per mezzo del decanter sono così denominati perché le operazioni si susseguono in

successione. Differiscono da quelli di tipo tradizionale per la mancanza di tempi morti durante le fasi di lavorazione, per la velocità della fase di frangitura e per la separazione delle fasi tramite il separatore continuo orizzontale (decanter). Ovviamente, la velocità porta, però, allo svantaggio di provocare, come già indicato, l'emulsione delle goccioline di olio, che necessitano quindi di un tempo di gramolatura più lungo. Quest'ultima operazione deve essere quindi, protratta per tempi più lunghi (30 minuti circa) e a temperature intorno a 25°C, per ottenere delle rese elevate e per permettere l'estrazione dei composti fenolici e la formazione degli aromi tipici e unici degli oli vergini di oliva.

La separazione è differente a seconda del tipo di decanter utilizzato. Inizialmente furono utilizzati decanter a "tre fasi", che permettono la separazione della pasta di olive in tre frazioni: la frazione oleosa, quella acquosa e quella solida (sansa). In questo tipo di sistema è necessaria l'aggiunta di acqua per facilitare la separazione.

Recentemente sono stati introdotti sul mercato i decanter a "due fasi", che attuano la separazione dell'olio da un unico sottoprodotto, costituito da acqua e sansa. Con questo sistema si ottengono quindi soltanto due frazioni: l'olio (con piccole impurità costituite da acqua di vegetazione) e la sansa umida non palabile, costituita dalla sansa e dall'acqua di vegetazione (per 100 kg di olive si ottengono 70 kg di sansa umida). L'olio generalmente viene lavorato ancora con un separatore centrifugo verticale che completa la pulizia del prodotto.

Il sistema più moderno è quello a "due fasi e mezzo", che opera in analogia a quello a tre fasi per quanto riguarda la produzione delle tre frazioni (fra le quali una sansa palabile con una umidità media superiore al 60%) e al due fasi per quanto riguarda l'utilizzo dell'acqua in piccole quantità comunque valutate in funzione delle caratteristiche reologiche della pasta (entro un intervallo compreso tra 0 e 30 litri).

Nello specifico con il progredire della maturazione, e quindi con la diminuzione del contenuto di acqua nel frutto, si rendono necessarie maggiori aggiunte di acqua nel processo di lavorazione.

#### 4.5.5 Frantoi su piccola scala

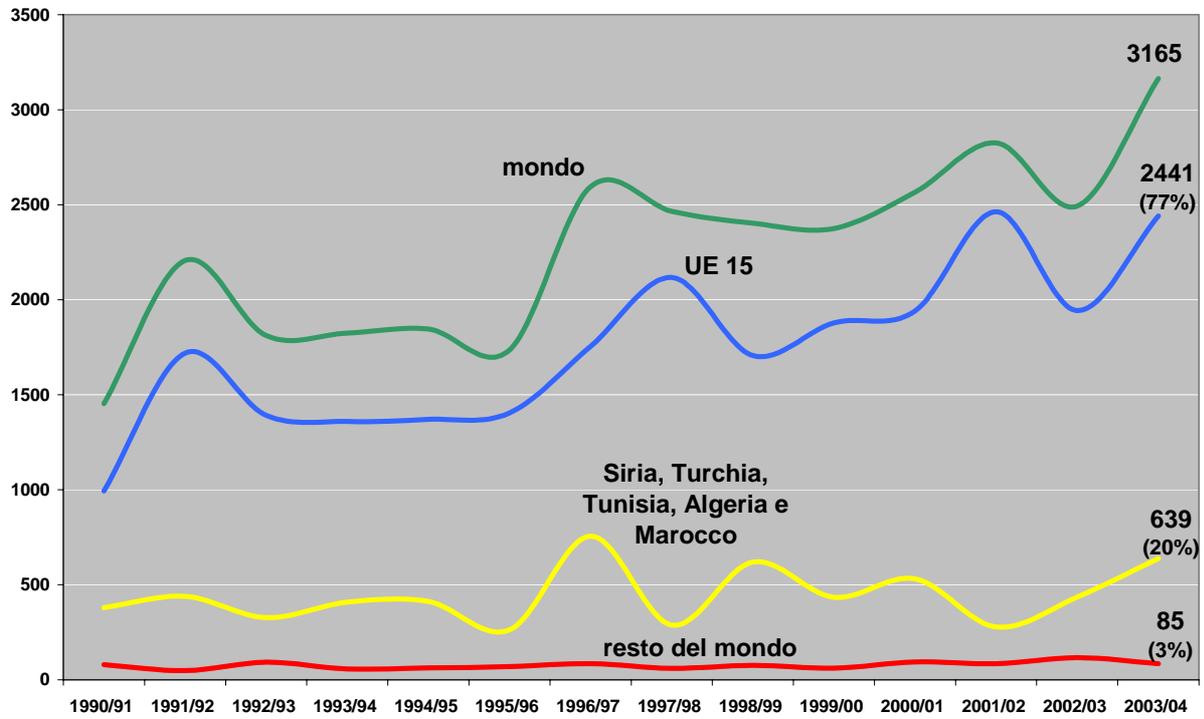
Negli ultimi dieci anni, sono apparsi sul mercato i frantoi su piccola scala, ovvero frantoi capaci di lavorare un quantitativo ridotto di olive. Tra questi vi è anche il minifrantoio **Oliomio 150M** della Ditta Toscana Enologica Mori S.n.c. che riproduce il sistema di estrazione dell'olio con decanter a due fasi e lavora senza l'aggiunta di acqua dall'esterno, producendo l'olio (fase 1) e la sansa contenente l'acqua di vegetazione (fase 2). Questo impianto è in grado di lavorare un quantitativo di olive pari a 150 kg ogni ora.

Nel 2005 è stato condotto un lavoro [55] che ha messo a confronto oli, ottenuti dalla lavorazione di due diverse cultivar di olive tipiche della Romagna: Ghiacciolo e Nostrana di Brisighella. Il lavoro prevedeva il confronto tra oli ottenuti mediante un impianto continuo industriale (Alfa Laval s.p.a. Sambuca Val di Pesa, Firenze Italy) ed un impianto Oliomio, (Toscana Enologica Mori S.n.c.). Sia i campioni di olio di oliva monovarietali ottenuti mediante l'utilizzo dell'impianto industriale che quelli ottenuti con il micro-frantoio sono risultati, dal punto di vista qualitativo, classificabili come oli extravergini di oliva, secondo il Regolamento CE 2568/91. Inoltre, i valori relativi ai vari parametri qualitativi erano molto simili indipendentemente dall'impianto utilizzato. Dato interessante emerso da questa sperimentazione è stato il maggior contenuto in composti fenolici e la conseguente più elevata stabilità all'ossidazione dei campioni ottenuti mediante l'impianto Oliomio, rispetto a quelli industriali. Questo potrebbe essere attribuibile all'impiego di una temperatura più bassa ed al minor contatto della pasta con l'aria, in fase di gramolatura con il microfrantoio; entrambi questi fattori causano una minor tendenza all'innescio dei processi ossidativi. Inoltre, è importante sottolineare come nell'impianto di tipo industriale vi sia, a differenza dell'impianto Oliomio, aggiunta di acqua alla pasta di olive prima della fase di centrifugazione e come questa condizione tecnologica possa ridurre il contenuto dei fenoli nell'olio. Per quanto riguarda il profilo sensoriale i parametri tecnologici sopra riportati influenzano, sicuramente, la presenza dei composti volatili, soprattutto per quanto riguarda le specifiche sostanze responsabili dell'aroma degli oli di oliva. Si è inoltre potuto constatare attraverso l'analisi sensoriale come l'olio prodotto con il microfrantoio fosse percepito come più intenso per alcune note gusto-olfattive rispetto al campione prodotto industrialmente.

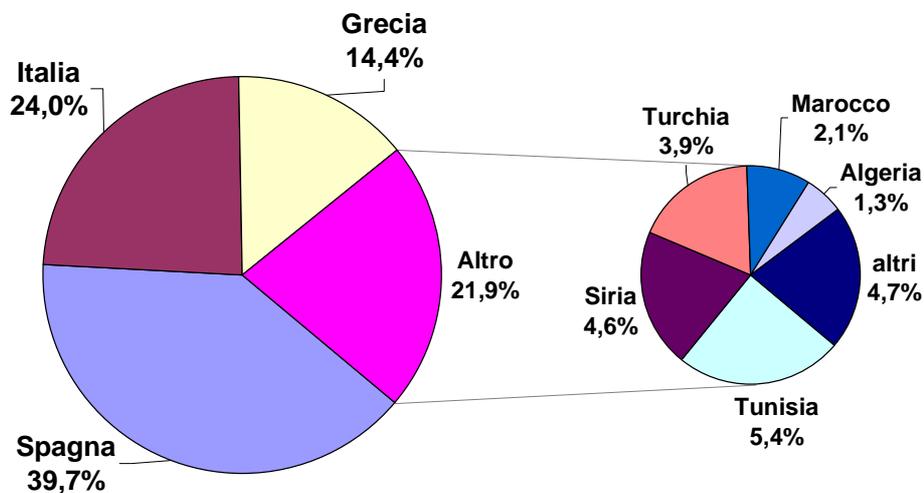
#### **4.6 Produzione, scambio e consumi degli oli di oliva**

Il sistema produttivo nazionale e regionale degli oli da olive viene sempre più influenzato dalla situazione internazionale delle produzioni, del consumo e della dinamica dei modelli alimentari. Nel corso dell'ultimo quindicennio la domanda internazionale di oli da olive è andata lentamente aumentando, stimolando l'interesse di paesi non tradizionalmente produttori come l'Argentina e l'Australia, nonché di paesi un tempo deboli produttori come la Tunisia e la Turchia, inducendo i paesi tradizionalmente produttori del bacino del Mediterraneo ad intensificare la produzione. Questa evoluzione può trovare una spiegazione nel diffondersi di una crescente sensibilità per la salubrità degli alimenti che tende a valorizzare gli effetti del consumo dell'olio di oliva sulla salute umana. In uno scenario economico-commerciale ed alimentare sempre più globalizzato, grazie agli accordi in seno alla World Trade Organization (Wto), all'aumentata mobilità delle persone ed alla velocità di trasmissione delle conoscenze e della cultura, si può prefigurare un'ulteriore espansione ed intensificazione del consumo d'olio d'oliva, in special modo da parte di paesi industrializzati, con redditi pro-capite alti e medio-alti, a Occidente (Usa, Canada, Brasile) come a Oriente (Giappone, Australia).

La Produzione mondiale di oli da olive è cresciuta costantemente negli ultimi quindici anni attestandosi sui 3,2 milioni di tonnellate circa nella campagna 2003/2004, con una media di 2,7 milioni di tonnellate negli ultimi cinque anni. In tale contesto, il Mediterraneo rimane il cuore produttivo e commerciale degli oli da olive a livello mondiale, con l'Unione Europea come maggiore produttore al mondo (79,4% della produzione mondiale nell'ultima annata), seguita a grande distanza da Tunisia, Siria e Marocco, Turchia e Algeria che insieme raggiungono il 17,3% della produzione mondiale. (grafico 1 e 2)



**Grafico 1 - Produzione mondiale oli da olive (migliaia di t, Fonte dati: COI)**



**Grafico 2 - Produzione mondiale di oli da olive (media volumi 1999-2004, Fonte dati: COI)**

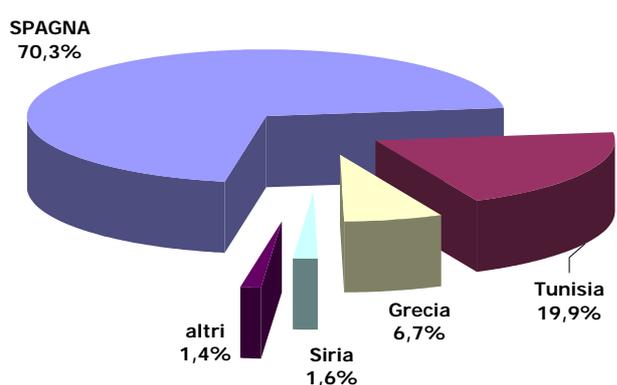
Come si può notare dal grafico 2 tra i paesi europei, Spagna, Italia e Grecia sono i principali produttori, rappresentando da soli il 78% dell'olio da olive prodotto al mondo (Dati COI 2004).

La produzione di oli da olive in Grecia negli ultimi quindici anni si è sostanzialmente stabilizzata intorno alle 400.000 tonnellate, mentre l'Italia ha registrato un aumento graduale con oscillazioni legate all'alternanza di produzione. La Spagna, invece ha visto la propria produzione raddoppiare negli ultimi dieci anni, crescendo ad un tasso nettamente superiore a quello italiano.

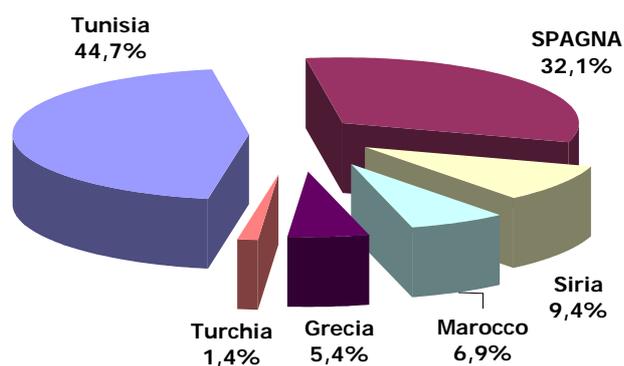
Il grosso della produzione italiana è localizzato nel Sud, soprattutto in Puglia (39%), Calabria (24%) e Sicilia (8%), che assommano i tre quarti della produzione nazionale. Anche in Spagna la produzione avviene per lo più nel Sud con il 60% dell'olio spagnolo prodotto in Andalusia ed il resto suddiviso più o meno equamente tra Estremadura (12%), Castilla-La Mancha (12%), Catalogna (7%), Comunidad Valenciana e Murcia (9%).

Il flusso dell'export mondiale ha essenzialmente origine nell'Unione Europea, in Tunisia e ultimamente si è aggiunta anche la Turchia. Considerando la media degli ultimi cinque anni, l'Unione Europea controlla mediamente il 59,7% dell'export mondiale, la Tunisia il 18,1% la Turchia il 9,6%. Nell'ambito dell'Unione Europea sono essenzialmente Spagna ed Italia ad alimentare il 90% circa dell'esportazione. A fruire dell'espansione del mercato mondiale è stata sostanzialmente l'Unione Europea, i cui

paesi posseggono una struttura produttiva, industriale e commerciale più organizzata e tecnologicamente evoluta rispetto agli altri paesi del Mediterraneo. I flussi di scambio sono essenzialmente quelli che dall'Unione Europea (Italia e Spagna) si dirigono verso Stati Uniti, Brasile, Giappone, Australia e Canada e quelli che da Tunisia, Turchia e Marocco si dirigono verso l'Unione Europea. In definitiva quindi l'Unione Europea si conferma allo stesso tempo la principale area di produzione ed esportazione, mentre rappresenta il secondo paese importatore mondiale (33% del totale mondiale nel 2004), superato solo dagli Usa. Gli Stati Uniti tra l'altro rappresentano il mercato di consumo non tradizionale più ampio, che nel 2004 ha accentrato il 35% circa dell'import mondiale. I notevoli incrementi delle importazioni negli Usa di oli da olive del decennio trascorso non hanno riguardato soltanto l'aspetto quantitativo, ma anche quello qualitativo, avendo raggiunto gli oli di oliva extravergini o vergini il 44% dell'import totale del paese. Secondo stime del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI) il mercato statunitense è approvvigionato per oltre il 75% dall'Italia, in misura del 14% dalla Spagna e del 7% circa dalla Turchia. L'Italia è esportatrice soprattutto di olio di oliva, mentre è importatrice netta di olio non raffinato, sia vergine che lampante. Ciò significa che una parte consistente degli oli consumati in Italia proviene da altre nazioni, soprattutto da Spagna, Grecia e Tunisia. (grafico 3A- 3B)

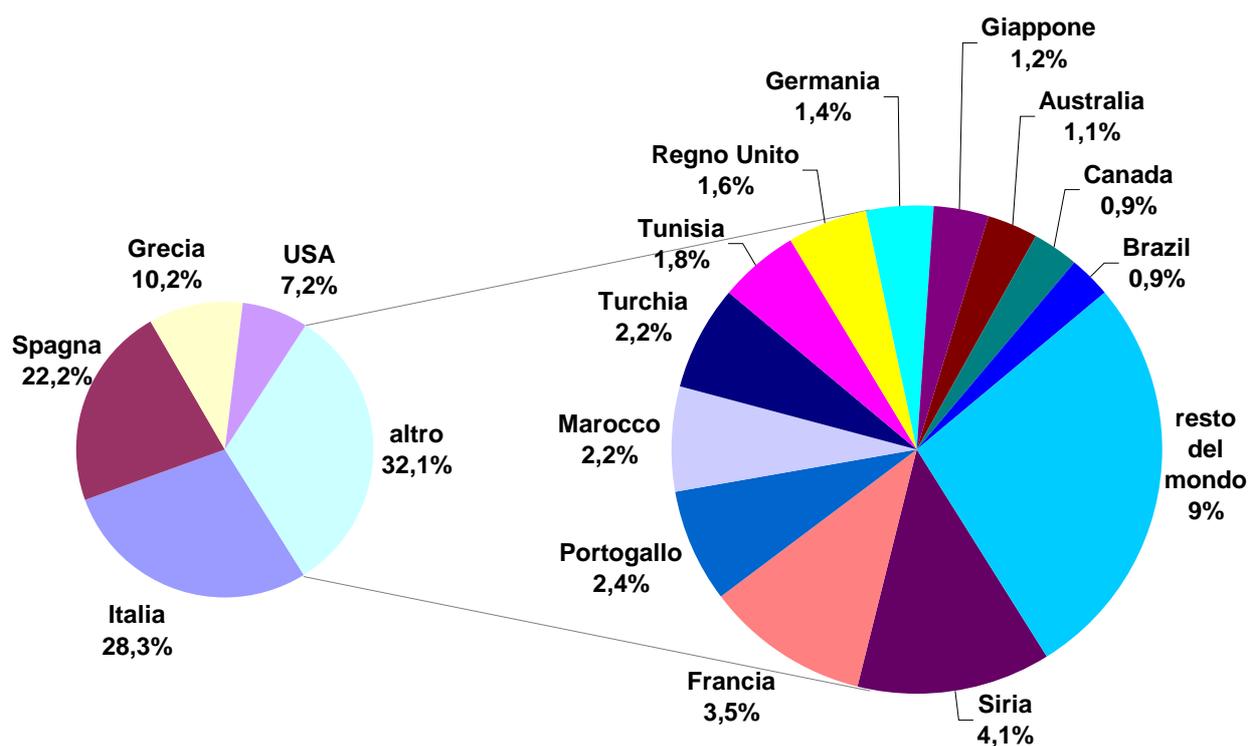


**Grafico 3A – ITALIA: Importazioni di olio di oliva vergine (volumi, anno 2004, Fonte dati: ISTAT)**



**Grafico 3B – ITALIA: Importazioni di olio di oliva lampante (volumi, 2004, Fonte dati: ISTAT)**

La crescita dei consumi si è manifestata in misura cospicua nell'ultimo decennio e ha interessato tutte le aree, anche se i maggiori tassi evolutivi si riscontrano in quelle aree non produttrici o deboli produttrici. I principali consumatori mondiali (grafico 4) sono l'Unione Europea (soprattutto Italia, Spagna e Grecia), cui seguono gli Usa (7,2%). Negli ultimi dieci anni, infatti, il consumo di oli da olive è aumentato dell' 84% negli Stati Uniti, del 75% circa in Australia e Canada e del 290% in Giappone e Gran Bretagna. (dati COI 2004). La potenzialità di questa espansione risulta interessante per i paesi produttori del bacino del Mediterraneo; stime del COI indicano infatti che nei paesi coinvolti da questo fenomeno quelli industrializzati del Nord America, dell'Oceania e dell'Asia e quelli emergenti dell'estremo Oriente come la Cina, si contano decine di milioni di abitanti con elevata capacità di acquisto.



**Grafico 4 - Consumo mondiale di oli da olive (media volumi 1999-2004 Fonte dati: IOOC)**

Italia e Spagna assommavano nel 2004 poco meno della metà degli oli da olive consumati al mondo, avendo mantenuto un trend di relativa stabilità dei consumi negli ultimi dieci anni. In entrambi i paesi il consumo di olio di oliva rappresenta il 70% circa degli oli vegetali consumati (grafici 5A e 5B). La differenza sostanziale sta nel tipo di olio consumato dalle famiglie, nel 2004 l'Italia ha visto il consumo di olio extravergine

di oliva eguagliare il consumo di oli raffinati (sansa e oliva) con trend crescente che ha portato a una netta supremazia di questo sugli altri due nel 2004, la stessa cosa ancora non è avvenuta in Spagna, dove il consumo di oli raffinati (soprattutto olio di oliva) è tuttora preponderante [93].

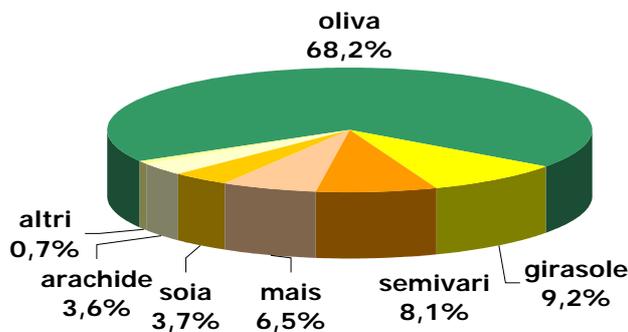


Grafico 5A - Consumo di oli vegetali in Italia (2004, volume, Fonte dati: ISMEA-Nielsen)

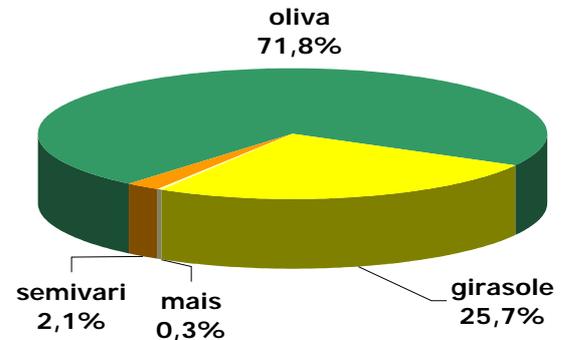


Grafico 5B - Consumo di oli vegetali in Spagna (2004, volume, Fonte dati: MAPA-Nielsen)

#### 4.7 Le caratteristiche dell'acido citrico: un additivo alimentare

Allo stato secco, l'acido citrico forma cristalli rombici di gusto leggermente acido. Somministrato in piccole dosi promuove la rigenerazione ossea, in dosi elevate ha effetti tossici (per i ratti: letalità al 50% con 3 gr/kg). Si tratta di una molecola organica del gruppo degli acidi carbossilici. L'acido citrico è uno degli acidi più diffusi negli organismi vegetali ed è un prodotto metabolico di tutti quelli aerobici. Il succo di limone ne contiene il 5-7%, ma è presente quasi in tutta la frutta, nei legni, nei funghi, nel tabacco, nel vino e persino nel latte. L'importanza dell'acido citrico è data dal fatto che è un importante prodotto intermedio nel catabolismo dei carboidrati di tutti gli esseri viventi aerobici (incluso l'uomo). Il relativo processo biochimico prende il nome di ciclo di Krebs.

In origine l'acido citrico lo si ricavava dal succo di limone (*Citrus limon L.*) attraverso un complesso processo con soluzione di ammoniaca, cloruro di calcio e acido solforico. Venne isolato la prima volta nel 1784 da Carl Wilhelm Scheele. Attualmente lo si produce da colture di *Aspergillus niger* geneticamente modificato in bioreattori a basso pH ambientale (acidulato) e scarsità di ferro. In questo modo il ciclo dei citrati è disturbato per cui il fungo espelle acido citrico.

- Nell'industria alimentare è usato (con la denominazione **E 330**) come acidulante e conservante.
- In campo farmaceutico viene usato come:
  - anticoagulante nella conservazione del sangue estratto
  - farmaco contro certi tipi di calcoli renali (citrato di sodio)
  - rimedio metabolico per abbassare l'acidità dell'organismo (citrati di diversi minerali)
  - antiacido
  - come conservante in preparati farmaceutici (medicinali)
- Nei detersivi viene usato come agente sequestrante del calcio, per ridurre gli effetti della durezza dell'acqua.

#### 4.8 Gli agrumi

Con il termine agrumi si intendono le piante coltivate, appartenenti alla famiglia delle *Rutaceae*, sottofamiglia *Aurantioideae* ed i loro frutti. Ne fanno parte i seguenti generi:

- *Citrus*: arancio, limone, pompelmo, mandarino, pomelo, cedro, clementina, bergamotto, chinotto, combava, limetta, arancio amaro
- *Fortunella* (Kumquat): *Fortunella crassifolia*, *Fortunella hindsii*, *Fortunella japonica*, *Fortunella margarita*, *Fortunella obovata*, *Fortunella polyandra*
- *Poncirus trifoliata*

Sebbene la sottofamiglia comprenda solo tre generi e solo diciotto specie esattamente definite e stabili, esistono molte varianti e mutazioni naturali, sia nell'infiorescenza come nei frutti, per cui si trovano vari tipi di agrumi in molte parti del mondo. Oltre a ciò sono stati sviluppati numerosissimi ibridi, alcuni dei quali con caratteristiche non durevoli, per cui si trovano sul mercato solo per tempi relativamente brevi.

#### 4.8.1 Il bergamotto

Il bergamotto è un agrume classificato come *Citrus bergamia* Risso, appartenente alla famiglia delle Rutaceae, genere Citrus. Il frutto ha forma sferica, con un peso medio di 100 g, il colore alla maturazione è giallo. La fioritura avviene nel mese di Aprile ed i frutti sono raccolti da Novembre a Marzo. Il suo habitat più idoneo ed esclusivo è costituito dalla sottile striscia costiera, lunga un centinaio di chilometri, che si estende tra Villa San Giovanni e Gioiosa Ionica, in provincia di Reggio Calabria.

L'origine del Bergamotto è incerta. I più sostengono che esso derivi da mutazione di altra specie agrumaria (limetta e/o arancia amara). Per quanto attiene la provenienza, la leggenda vorrebbe far derivare il bergamotto dalle Isole Canarie, dove sarebbe stato importato da Cristoforo Colombo.

La superficie attualmente coltivata a bergamotto è di circa 1500 ha, con una produzione media di 100.000 kg di essenza. Le principali cultivar di Bergamotto sono: Castagnaro, Femminello e Fantastico [94].

Il primo bergamotteto di cui si ha notizie venne impiantato nella vicinanza di Reggio Calabria, nel 1750. A quei tempi l'essenza veniva estratta per pressione manuale dalla scorza del frutto e fatta assorbire da spugne naturali collocate su appositi recipienti. Attualmente l'essenza viene ricavata per abrasione mediante sistema di grattugie e nelle apposite "pelatrici" dalla parte superficiali dei frutti.

L'olio essenziale di bergamotto è indispensabile nell'industria profumiera internazionale, avendo la funzione di fissare il bouquet aromatico dei profumi e di armonizzare le altre essenze contenute esaltandone le note di freschezza e fragranza [94]. Oltre che nella vasta gamma di acqua di colonia, profumi, deodoranti, saponi ad alto potere disinfettante, dentrifici, l'essenza di bergamotto viene impiegata nell'industria farmaceutica per il suo potere antisettico ed antibatterico, nella sepsi chirurgica, in odontoiatria, oftalmologia, ginecologia e dermatologia, tanto da essere inserito nella farmacopea di diversi paesi [94]

L'essenza è infine usata nell'industria alimentare e dolciaria come aromatizzante di liquori, the, caramelle, canditi, gelati e bibite [94].

Negli ultimi anni il bergamotto è stato anche studiato per il suo alto contenuto in flavonoidi, sostanze polifenoliche note per la loro spiccata attività antiossidante, anticancro, antivirale, antinfiammatorie e per il loro effetto sulla fragilità capillare [95,96] Altri composti studiati sono le furocumarine quali bergaptene e bergamottina: in

particolare quest'ultima si è rivelata avere importanti attività farmacologiche in quanto inibitore dei trasportatori di calcio [97,98-] ed ha inoltre la capacità di dilatare le arterie coronarie [99,100] tale sostanza può essere quindi sfruttata anche in medicina nella branca della cardiologia [101] e nella cura delle disfunzioni cardiache. Altre sostanze contenute nel bergamotto sono il terpineolo e il limonene, un terpene, aventi proprietà antinfiammatorie e disinfettanti.

Secondi recenti studi inoltre gli oli essenziali del bergamotto agirebbero a livello dei neurotrasmettitori della membrana neuronale, con meccanismi simili a quelli dei farmaci antidepressivi.



Figura 2 - Pianta di Bergamotto (*Citrus bergamia risso L.*)  
Melito Porto Salvo (RC)

#### **4.8.2 Il limone**

Il limone (*Citrus limon L.*), appartiene alla famiglia delle *Rutaceae*, genere *Citrus*, è originario dell'India e dell'Indocina. Secondo alcune teorie è un ibrido naturale tra il cedro (*Citrus medica L.*) ed il lime (*Citrus Aurantifolia L.*).

L'albero del limone può essere alto fino a 6 m, ha un portamento aperto e i rami sono normalmente spinosi. Le foglie sono alterne, rossastre da giovani e successivamente verde scuro sopra e più chiare sotto, generalmente ellittiche.

I fiori, molto profumati, possono essere solitari o in coppie, all'ascella delle foglie, in condizioni climatiche favorevoli sono praticamente prodotti tutto l'anno, è infatti una specie rifiorente. I flussi principali di fioritura sono in primavera, con la produzione di limoni in inverno.

I frutti sono ovali, oppure oblungi con apici appuntiti, normalmente la buccia è gialla, ma ci sono varietà variegata di verde o di bianco, ricca di oli essenziali, può essere più o

meno sottile: la polpa è divisa in otto-dieci spicchi, generalmente è molto aspra e succosa; molte varietà sono prive di semi.

Le cultivar italiane di maggior interesse sono: Femminello comune, Monachello, Interdonato, Femminello Zagara Bianca, Femminello Siracusano, Femminello Apireno, Continello. Le cultivar straniere di maggior interesse: Eureka, Lisbon, Verna, Mesero, Gallego, Genoa.

#### **4.9 Alimenti funzionali e nutraceutici**

Per “alimenti funzionali” si intendono alimenti naturali in cui siano presenti composti (nutrienti, e soprattutto non nutrienti) che possano modulare le funzioni cellulari e potenziare i sistemi di difesa dell’organismo [102]

Alcuni cibi possono apportare benefici effettivi alla salute che vanno al di là di quelli derivanti dalle sostanze nutritive “tradizionali”, sono i cosiddetti cibi “funzionali”, ormai di moda anche in Europa, sull’onda dei successi riscossi prima in Giappone e poi negli Stati Uniti. Il pericolo, come sempre, è che si abusò della definizione “funzionale” e si finisca per attribuirle anche a cibi dalle qualità meno nobili. Questo pericolo è infatti reale, ad esempio negli Stati Uniti, un cibo per essere etichettato come funzionale, non deve passare alcun esame, né sottostare ad alcuna verifica o rispondere a criteri rigidamente definiti dalle autorità di controllo. L’unico modo che hanno i consumatori americani per verificare se un alimento è dotato o meno delle caratteristiche funzionali riportate, è quella di cercare se nell’etichetta è presente o meno la cosiddetta “health claims”, rivendicazione salutistica o affermazione relativa ai presunti effetti sullo stato di salute o su alcuni stati patologici, che possono apparire solo previa approvazione della FDA (Food and Drug Administration). Lo scorso anno anche l’Unione Europea ha prodotto una bozza di legge in materia di health claims, stabilendo un minimo di ordine e di rigore su quello che può comparire in etichetta. Non sono quindi ammessi gli slogan del tipo “mantiene giovani”, “migliora la memoria”, “riduce l’assorbimento di calorie” ed altro di questo tipo ed anche le definizioni “a basso contenuto calorico” e “ad elevato contenuto proteico”, se non conformi ai nuovi standard stabiliti dalla Unione Europea. Questa iniziativa si è resa necessaria perché nel campo degli alimenti funzionali regnava troppo caos, per poter in questo modo tutelare i consumatori e poter fare in modo che le diciture sulle etichette non fossero fuorvianti. E’ stata fatta una netta

divisione tra gli “health claims” collaudati e quelli più recenti che dovranno aspettare la piena validazione della European Food Safety Authority, prima di essere utilizzati come strumento di marketing.

Esistono anche i cibi fortificati, tipi particolari di cibi funzionali, nei quali a volte vengono aggiunti nutrienti andati persi in fase di preparazione (ad esempio, la tiamina nelle farine integrali), oppure vengono addizionati ex-novo perchè poco o per nulla presenti nell'alimento, come ad esempio i corn-flakes con aggiunta di ferro (British Nutrition Foundation). Nella ricca gamma dei prodotti funzionali si inseriscono anche gli oli dotati di particolari caratteristiche nutrizionali destinati all'integrazione alimentare e venduti in farmacia e nelle erboristerie, come gli oli di riso, gli oli di germe di grano, gli oli di pesce, oli di cereali e frutti.

Il mercato di tali alimenti rappresenta già ora una buona fetta del settore, ma c'è la consapevolezza che con il passare del tempo e con una regolamentazione definita ci sarà una diffusione ancora maggiore.

#### **4.10 Il freddo nella conservazione degli alimenti**

L'utilizzazione industriale del freddo per la conservazione degli alimenti risale ad epoche molto recenti e si può dire che questa tecnica abbia raggiunto la sua massima diffusione solamente negli ultimi 50 anni. Il freddo oggi è utilizzato non soltanto come mezzo di conservazione a sè stante, ma anche e soprattutto come metodo di pre-conservazione, consentendo l'utilizzazione di materie prime, precedentemente ottenute, le quali saranno successivamente sottoposte a lavorazioni particolari e quindi conservate, nel tempo, utilizzando anche altri sistemi conservativi [103].

Le basse temperature non svolgono solamente la propria funzione sulla microflora, ma determinano delle modificazioni anche nel prodotto conservato, tanto è vero che tutti gli alimenti presentano un limite massimo di conservabilità oltre il quale l'alimento non può più essere conservato senza la comparsa di fenomeni alterativi che rendono il prodotto stesso non gradito al consumatore [103].

Il freddo nell'industria alimentare in genere, trova la sua applicazione in tre procedimenti conservativi:

- refrigerazione
- congelamento
- surgelazione

#### 4.10.1 Refrigerazione

La refrigerazione rappresenta uno dei metodi più diffusi della conservazione degli alimenti e può essere utilizzata sia su materie prime che non hanno subito altro trattamento, sia su materie prime precedentemente sottoposte ad altri trattamenti conservativi. Nella refrigerazione la temperatura di stoccaggio delle derrate alimentari oscilla intorno agli 0-2°C. La refrigerazione è il migliore sistema conservativo, poiché con l'utilizzo delle suddette temperature rimangono inalterati tutti i caratteri dei prodotti freschi. Le temperature di refrigerazione, non sono in grado di inibire lo sviluppo di tutti i microrganismi e di inattivare completamente l'azione degli enzimi propri dell'alimento i quali appunto, anche se più lentamente, continueranno a catalizzare le varie reazioni. Come conseguenza dello sviluppo microbico e dell'attività degli enzimi la vita conservativa di questi prodotti è sempre abbastanza limitata nel tempo ed inevitabilmente si alterano [103].

#### 4.10.2 Congelamento

Il congelamento viene utilizzato per la conservazione degli alimenti per un lungo periodo, con questo sistema vengono completamente inibite sia la crescita microbica che l'attività enzimatica. E' una operazione con la quale un alimento viene portato ad una temperatura al di sotto del punto di congelamento ed una parte dell'acqua subisce un cambiamento di stato nella forma di cristalli di ghiaccio.

L'immobilizzazione dell'acqua come ghiaccio e la conseguente concentrazione dei soluti disciolti nell'acqua non congelata riducono l'attività dell'acqua dell'alimento.

La conservazione è quindi legata alla combinazione delle basse temperature e della ridotta attività dell'acqua.

Nel processo di congelamento si distinguono due fasi:

1. fase di *nucleazione* o cristallizzazione (comparsa dei primi cristalli di ghiaccio, oltrepassato il punto crioscopico) (tra 0 e -7°C, con la massima separazione dell'acqua allo stato solido);
2. fase di *accrescimento* dei cristalli.

L'entità della nucleazione e dell'accrescimento sono inversamente proporzionali e dal gioco di questi due fenomeni dipende la struttura del congelato.

Se prevale la nucleazione vi saranno minuscoli cristalli, se invece prevale l'accrescimento avremo pochi cristalli ma molto grossi.

Esistono vari tipi di congelamento:

-Congelamento lento in cui la temperatura a cui viene sottoposto l'alimento non è molto bassa ( -8, -12°C, mai inferiore a -20°C) e la velocità di penetrazione del freddo è ridotta.

In queste condizioni si ha scarsa nucleazione e forte accrescimento: si formano relativamente pochi macrocristalli (con diametro di centinaia di  $\mu\text{m}$ ).

Questo tipo di congelamento è stato del tutto abbandonato in quanto la cristallizzazione dei liquidi in grossi cristalli danneggia i tessuti dell'alimento: il fenomeno ha inizio a carico dei liquidi extracellulari, il liquido intracellulare passa all'esterno per osmosi accrescendo i cristalli che finiscono per rompere le pareti delle cellule.

Il prodotto, una volta scongelato, perde liquidi e non riacquista la sua tessitura originale, si presenta stopposo e sgradevole di sapore.

-Congelamento rapido, che ha sostituito quello lento, l'alimento viene sottoposto a temperature di almeno -30, -50°C od anche più basse (congelamento ultrarapido).

In queste condizioni prevale il fenomeno della nucleazione dei cristalli a scapito dell'accrescimento: si formano numerosissimi microcristalli del diametro di alcuni  $\mu\text{m}$  sia intra che extracellulari, che non rompono le pareti delle cellule. Allo scongelamento l'acqua ritorna a far parte dei sistemi colloidali, l'alimento rimane integro conservando aspetto naturale e valore nutritivo.

Un effetto dell'abbassamento rapido della temperatura all'interno del prodotto, è quello di bloccare prima le reazioni degradative con relativo aumento del tempo di conservazione.

Il congelamento rapido può essere ottenuto secondo vari sistemi:

1. ad aria forzata;
2. per contatto indiretto o a piastra;
3. ad immersione in soluzioni - incongelabili;
4. per aspersione in soluzioni incongelabili;
5. per immersione diretta nel frigorifero;

6. per aspersione diretta del frigorifero.

In particolare:

-I congelatori ad aria forzata sono caratterizzati da una corrente di aria ad alta velocità che attraversa alternativamente l'evaporatore ed il prodotto da congelare sottraendo a quest'ultimo il calore sino a determinarne la congelazione alla temperatura richiesta.

Condizione essenziale per un buon funzionamento dei congelatori ad aria forzata è che la velocità e la distribuzione dell'aria siano tali da assicurare un efficace scambio di calore fra prodotto ed aria, e quindi fra aria ed evaporatore.

-Congelamento a piastra: funziona mediante l'utilizzo di un liquido frigorifero (ammoniaca o freon) che viene fatto espandere ad una temperatura di almeno  $-35^{\circ}\text{C}$  tra due piastre che si trovano a contatto con gli alimenti.

-Metodi di congelamento ad immersione in soluzioni incongelaibili: è uno dei primi metodi adottati. Si utilizzano soluzioni incongelaibili (salamoie) a bassa temperatura.

-Metodi di congelamento per aspersione di soluzioni incongelaibili: il metodo deriva da quello precedente. Con questo tipo di sistema vengono utilizzate salamoie finemente spruzzate sul prodotto, consentendo una maggiore versatilità dell'impianto e la realizzazione di processi in continuo.

-Metodi di congelamento per immersione diretta nel frigorifero: sono utilizzati l'aria liquida, l'azoto liquido e l'anidride carbonica solida in quanto non corrosivi, non tossici e di costo relativamente basso.

-Metodi di congelamento per aspersione diretta del frigorifero: è una tecnica derivante dall'impiego dell'azoto liquido per immersione.

La surgelazione rappresenta un metodo di conservazione degli alimenti per congelamento rapido.

In letteratura, fino ad oggi, non è stato riportato nulla riguardo il congelamento delle olive prima dell'estrazione dell'olio. Vi sono invece alcuni lavori che trattano della conservazione dell'olio extravergine di oliva mediante l'utilizzo delle basse temperature [104,105].

La produzione dell'olio di oliva è concentrata nel momento della raccolta delle olive e questo rappresenta un problema sia in termini di organizzazione del lavoro, che di sistemazione degli impianti in maniera tale da poter lavorare grandi quantitativi in poco tempo [93]. Molto spesso la concentrazione del lavoro in un tempo limitato può portare alla produzione di oli con difetti, poiché le olive rimangono ammassate per un periodo

superiore alle 24 ore, tempo massimo di stoccaggio per ottenere un olio di qualità [87,88] e si possono così avere indesiderabili fermentazioni che danno origine a oli che presentano il difetto di avvinato o di riscaldamento. Da qui nasce la scelta di valutare l'effetto del congelamento delle olive su diversi ed importanti parametri qualitativi (acidità libera, numero di perossido, contenuto in composti fenolici mediante spettrofotometria e HPLC-DAD/MSD, contenuto in *o*-difenoli, stabilità ossidativa mediante Oxidative Stability Instrument, potere antiossidante mediante test antiradicalici ABTS e DPPH) dei rispettivi oli (campioni ottenuti da materia prima congelata, lavorata ancora congelata e lavorata previo scongelamento). Infatti, due importanti ragioni potrebbero giustificare la scelta del congelamento delle olive:

- 1) Lavorare le olive al giusto grado di maturazione, evitando ammassamenti della materia prima.
- 2) Razionalizzare il lavoro negli impianti di estrazione dell'olio di oliva.

In letteratura è possibile trovare lavori riguardanti il congelamento di diversi frutti, in quanto molti di essi hanno un periodo di raccolta limitata; al fine di poter aumentare la loro disponibilità sono necessarie alcune forme di conservazione ed il processo di congelamento può provvedere ad estendere significativamente la shelf life di numerosi frutti.

Suutarinen e altri co-autori [106], hanno studiato gli effetti sulla texture di fragole conservate mediante il processo di congelamento ed hanno evidenziato come quest'ultimo causi un eccessivo ammorbidimento e umidità del prodotto. La grande suscettibilità della fragola ai danni della texture è dovuta al basso contenuto di sostanze solide, alla grandezza delle cellule e alle pareti cellulari troppo sottili.

I frutti sono fonti di diversi composti antiossidanti, quali polifenoli, carotenoidi e vitamine. La conservazione dei frutti attraverso il congelamento e l'effetto di questo processo sui vari composti antiossidanti è stata oggetto di recenti investigazioni [107]; infatti è stato valutato l'effetto della conservazione mediante il congelamento sulla concentrazione dei fenoli totali delle pesche. I frutti una volta raccolti, sono stati sbucciati, denocciolati, affettati e conservati a -12°C per un periodo di tre mesi. È stato osservato un aumento statisticamente significativo dei composti fenolici totali a seguito del congelamento. Si è quindi ipotizzato che il processo di congelamento possa influire sulla rottura delle pareti cellulari facilitando l'estrazione dei composti fenolici.

L'effetto del congelamento sui diversi composti fissi e volatili del lampone è stato oggetto di due lavori [108,109].

Questi autori hanno confrontato due cultivar precoci e due cultivar tardive trovando differenti effetti del congelamento. Infatti nelle cultivar precoci, il congelamento ha comportato un aumento del contenuto in antocianine, mentre nelle cultivar tardive, che inizialmente presentavano un'alta concentrazione di antocianine, il congelamento ha causato una sostanziale riduzione di queste sostanze. Gli autori suggeriscono che la preservazione delle antocianine durante il congelamento dipenda dal pH dei frutti, dal contenuto in acidi organici, dalla concentrazione degli zuccheri e dalla concentrazione iniziale delle antocianine stesse. In questi studi è stato inoltre evidenziato come il congelamento possa avere un diverso effetto sull'acido ellagico, sulla Vitamina C e sui fenoli totali a seconda delle cultivar di lamponi. La capacità di "free capacity scavenger" è stata vista diminuire a seguito del processo di congelamento dal 4 al 26% a seconda della cultivar. Il congelamento dei lamponi a  $-20^{\circ}\text{C}$  per un periodo di un anno non ha influenzato i fenoli totali, la capacità "free radical scavenging", ma ha invece causato una diminuzione in acido ellagico e Vitamina C.

In un altro studio riguardante l'effetto del congelamento del lampone sui composti fenolici, ellegitannini, flavonoidi e capacità antiossidante [110] è stato trovato che la capacità antiossidante e il livello di Vitamina C non sono influenzati dal congelamento; ma le cultivar utilizzate in questo studio erano diverse da quelle utilizzate nel lavoro precedentemente citato, e questo fattore potrebbe aver causato questo tipo di differenze. Si può sottolineare come la conservazione mediante congelamento di frutti e vegetali sia meno distruttiva nei confronti di alcuni composti antiossidanti in particolare fenoli totali e acido ascorbico [107]

#### **4.11 Alimentazione e patologie di tipo neoplastico**

Il cancro è la seconda causa principale di morte, dopo le malattie cardiovascolari, negli Stati Uniti e in molti paesi occidentali industrializzati e in via di sviluppo.

Malgrado i molti passi avanti fatti in campo terapeutico per la comprensione dei processi nella carcinogenesi, c'è stato un aumento costante del tasso di mortalità causata dal cancro durante gli ultimi 50 anni. E' stato comunque accertato come la diagnosi precoce ed i miglioramenti del trattamento della patologia stessa possano essere probabilmente responsabile della costante anche se modesta diminuzione della mortalità (in relazione all'età) del cancro negli Stati Uniti negli ultimi 10 anni [111].

L'invecchiamento delle popolazioni e gli importanti successi raggiunti nel trattamento delle malattie cardiovascolari stanno quindi spostando il problema dello studio delle malattie terminali verso quello dei tumori. E' stato stimato che l'incidenza dei nuovi casi di neoplasie raddoppierà nei prossimi 30 anni. È quindi inevitabile che, se da un lato la gestione di lunga durata di queste patologie richieda sforzi concordati al fine di ridurre il rischio di ammalarsi, dall'altro è necessario continuare in modo intenso la ricerca dei trattamenti più efficaci per abbassare l'incidenza di mortalità.

La riduzione di rischio comprende le seguenti due strategie:

- 1) prevenzione, cioè, la riduzione dell'esposizione agli agenti cancerogeni (ad esempio il fumo e l'esposizione alle radiazioni)
- 2) protezione, cioè, l'intervento intenzionale per aumentare principalmente i meccanismi endogeni che riducono il rischio dovuto all'esposizione agli agenti cancerogeni. [111]

Potrebbe essere importante puntare sulla gestione a lungo termine, quindi sulla qualità della vita del malato, identificando e gestendo in modo efficace gli agenti chemioprotettivi di bassa tossicità già presenti nella dieta umana.

Le statistiche indicano che gli uomini sono colpiti prevalentemente dal cancro al polmone, al retto e alla prostata mentre nelle donne sono frequenti i tumori al seno, al colon retto e allo stomaco [112,113]. . Anche se l'eziologia del cancro può essere multifattoriale (per esempio dieta, fattori genetici, ambientali, sessuali, stili di vita), è largamente riconosciuto che le specie reattive dell'azoto e dell'ossigeno (ROS/RNS) svolgono un ruolo chiave nel processo patofisiologico. I ROS e i RNS hanno infatti mostrato essere cancerogeni causando danni al DNA, alterando le comunicazioni cellulari e modulando l'espressione dei geni [113].

Molteplici studi epidemiologici suggeriscono come una dieta ricca in antiossidanti eserciti un ruolo protettivo nei confronti di diverse malattie. Un consumo frequente di frutti e vegetali è associato ad un basso rischio di cancro , malattie cardiovascolari ed ipertensione [114-116]

Già nel 1997 l' American Institute for Cancer Research di Washington sosteneva che circa il 7-31% di tutte le patologie di tipo neoplastico potevano essere ridotte attraverso diete ad alto contenuto di frutta e vegetali.

Potishman & Brinton in un lavoro del 2006 [117], riguardante i tumori dell'utero hanno evidenziato come questa tipologia di neoplasia, sia correlata alla bassa assunzione di carotenoidi ed in particolar modo di Vitamina C. E' stato più volte evidenziato come l'assunzione di frutta ,vegetali, carotenoidi, Vitamina C, Vitamina E, possa avere un effetto preventivo contro l'insorgenza di questa patologia.[118-119]. La frutta e i vegetali sono infatti fonte di numerosissimi composti biologicamente attivi che si presentano diversi tra di loro nelle strutture chimiche e nelle funzioni.

Tabella 5: Frutti e vegetali e principali componenti bioattivi presenti

ALIMENTI	COMPONENTI BIOATTIVI
<b>FRUTTI E VEGETALI</b>	
Pomodori	Licopene, vitamina C
Uva	Catechina, resveratolo
Te , Cioccolata	Catechine, epicatechine, epigallocatechina gallato
Curcuma	Curcumina
Aloe	Emodina
Melograno	Acido Ellagico
Agrumi (buccia)	D-limonene, geraniolo, mentolo, carvone
Agrumi (frutto)	Tangeritina, nobiletina, rutina, vitamina C
Arachidi	Tasifolina
Carciofo	Silimarina
Aglione, Cipolla, Erba Cipollina, Porro	Diallil sulfide, allil metil trisulfide, allicina, ajoene
rafano	Sinigrina
Peperoncino	Capsicina
Fragola, lampone, mora,	Acido caffeico, acido ferulico, acido ellagico
Cereali, legumi	Genisteina
Semi di mostarda	Sinigrina, acido fenolico
Propoli di Miele d'api	Acido caffeico, acido caffeico fenolico, tocoferoli
<b>ESTRATTI DI PIANTE</b>	
<i>Pinus Pinaster</i>	Acido Ferulico, proantocianina, pignogenolo
<i>Curcuma Longa L.</i>	Curcumina, esculetina
<i>Rosmarinus Officinalis</i>	Acido carnosico, acido rosmarinico

Molte di queste sostanze possiedono potenziali proprietà chemiopreventive [120-122]. Un esempio è dato da come il licopene, carotenoide dotato di elevate proprietà antiossidanti, contenuto nei pomodori e in alcuni frutti (anguria e papaia ad esempio), possa essere importante nella prevenzione di varie forme di cancro, tra cui quello della prostata, della cervice, dello stomaco, della vescica e del colon. Studi recenti, hanno dimostrato come il pomodoro, specialmente quello lavorato, consumato con una frequenza di circa cinque - sette volte alla settimana, sia associabile ad una riduzione di circa il 30-40% del rischio del tumore alla prostata [123-126].

Anche le crocifere hanno degli importanti effetti nella riduzione del rischio di molte tipologie di tumori. Le specie appartenenti a questa famiglia di vegetali sono particolarmente ricche in glucosinolati, che sono convertiti dalla mirosinasi della pianta e dalla microflora gastrointestinale in isotiocianati. E' stato dimostrato utilizzando dei modelli animali, che un certo numero di isotiocianati e un numero limitato di glucosinolati contrastano efficacemente la carcinogenesi chimica [111]. A dimostrazione di questo in letteratura è possibile trovare diversi studi che mostrano come siano effettivamente state riscontrate delle riduzioni di incidenza delle patologie come il tumore della prostata [127,128], del seno, [129] e dei linfomi (no-Hodgkin) delle donne [130] in associazione ad un aumentato apporto di vegetali appartenenti alla famiglia delle crocifere.

Altre ricerche evidenziano come anche i composti organosolforati presenti nell'aglio e nelle cipolle, ed i monoterpeni negli agrumi e nelle ciliege abbiano attività anticarcinogeniche [113].

#### **4.11.1 Utilizzo di tecniche cromatografiche nell'analisi della frazione lipidica in tessuti umani sani e neoplastici.**

E' stato recentemente riportato in letteratura come lipidi cellulari evidenziati attraverso la spettroscopia di risonanza nucleare magnetica (NMR) rivestano una importanza strategica da un punto di vista funzionale e metabolico [131-133]. Se da un lato questi lipidi sono stati associati allo sviluppo di cellule neoplastiche maligne e alla morte cellulare, dall'altro sono risultati anche messaggeri di processi benigni quali l'attivazione e la proliferazione di un normale processo di crescita cellulare. Inoltre, alcuni studi hanno messo in evidenza come proprio le "goccioline lipidiche" (lipid bodies) possano essere importanti costituenti intracellulari [132]; con nuove ed

interessanti implicazioni riguardo alla biochimica dei lipidi connessi con la vitalità e la morte cellulare.

Alla luce di questi studi è apparso importante caratterizzare la componente lipidica di tessuti renali funzionali e neoplastici allo scopo di apprezzare le differenze più significative nei casi sani ed in quelli patologici.

Nell'ambito di questa ricerca è nata una collaborazione tra il Dipartimento di Biochimica "G. Moruzzi" ed il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna. Infatti, il gruppo di lipochimica del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, a cui fa capo il Prof. Giovanni Lercker, da sempre si occupa dello studio delle frazioni lipidiche, mediante le principali tecniche cromatografiche. L'obiettivo di questa collaborazione è stato quello di caratterizzare la componente lipidica totale estratta dai tessuti renali umani sani e neoplastici, mediante l'utilizzo combinato di diverse tecniche analitiche: la risonanza magnetica nucleare ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN), la cromatografia su strato sottile (TLC), la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e la gas cromatografia (GC). La ricerca è stata così rivolta allo sviluppo dei seguenti punti:

- Realizzare e ottimizzare una metodica originale *in vitro* che, attraverso l'utilizzo combinato delle tecniche analitiche sopracitate, renda possibile la piena caratterizzazione biochimica della componente lipidica dei tessuti renali sani e dei nefrocarcinomi;
- Identificare e standardizzare una metodica separativa rapida ed efficiente che permetta in tempi brevi di ottenere frazioni lipidiche diverse e qualitativamente distinte per poter ricavare, attraverso l'uso delle tecniche analitiche sopracitate, il maggior numero possibile di informazioni, mantenendo elevati i parametri di precisione e accuratezza del dato fornito;
- Individuare così dati qualitativi e quantitativi sulla variazione dei componenti lipidici nei tessuti renali analizzati.

La scelta di effettuare degli studi su patologie renali di tipo neoplastico si è basata sul fatto che il rene è un organo particolarmente ricco in lipidi. Alterazioni qualitative e quantitative nella composizione lipidica di una neoplasia renale maligna possono costituire informazioni biochimiche non solo utili ma addirittura indispensabili per la migliore comprensione dei risultati.

Diversi studi, effettuati in differenti modelli sperimentali di proliferazione cellulare, hanno correlato la presenza di esteri del colesterolo (CholE) con l'instaurarsi di molti tipi di neoplasie umane [134] Questi risultati hanno ulteriormente contribuito all'investigazione sulla presenza di CholE e le sue implicazioni biochimiche e cliniche in neoplasie renali benigne e maligne in confronto a situazioni non patologiche.

Altri componenti della frazione lipidica ottenuti da tessuti umani sani e tumorali sono stati oggetti di ricerche. In particolare, molta importanza è stata attribuita al rapporto tra gli acidi grassi (FA) essenziali  $\omega$ -6  $\omega$ -3, in relazione alla loro capacità antiproliferativa delle cellule tumorali [135].

Diversi lavori hanno dimostrato come sia determinante condurre un'accurata analisi della composizione e della distribuzione degli acidi grassi saturi ed insaturi, e dei relativi indici di saturazione (SI), al fine di ottenere una completa mappatura del pattern lipidico dei tessuti neoplastici. Molti ricercatori hanno dimostrato che l'assunzione di acidi grassi attraverso la dieta può avere un effetto di promozione o di inibizione su diverse malattie, incluso il cancro.[135]. Questi studi si sono focalizzati sull'analisi della composizione degli acidi grassi nel sangue. Vi sono comunque ricerche che hanno preso in considerazione la composizione e la distribuzione degli acidi grassi in tessuti animali [136-138] o umani [139] sani e neoplastici.

Anche le vitamine liposolubili, quali i tocoferoli, hanno un ruolo nella modulazione della progressione cellulare in tumori umani [135] Sulla base di diversi studi epidemiologici, è stato dimostrato che l' $\alpha$ -tocoferolo gioca un ruolo importante nella prevenzione di malattie, causate da stress di tipo ossidativo [140-142]. Infatti negli ultimi anni il ruolo della Vitamina E, è stato rivalutato non solo per le proprietà nutrizionali ed antiossidanti, ma anche per l'effetto positivo mostrato nella capacità di ridurre l'incidenza di diverse neoplasie umane [143-146]. Alcuni ricercatori hanno dimostrato la presenza di accumuli di  $\alpha$ -tocoferolo in tessuti umani neoplastici [147-150] Questo tipo di studio potrebbe essere di aiuto per comprendere l'attività della perossidazione lipidica nelle lesioni tumorali.

Il Coenzima Q10, conosciuto anche come Ubichinone è una molecola liposolubile, che mostra un'ampia distribuzione cellulare e tissutale e risulta coinvolta in due importanti funzioni: trasporto degli elettroni e dei protoni nella catena respiratoria dei mitocondri ed attività antiossidante [151]. Diverse condizioni patofisiologiche, incluse l'ischemia miocardica, l'angina pectoris, l'ipertiroidismo, l'ipercolesterolemia e l'ipertensione, sembrano influenzare i livelli del Coenzima Q10 [152]. Alla luce di questa evidenza

sono stati effettuati degli studi sulla concentrazione di tale molecola nel sangue, nel plasma [153-155] e direttamente in tessuti umani sani e patologici [156-159].

Gli studi effettuati hanno permesso di rilevare come i livelli di ubiquinone nei tessuti tumorali fossero più bassi rispetto a quelli riscontrati nei tessuti sani corrispondenti. Questo è stato messo in relazione ad un maggior consumo di ubiquinone dovuto all'aumentato stress ossidativo nei tessuti neoplastici. Al riguardo, ricerche condotte su un gruppo di pazienti affette da tumore alla mammella allo scopo di valutare la relazione tra lo stress ossidativo e il livello di sviluppo del tumore, hanno evidenziato una diminuzione della concentrazione di ubiquinone rispetto a quella rilevata nei tessuti sani.

Nel nostro lavoro di ricerca l'analisi della frazione lipidica totale è stata condotta tramite risonanza magnetica nucleare e cromatografia su strato sottile (Thin Layer Chromatography). Le determinazioni della composizione in acidi grassi totali e del colesterolo totale sono state realizzate mediante gas cromatografia. Il contenuto in  $\alpha$ -tocoferolo ed in Coenzima Q10 è stato determinato tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

I materiali e metodi utilizzati in questo lavoro di ricerca, i risultati e discussioni e le relative conclusioni si trovano nelle pubblicazioni allegate.

## 5. Conclusioni

Relativamente ai fattori agronomici non sono state riscontrate delle differenze significative per quanto riguarda il contenuto delle sostanze fenoliche e la stabilità ossidativa di oli extravergini di oliva ottenuti mediante metodi di agricoltura biologica, integrata e convenzionale (paper 1).

Nell'ambito dello "Studio della componente antiossidante di oli ottenuti da olive mediante l'utilizzo di diversi sistemi e parametri tecnologici", l'abbassamento della temperatura delle olive prima dell'estrazione dell'olio ha comportato una riduzione in sostanze antiossidanti e nella stabilità ossidativa dei due campioni ottenuti da olive precedentemente congelate rispetto al campione ottenuto da olive fresche. Confrontando i campioni ottenuti da olive lavorate congelate e quello ottenuto da materia prima lavorata previo scongelamento si è potuto constatare come il campione prodotto da olive ancora congelate fosse caratterizzato da un più alto contenuto in sostanze fenoliche e da una più alta stabilità ossidativa. (paper 3). Relativamente all'aggiunta di coadiuvante in fase di gramolatura (soluzione satura di acido citrico), i campioni così ottenuti erano caratterizzati da un maggior quantitativo di sostanze fenoliche, una maggiore stabilità ossidativa, un più elevato indice di amaro in accordo con gli attributi sensoriali positivi di amaro e piccante percepiti dagli assaggiatori in sede di analisi sensoriale. Lo stesso trend è stato riscontrato nel campione ottenuto con frutti di bergamotto (*Citrus bergamia Risso L.*) interi aggiunti in fasi di frangitura, mentre non è stato riscontrato per il campione ottenuto con frutti di limone (*Citrus Limon L.*) caratterizzato da un quantitativo di sostanze polifenoliche e una stabilità ossidativa inferiore rispetto al campione di controllo ottenuto senza alcuna aggiunta. È importante sottolineare come quest'ultima scelta tecnologica non possa essere utilizzata per l'ottenimento di un olio extravergine di oliva, ma può essere presa in considerazione per l'ottenimento di prodotti funzionali caratterizzati da un elevato contenuto di sostanze antiossidanti. Nell'ambito del confronto dei tre extravergini di oliva, ottenuti con diversi sistemi tecnologici il campione che ha presentato un maggior quantitativo di sostanze antiossidanti, una maggiore stabilità ossidativa ed un più elevato indice di amaro è stato il campione ottenuto mediante il microfrantoio con l'utilizzo del denocciolatore, seguito dal campione ottenuto con lo stesso impianto ma senza la fase del denocciolatore. (paper 4).

Relativamente alla frazione sterolica, nel nostro studio non sono state riscontrate delle differenze significative tra oli extravergini di oliva ottenuti con diverse tecnologie di estrazione e da drupe raccolte in diversi stadi di maturazione . Per quanto concerne il potere antiossidante di queste sostanze non sono stati ottenuti dei dati significativi sulla loro attività. (paper 2).

Per quanto concerne invece lo studio della frazione lipidica dei tessuti sani e neoplastici, il risultato di questi studi conferma l'importanza del ruolo dei lipidi nei processi cellulari, tipici dei tessuti umani. Gli esteri del colesterolo, i fosfolipidi (fosfatidilcolina), vitamine liposolubili ( $\alpha$ -tocoferolo), dolicoli, Coenzima Q10, acidi grassi  $\omega$ 6  $\omega$ 3 e il loro rapporto, mostrano un differente comportamento a seconda che il tessuto sia sano o affetto da una neoplasia. (paper 5-6-7). Questi risultati incoraggiano ulteriori investigazioni per aumentare le conoscenze nell'ambito dei meccanismi dei tessuti neoplastici nei quali sono coinvolti diversi componenti della frazione lipidica.

## 6. Bibliografia

- [1] P. Capella, Fedeli, G. Bonaga, G. Lercker. *Manuale degli oli e dei grassi*. **1997**-Ed. Tecniche Nuove, Milano.
- [2] R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, R. Haubner, G. Wurtele, B. Spiegelhaldar, H. Bartsch. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet* **2000**, 1, 107–112.
- [3] G. Sicheri. *Industrie Agrarie e Agroalimentari*. **2002** , Ed. Hoepli, 4° edizione, Milano, 544-552
- [4] J.B. Rossell. *Frying: Improving quality*. **2001** , Woodhead Publishing Limited, CRC Press, Boca Raton. Boston. New York Washington, DC,
- [5] M. Servili, M. Baldioli, F. Mariotti, G.F. Montedoro Composizione fenolica delle olive ed interazione con il patrimonio enzimatico endogeno del frutto nella composizione fenolica degli oli vergini. *J. Agric. Food Chem* **1998** 451-462.
- [6] M. Vitagliano *Industrie Agrarie*, II edizione UTET 1982.
- [7] P.K Stumpf. Lipid Metabolism. In J. Bonner & J.E. Varner *Plant Biochemistry* **1976** 427-461 New York: Academic Press.
- [8] A. Rotondi Fattori che influenzano la qualità di un olio di oliva – in “*La Qualità dell’olio extravergine di oliva dei colli riminesi: la cultivar Correggiolo*” . – ISTEА, Bologna, **2001** 47-53
- [9] Commission Regulation (EEC), n.2568/1991. On the characteristics of olive oil and olive-residue oil and the relevant methods of analysis: *Off. J. Eur. Comm.*, L248 1-82.
- [10] Commission Regulation (EEC), n.1989/2003. Amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Off. J. Eur. Comm.*, L295 57-77.
- [11] U. Sciancalepore *Industrie agrarie, olearia enologica lattiero casearia* 1998–Ed. UTET, Torino.
- [12] F. Aranda, S. Gómez-Alonso, R.M. Rivera del Alamo, M.D. Salvador, G. Fregapane. Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chem*. **2004**, 86: 485–492

- [13] L. Cercaci, G. Passalacqua, A. Poerio, M.T. Rodriguez Estrada, G.Lercker Composition of total sterols (4-desmethyl-sterols) in extravirgin olive oils obtained with different extraction technologies and their influence on the oil oxidative stability. *Food Chem.* **2007**, 102: 66–76.
- [14] W.H. Ling, P.J.H. Jones Enhanced efficacy of sitostanol-containing versus sitostanol-free phytosterol mixtures in altering of lipoprotein cholesterol levels and synthesis in rats. *Atherosclerosis* **1995**, 118: 319-31.
- [15] R. Aparicio, L. Roda, M. A. Albi, F. Gutierrez Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **1999**, 47: 4150–4155.
- [16] M. Baldioli, M. Servili, G. Perreti, G. F. Montedoro. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, 73: 1589–1593
- [17] L. Cerretani, A. Bendini, B. Biguzzi, G. Lercker e T. Gallina Toschi - Stabilità ossidativa di oli extravergini di oliva ottenuti con diversi impianti tecnologici. *Industrie Alimentari (Chiriotti)* **2003** , 42: 706-71.
- [18] N. Nakatani, Y Tachibana, H, Kokuzaki Establishment of model substrate oil for antioxidant activity assessment by oil stability index method. , *J. Am.Oil Chem Soc* **2001** , 78: 19–23.
- [19] F. Angerosa, & L. Di Giacinto Oxidation of virgin olive oils in relation to the metals. 1. Manganese and nickel. *Revue Franc,ais des Corps Gras*, **1993**, 40: 41–47.
- [20] N. Frega, M. Mozzon, G. Lercker. Effects of free fatty acid on oxidative stability of vegetable oil, *J. Am.Oil Chem Soc*, 76: 325–329.
- [21] F. Gutiérrez-Rosales, S. Perdiguero, R. Gutiérrez, J.M. Olías. Evaluation of. the bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1992**, 69: 394–395.
- [22] D. Boskou, I. D Morton,. Effect of plant sterols on the rate of deterioration of heated oils. *J. Sci. Food Agri.*, **1976** 27: 928–932.
- [23] R.J. Sims, J.A. Fioriti, M. J. Kanuk, Sterol additives as polymerization inhibitor for frying oils. *J. Am.Oil Chem Soc*, **1972** , 49 : 298–301.
- [24] P.J. White, L.S. Armstrong Effect on selected oat sterols on the deterioration of heated soybean oil. *J. Am.Oil Chem Soc.*, **1976** , 63: 525–529.
- [25] M.H. Gordon, P. Magos The effect of sterols on the oxidation of edible oils. *Food Chem.*, **1983** , 10: 141–147.

- [26] R. Bortolomeazzi, F. Cordano, L. Pizzale, L.S. Conte Presence of phytosterol oxides in crude vegetable oils and their fate during refining. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51: 2394–2401.
- [27] P.C. Dutta Studies of phytosterol oxides II: Content in some vegetable oils and in French fries prepared in these oils. *J. Am. Oil Chem Soc.* **1997**, 74 : 659–666.
- [28] A. Grandgirard, L. Martine, C. Joffre P. Juaneda, O. Berdeaux Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives. Application to a phytosterol-enriched food. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1040: 239–250.
- [29] L. Soupas, L. Juntunen, A.M. Lampi, V. Piironen. Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 : 6485–6491.
- [30] A Kornfeldt; L.B. Croon 4-Demethyl-, 4-Monomethyl-And 4,4-Dimethylsterols In Some Vegetable-Oils, **1981**, *Lipids* 16: 306-314
- [31] M. Servili, G. Montedoro. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104: 602–613.
- [32] F. Canzoneri, *Gazz. Chim. Ital.* **1906**, 36, 372.
- [33] Cantarelli. Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **1961**, 38: 69–72.
- [34] G.F. Montedoro, C. Cantarelli. Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse* **1969**, 46, 115–124.
- [35] E. Coni, R. Di Benedetto, M. Di Pasquale, R. Masella, D. Modesti, R. Mattei, E. Carlini, *Lipids* **2000**, 35: 45–54.
- [36] R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, V. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, *Eur. J. Cancer* **2000**, 36: 1235–1247.
- [37] T. Gallina-Toschi, L. Cerretani, A. Bendini, M. Bonoli-Carbognin, G. Lercker Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques. *J. Sep. Sci.* **2005**, 28 859–870.
- [38] J.B. Harbone P.M. Dey *Methods in plant biochemistry* **1989** Harbone JB (ED) Academia Press London (U.K).
- [39] Ucella N in: Spanier AH , Shadidi F, Parliment TH, Mussiman CJ, Ho CT, Treta Conti E in : *Food Flavours and Chemistry: Advances of the new millennium* **2001** . The Royal Society of Chemistry Publishers. Cambridge, (U.K.) 253.

- [40] M. Bonoli, A. Bendini, L. Cerretani, G. Lercker, T. Gallina Toschi. Qualitative and semi-quantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2004** 52: 7026-7032.
- [41] R. Aparicio, G. Luna. Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, 104: 614–627.
- [42] M.J. Motilva, J.M. Tovar, P.M. Romero, S. Alegre, J. Girona. Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80: 2037–2043.
- [43] R. Zamora, M. Alaiz, F.J. Hidalgo. Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49: 4267–427
- [44] A. Rotondi, L. Cerretani, A. Bendini, M. Mari, G. Lercker e T. Gallina Toschi. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil – *J. Agric. Food Chem.* **2004** 52: 3649-3654
- [45] M Bouaziz, S. Chamkha Sayadi. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52: 5476–5481.
- [46] G. Beltrán, M. Paz Aguilera, C. Del Rio, S. Sanchez, L. Martinez. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem.* **2005**, 89: 207–215.
- [47] M.D. Salvador, F. Aranda, S. Gómez-Alonso, G. Fregapane. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chem.* **2003**, 80: 359–366.
- [48] M.J. Tovar, M.P. Romero, J. Girona, M.J. Motilva. L-phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, 82: 892–898.
- [49] R. D’Andria, G. Morelli, G. Martuccio, G. Fontanazza, M. Patumi. Valutazione della produzione e della qualità dell'olio di giovani piante di olivo allevate con diversi regimi idrici. *Italus Hortus* **1996**, 3: 23–31.

- [50] M. Patumi, R. D'Andria, G. Fontanazza, G. Morelli, P. Giorio, G. Sorrentino. Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europaea* L.) under different irrigation regimes. *J. Hort. Sci. Biotech.* **1999**, 74: 729–737.
- [51] M.J. Amiot, A. Fleuriet, J.J. Macheix, Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Agric. Food Chem.* **1986**, 34: 823–826.
- [52] L. Cerretani, A. Bendini, A. Rotondi, M. Mari, G. Lercker, T. Gallina Toschi, Evaluation of the oxidative stability and organoleptic properties of extra-virgin olive oils in relation to olive ripening degree. *Progr. Nutr.* **2004**, 6: 50–56.
- [53] T. Gallina Toschi, B. Biguzzi, L. Cerretani, A. Bendini, A. Rotondi, G. Lercker. Effect of crushing time and temperature of malaxation on the oxidative stability of a monovarietal extra-virgin olive oil, obtained by different industrial processing systems. *Progr. Nutr.* **2004**, 6: 132–138.
- [54] L. Di Giovacchino, N. Costantini, M.L. Ferrante, A. Serraiocco. Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yield and chemical and organoleptic of virgin olive oil obtained o by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas Aceites* **2002**, 53: 179–186.
- [55] L. Cerretani, A. Bendini, A. Rotondi, G. Lercker, T. Gallina Toschi. Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils, obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, 107: 93–100.
- [56] L. Cerretani in: Proc. 9th Workshop Developments in the Italian PhD in Food Science and Technology, University of Parma (Ed.), Parma Italy **2004**, pp. 375–378.
- [57] M. Fito, M.I Covas, R.M Lamuela-Raventos, J.. Vila, C. de la Torre, J. Marrugat. “Olive oil and inhibition of low density lipoprotein oxidation. Role of phenolic compounds.”**2000** *Med. Clin.* 115: 166-169.
- [58] R.Masella, C Giovannini, R. Vari, R. Di Benedetto, E. Coni, R. Volpe, N. Fraone, A. Bucci. Effect of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. **2001** *Lipids*, 36:1195-1202.
- [59] C.M. Aguilera, M.D. Mesa, M.C.Ramirez-Tortosa, M.T. Nestares E. Ros, A. Gil. Sunflower oil does not protect against LDL oxidation as virgin olive oil does in patients with peripheral vascular disease.”*Clin. Nutr.* **2004** , 23:673-681.
- [60] U. Cornelli, B.Berra., N. Frega, M. Gornelli, D. Pacetti. “Squalene: pregi e difetti. Atti IV Congresso Nazionale Acidi Grassi Polinsaturi Omega-3 CLA e antiossidanti. **2003** *Prog. Nutr.*, 5:116-148.

- [61] G. K. Beauchamp, R. S. J. Keast, D. Morel, J. Lin, J. Pika, Q. Han, C.-H. Lee, A. B. Smith, P. A. S. Breslin. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **2005** 437 : 45–46.
- [62] M. Tsimidou, G. Papadopoulos, D. Boskou. Determination of phenolic-compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV-detection. *Food Chem.* **1992**, 44: 53–60.
- [63] A. García, M. Brenes, M.J. Moyano, J. Alba, P. García, A. Garrido. Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation. *J. Food Eng.* **2001**, 48: 189–194.
- [64] F. Caponio, T. Gomes, A. Pasqualone. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *Eur. Food Res. Technol.* **2001**, 212: 329–333.
- [65] P. Andrewes, J.L.H.C. Busch, T. de Joode, A. Groenewegen, H. Alexandre. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51: 1415–1420.
- [66] G. Montedoro, M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Macchioni. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, 41: 2228-2234.
- [67] M. Litridou, J. Linssen, H. Schols, M. Bergmans, M. Posthumus, M. Tsimidou, D. Boskou. Phenolic compounds in virgin olive oils: Fractionation by solid phase extraction and antioxidant activity assessment. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 74: 169-174.
- [68] M. Tsimidou Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.* **1998**, 10: 99-116.
- [69] M. Brenes, A. Garcia, P. Garcia, J.J. Rios, A. Garrido. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47: 3535-3540.
- [70] F. Caponio, V. Alloggio, T. Gomes. Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chem.* **1999**, 64-209.
- [71] M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Macchioni, G. Montedoro. High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-nuclear magnetic resonance characterization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, 76 : 873-882

- [72] D. Caruso, R. Colombo, R. Patelli, F Giavarini, G. Galli. Rapid evaluation of phenolic component profile and analysis of oleuropein aglycon in olive oil by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS). *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48: 1182-1185.
- [73] F. Gutierrez, M.A. Albi, R. Palma, J.J. Rios, J.M. Olias Bitter taste of virgin olive oil: Correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC analysis. *J. Food Sci.* **2000**, 54: 68-70
- [74] F.M. Pirisi, P. Cabras, C.F. Cao, M. Migliorini, M. Muggelli Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48: 1191-1196.
- [75] S.M. Monti, A. Ritieni, R. Sacchi, K. Skog, E. Borgen, V. Fogliano. Characterization 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.* **2001**, 49: 3969-3975.
- [76] R. Leenen, A.J.C. Roodenburg, M.N. Vissers, J.A.E. Schuurbijs, K.P.A.M. Van Putte, S.A. Wiseman, F.H.M.M. Van de Put Supplementation of plasma with olive oil phenols and extracts: Influence on LDL oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 1290-1297.
- [77] Alegria Carrasco-Pancorbo, Lorenzo Cerretani, Alessandra Bendini, Antonio Segura-Carretero, Tullia Gallina-Toschi, Alberto Fernandez-Gutierrez. Analytical determination of polyphenols in olive oils, *J. Sep. Sci.* **2005**, 28: 837-858).
- [78] A. Carrasco-Pancorbo, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, M. Del Carlo, T. Gallina-Toschi, G. Lercker, D. Compagnone, A. Fernandez-Gutierrez, Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53: 8918-8925.
- [79] H. Esterbauer, M. Dieber-Rotheneder, G. Striegl, G. Waeg. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *American Journal of Clinical Nutrition* **1991**, 53: 314S-321S.
- [80] M.G. Traber, L. Packer, 1995. Vitamin E: beyond antioxidant function. *American Journal of Clinical Nutrition* **1995** 62, 1501S.
- [81] D.A. Bender Introduction to Nutrition and Metabolism, second ed. Taylor & Francis, London, **1997** pp. 278-280.
- [82] N.C. Hoglen, S.C. Waller, I.G. Sipes, D.C. Liebler Reactions of peroxynitrite with gamma-tocopherol. **1997**. *Chemical Research in Toxicology* 10 (4), 401-407.

- [83] G. Beltrán, M. Paz Aguilera, C. Del Rio, S. Sanchez, L. Martinez. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem.* **2005**, 89: 207–215.
- [84] R. Mateos, M.M. Dominguez, J.L. Espartero, A. Cert Antioxidant effect of phenolic compounds, a-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J.Agric. Food Chem* **2003** 51: 7170–7175.
- [85] A. Tamendjaria, F. Angerosa, M. M. Bellal. Influence of *Bactrocera oleae* infestation on olive oil quality during ripening of Chemlal olives, *Ital. J. Food Sci.*, (3) 16, **2004** 343-354.
- [86] J. A. Pereira, M. R. Alves, S. Casal, M. B. P. P. Oliveira. Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrancosa, Madural and Verdeal Transmontana, *Ital. J. Food Sci.* **2004** , 16: 355-365.
- [87] F. Angerosa. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* **2002** (9-10) 639-660.
- [88] A. Ranalli. N. Costantini, G. De Mattia, M. L. Ferrante. Evaluation of two kinds of centrifuged virgin oils arising from continuous olive processing. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80: 673-683.
- [89] M. Servili, S. Esposito, R. Selvaggini, S. Urbani, A. Taticchi, G.F. Montedoro "Effetto del processo della denocciolatura sulla qualita' degli oli vergini di oliva e dei prodotti secondari dell'estrazione meccanica" Proceedings of workshop "Olio da paste denocciolate. Nuove acquisizioni e prospettive di valorizzazione dell'olio e dei relativi sottoprodotti". 21 September **2006**, Città S. Angelo (Pescara, Italy).
- [90] A. Del Caro, V. Vacca, M. Poiana, P. Fenu, A. Piga Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. *Food Chem.* **2006**, 98: 311–316.
- [91] M. Saitta, V.Lo Turco, D.Pollicino, G. Dugo, L. Bonaccorsi, P. Amirante Oli di oliva da pasta denocciolata ottenuta da cv Coratina e Paranzana. *Rivista Italiana Sostanze Grasse* **2003**, 80 (1): 27–34.
- [92] M. Servili, R. Selvaggina, S. Esposito, A. Taticchia, G. Montedoroa, G. Morozzi. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054: 113–127.

- [93] G. Cladini, L. Cerretani, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Produzione e consumo di oli di oliva in Italia e Spagna – *L'Informatore Agrario* **2005**, 30: 33-38.
- [94] A. Verzera A. Trozzi, F. Gazea, G. Cicciarello, A. Cotroneo. Effect of rootstock on the composition of bergamot (*Citrus Bergamia* Risso et Poiteau) essential oil. - *J. Agr. Food Chem* **2003**, 51: 206-210.
- [95] O.B Garcia, J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuno, J.A. Del Rio. Uses and properties of Citrus flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* **1997**, 12: 4505-4515.
- [96] M.L. Calabro', V. Galtieri, P. Cutroneo, S. Tommasini, P. Ficarra, R. Ficarra. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, 35: 349-363.
- [97] T. Namba, O. Morita, S.L. Huang, K. Goshima, M. Hattori, M. Kakiuchi. Studies on cardio-active crude drugs: effect of coumarins on cultured myocardial cells *Planta Med* **1998**, 54: 277-282.
- [98] P. Harmala, H. Vuorela, R. Hiltunen. Strategy for the isolation and identification of coumarins with calcium antagonist properties from the roots of *Angelica archangelica*. *Phytochem. Anal.* **1992**, 3: 42-48.
- [99] N. Chandhoke, B. Ray, J. Ghatak. Pharmacological investigations of angelicin, a tranquillo-sedative and anti-convulsant agent. *Indian J. Med. Res.* **1975**, 63: 833-838.
- [100] Y.L. Khadzhai, V.F. Kufnetsova Pharmacology of visnadin. *Chem. Abstr.* **1972**, 83: 664.
- [101] F. Occhiuto, C. Circosta. Investigations to characterize the antiarrhythmic action of bergamottine, a furocoumarine isolated from bergamot oil. - *Phytotherapy Research* **1997**, 11: 450-453.
- [102] C. Cannella A. Pinto Functional food: ruolo di prevenzione e di supporto. - *Il pensiero scientifico*, **2001**, Roma.
- [103] G. Tiecco. *Tecnica conserviera*. Ed. Edagricole, **1986**, Bologna.
- [104] L. Cerretani, A. Bendini, B. Biguzzi, G. Lercker, T. Gallina Toschi . Preliminary investigation on the freezing storage effect on oxidative stability of not filtered extra-virgin olive oil *J of Commodity Science* **2005**, 44:3-15.
- [105] M. Bonoli-Carbognin, L. Cerretani, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Prove di conservazione a diversa temperatura di olio da olive monovarietalì . *Industrie Alimentari* **2005**, 44:1135-1141.

- [106] M. Suutarinen and K. Autio, *VTT Biotechnology*, Finland Improving the texture of frozen fruit:the case of berries *VTT Biotechnology* Finland **2004**, 2-22
- [107] D.K. Asami, Y.J.Hong, D.M. Barrett, A.E. Mitchell. Processing-induced changes in total phenolics and procyanidins in clingstone peaches. *J. Sci. Food Agric* **2003**, 83:56–63.
- [108] B. De Ancos, E. Ibanez, G. Reglero, M.P. Cano. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, 48:873–879.
- [109] B. De Ancos, E. Ibanez, G. Reglero, M.P. Cano. Ellagic acid, Vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2000b**, 48:4565–4570.
- [110] W. Mullen, A.J. Stewart, M.E.J Lean, P. Gardner, G.G. Duthie, A. Crozier. Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 5197–5201.
- [111] P. Talalay, J.W. Fahey. Phytochemical from cruciferous plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. American Institute for Cancer Research 11<sup>th</sup> Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer. *J. Nutr* **2001**, 131: 3027S-3033S.
- [112] M.Abdulla, P.Gruber Role of the diet modification in cancer prevention. *Biofactors* **2000**, 12:45-51.
- [113] M. A. Soobratte, T. Bahorun. Aroma Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors* **2006**, 27:19-35.
- [114] J.A. Vinson, X. Su, L. Zubik, P, Bose. Phenol antioxidant quantity and quality in foods:fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49:5313-5321.
- [115] T. Bahorun, A. Luximon-Ramma, A. Croizer, O. Arouma. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci Food Agric* **2004**, 84:1553-1561.
- [116] J. Lako, V. C. Trenerry , M. Wahlqvist, N. Wattanapenpaiboon, S. Sotheeswaran, R. Premier. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. *Food Chem* **2007**, 101:1727–1741.
- [117] N. Potischman L.A. Brinton. Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer Causes Control* **1996**, 7:113–126.

- [118] World Cancer Research Fund. Food, nutrition and the prevention of cancer. A global perspective. *Washington, DC: American Institute for Cancer Research, 1997*, 301–8.
- [119] R.G.La-Closas, X. Castellsagu, X. Bosch, C.A. Gonzalez. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: A review of recent evidence. *Int. J. Cancer* **2005**, 117:629–637 Wiley-Liss, Inc.
- [120] Y. J. Surh. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Canc.* **2003**, 3:768-780.
- [121] P.M. Kris-Etherton, K.D. Hecker, A. Bonanome, S. M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, T.D. Etherton. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine* **2002** 113:71S-88S.
- [122] O.I Aruoma, T. Bahorun, L.S. Jen. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation research/Reviews in Mutation Research* **2003**, 544:203-215.
- [123] E. Giovannucci, A. Ascherio, E.B. Rimm, M.J. Stampfer, M.J. G.A.Colditz, W.C. Willet. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer *J. Nat. Cancer Inst.* **1995**, 87:1767-76.
- [124] E.Giovannucci, S.K. Clinton. Tomatoes, lycopene, and prostate cancer. *Proc Soc. Exp. Biol. Med.* **1998**, 218:129-139.
- [125] P.K. Mills, W.L Beeson, R.L Phillips, G.E. Fraser. Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer* **1989**, 64:598-604.
- [126] K. Canene-Adams, B.L. Lindshield, S. Wang, E.H. Jeffery, S.K. Clinton, J Erdam jr. Combinantions of tomato and broccoli enhance antitumor activity in dunning R3327-H prostate adenocarcinomas *Cancer Res* **2007**, 67 (2).
- [127] M.G. Jain,G.T. Hislop, G.R Howe,P. Ghadirian. Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutr. Cancer* **1999**, 34: 173–184.
- [128] L.N. Kolonel, J.H Hankin, A.S Whittemore, A.H Wu, R.P Gallagher, L.R. Wilkens, E. John, M. Howe, G. R. Dreon, D. M. West D. W. Paffenberger R. S. Jr. Vegetables,fruits, legumes and prostate cancer: a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2000**, 9: 795–804.
- [129] P. Terry, A. Wolk, I. Persson, C. Magnusson. Brassica vegetables and breast cancer risk *J Am Med Assoc* **2001**, 286:2975-77.

- [130] S.M Zhang, D.J. Hunter, B.A. Rosner, E.L Giovannucci, G.A. Colditz, F.E. Speizer, W.C. Willett. Intake of fruits, vegetables, and related nutrients and the risk of non-Hodgkin's lymphoma among women. *Cancer Epidemiol. Biomark Prev.* **2000**, 9: 477-485.
- [131] J.M. Hakumaki H. Poptani, A.M Sandmair, S.J. Herttuala, R.A. Kauppinen: <sup>1</sup>H MRS detects polyunsaturated fatty acid accumulation during gene therapy of glioma: implications for the *in vivo* detection of apoptosis. *Nat Med* **1999**, 5: 1323-1327.
- [132] J.M Hakumaki R.A. Kauppinen. <sup>1</sup>H NMR visible lipids in the life and death of cells. *Trends Bioch Sci* **2000**, (TIBS) 25: 357-362.
- [133] I. Barba, M.E. Cabanas, C. Arus. The relationship between nuclear magnetic resonance-visible lipids, lipid droplets and cell proliferation in cultured C6 cells. *Cancer Res* **1999**, 59: 1861-1868.
- [134] B. Batetta, A. Pani, M. Putzolu, F. Sanna, R. Bonatesta, S. Piras, O. Spano, M.F. Mulas, S. Dessi. Correlation between cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Prolif* **1999**, 32: 49-61.
- [135] A.P Simopoulos. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr* 21: 495-505.
- [136] A. Colquhoun, K.L Ramos, R. Schumacher. Eicosapentanoic acid and docosahexanoic acid effects on tumour mitochondrial metabolism, acyl CoA metabolism and cell proliferation. *Cell Biochem Funct* **2001**, 19: 97-105.
- [137] T. Kato, R.L. Hancock, H. Mohammadpour, B. McGregor, P. Manalo, S. Khaiboullina, M.R. Hall, L. Pardini and R.S Pardini. Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice. *Canc Lett* **2002**, 187: 169-177.
- [138] A. Colquhoun Gamma-linolenic acid alters the composition of mitochondrial membrane subfractions, decreases outer mitochondrial membrane binding of hexokinase and alters carnitine palmitoyltransferase I properties in the Walker 256 rat tumour. *Biochim Biophys Acta* **2002**, 1583: 74-84.
- [139] F.H. Faas, A.Q Dang, R.F Schefer D.E Johnson: Decreased prostatic arachidonic acid in human prostatic carcinoma. *BJU Int* **2003** 92: 551-554.
- [140] A. Dutta, S.K Dutta Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: a review. *J Am. Coll Nutr.* **2003**, 22: 258-268.

- [141] R. Brigelius-Flohè, F.J. Kelly, J.T. Salonen, J. Neuzil, J.M. Zingg, A. Azzi: The European perspective on vitamin E: current knowledge and future researches. *Am J Clin Nutr* **2002**, 76: 703-716.
- [142] B.M. Winklhofer-Roob, E. Rock, J. Ribalta, D.H. Shmerling, J.M. Roob. Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Mol Aspects Med* **2003**, 24: 391-402,.
- [143] L. Sung, M.L.Greenberg, G. Koren, G.A. Tomlinson, A. Tong., D. Malkin, B.M. Feldman. Vitamin E: the evidence for multiple roles in cancer. *Nutr Cancer* **2003**, 46: 1-14.
- [144] V. Venkateswaran, N.E. Fleshner, L.H. Klotz. Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J Urol* **2002**, 168: 1578-1582,
- [145] M.S. Willis, F.H. Wians. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substance. *Clin Chim Acta* **2003**, 330: 57-83.
- [146] K. Kline, K.A. Lawson W. Yu, B.G. Sanders: Vitamin E and breast cancer prevention: current status and future potential. *J Mamm Gl Biol Neopl* **2003**, 8: 91-102,.
- [147] N.V. Nikiforova, V.I. Kirpatovsky, A.F. Darenkov, A.M. Chumakov, E.A. Sevruko S.P. Darenkov. Liposoluble vitamins E and A in human renal cortex and renal cell carcinomas. *Nephron* **1995**, 69:449-453.
- [148] N.V. Nikiforova, L.A. Khodyreva, V.I. Kirpatovskii, A.M. Chumakov. Lipid peroxidation in malignant tumors of human kidneys. *Bull Exp Biol Med* **2001**, 132: 565-568.
- [149] F. Simone, G. Pappalardo, G. Maiani, A. Guadalaxara, R. Bugianesi Conte AM, E. Azzimi, S.Mobarhan. Accumulation and interactions of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol in patients with adenomatous polyps. *Eur J Clin Nutr* **2002**, 56: 546-550.
- [150] M.R. Tosi, M.T. Rodriguez Estrada, G. Lercker, A. Poerio, A. Trincherio, A. Reggiani, V. Tugnoli. Magnetic Resonance Spectroscopy and Chromatographic methods identify altered lipid composition in human renal neoplasms *International Journal of Mol Med* **2004**, 14 93-100.
- [151] L.Ernest, G. Dallner. Biochemical Physiological and Medical aspects of Ubiquinone Function. *Biochim Biophys Acta* **1995**, 1271: 195-204.

- [152] T. Kamikava, A. Kobayashi, T. Yamashita, H. Hayashi, N. Yamasaki. Effects of Coenzyme Q10: another biochemical alteration linked to infertility in varicocele patients *Metabolism* **2003**, 52:402-406.
- [153] G. Dallner, P.J. Sindelar, Regulation of ubiquinone metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29:285–294.
- [154] C. Weber, A. Bysted, G. Holmer. Coenzyme Q10 in the diet: daily intake and relative bioavailability. *Mol. Aspects Med.* **1997**, 18: 251–254.
- [155] P.R. Palan, M.S. Mikhail, D.W. Shaban, S.L. Romney. Plasma concentrations of coenzyme Q10 and tocopherols in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer, *Eur. J. Cancer Prev.* **2003**, 12:321–326.
- [156] I. Eggens, P.G. Elmberg, P. Low: Polyisoprenoid, cholesterol, and ubiquinone levels in human hepatocellular carcinomas. *J. Exp. Pathol.* **1989**, 70: 83–92.
- [157] F. Aberg, E.L. Appellkvist, G. Dallner, L. Ernster. Distribution and redox states of ubiquinones in rat and human tissues, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 295:230–234.
- [158] O. Portakal, O. Ozkaya, M.E. Inal, B. Bozan, M. Kosan, I. Sayek. Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients, *Clin. Biochem.* **2000**, 33:279–284.
- [159] M.T. Rodriguez Estrada, A. Poerio, M. Mandrioli, G. Lercker, A. Trincherro, M. R. Tosi, V. Tugnoli: Determination of Coenzyme Q 10 in functional and neoplastic human renal tissues *Analytical Biochem* **2006**, 357: 150-152.

