



Università degli Studi di Bologna
(Sede amministrativa)

Università degli Studi di Perugia

(Sede consorziata)



Facoltà di Agraria



Dipartimento di Scienze Economiche-Estimative e degli Alimenti

Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti

Dottorato di Ricerca in Biotecnologie degli Alimenti

Settore scientifico-Disciplinare

AGR/15 Scienze e Tecnologie Alimentari

**VALUTAZIONE DEGLI ANTIOSSIDANTI DELL'OLIO DI OLIVA
MEDIANTE INIEZIONE DIRETTA IN HPLC CON SISTEMA DI
RIVELAZIONE FLUORIMETRICA O SPETTRSCOPIA DI
FLUORESCENZA.**

Dottoranda

Dott.ssa Stefania Urbani

Coordinatore

Prof. Giuseppe Losi

Relatore

Prof. Maurizio Servili

Dottorato XIX ciclo, Anno Accademico 2005/2006

INDICE

	pag
1. Introduzione.	1
1.1. Composizione chimica dell'olio vergine di oliva.	3
1.2. Composizione e biogenesi delle sostanze fenoliche presenti nell'olio vergine di oliva.	7
1.3. Effetto delle condizioni agronomiche e tecnologiche sulla frazione fenolica.	19
1.3.1. Aspetti climatici ed agronomici.	19
1.3.2. Aspetti tecnologici.	22
1.4. Proprietà antiossidanti dei composti fenolici e dei tocoferoli presenti nell'olio vergine di oliva.	42
1.4.1. Proprietà salutistiche dei composti fenolici presenti negli oli vergini di oliva.	45
1.4.2. Proprietà biologiche dei tocoferoli negli oli vergini di oliva.	52
1.5. Proprietà sensoriali della frazione fenolica contenuta nell'olio vergine di oliva.	53
1.6. Separazione dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.	54
1.6.1. Valutazione dei tocoferoli presenti nell'olio vergine di oliva.	63
2. Scopo del lavoro.	65
3. Materiali e metodi.	67
3.1. Materiali.	67
3.2. Metodi.	68
4. Risultati e discussioni.	72
5. Conclusioni.	96
6. Bibliografia.	98
Ringraziamenti.	113

1. INTRODUZIONE

L'olio extravergine di oliva è uno dei prodotti rappresentativi della tradizione e della cultura dei paesi mediterranei. Per anni i consumi e la commercializzazione di questo alimento hanno riguardato principalmente le zone con tradizione olivicola, come Spagna, Portogallo, Grecia, Italia, Turchia, Tunisia, Siria e Marocco; ma oggi la coltivazione dell'olivo si sta sviluppando soprattutto dove il consumo dell'olio vergine di oliva è stato sempre molto modesto come in Australia, Argentina, Sud-Africa, Cile ed Argentina (*Montedoro e Esposto, 2004*).

Gli studi medico-scientifici condotti a riguardo, hanno messo in evidenza i suoi benefici effetti sulla salute. Molti ricercatori hanno dimostrato, infatti, che alcuni composti, principalmente sostanze fenoliche, sono correlati ad una lunga serie di effetti positivi sulla salute umana (*Gurr, 1992; Visioli et al., 1995; Petroni et al., 1996; Manna et al., 1999; aa. vv. 2004*) (intervengono come antiossidanti diretti, abbassano i livelli di colesterolo e inibiscono la perossidazione delle LDL, rallentano la crescita tumorale inibiscono alcuni cancerogeni chimici, rallentano l'aggregazione piastrinica infine svolgono attività anallergica e antinfiammatoria) mentre gli attributi sensoriali dell'olio vergine di oliva sono da imputare alla forte stimolazione dei recettori sensoriali umani provocate sia da sostanze non-volatili sia da sostanze volatili (*Montedoro et al., 1992; Morales et al., 1995; Angerosa et al., 1997; Aparicio et al., 1996; Angerosa e Di Giovacchino, 1996*). Le caratteristiche sensoriali dell'olio vergine di oliva sono legate sia ad aspetti edonistici che alla qualità merceologica. Negli ultimi anni infatti, oltre ad aver assistito ad un miglioramento della qualità salutistica e sensoriale degli extravergini, legato alla maggior attenzione nei riguardi delle innovazioni in campo agronomico e tecnologico, nel settore legislativo si è arrivati in ambito comunitario a varare il Reg.to U.E. 2568/91 (sostituito dai Reg.ti U.E. 1513/01 e 1989/03), che inseriva il Panel Test per l'attribuzione della categoria merceologica di appartenenza ad un olio vergine di oliva., le Indicazioni Geografiche Protette e le attestazioni di specificità. Assumono così particolare importanza le caratteristiche organolettiche degli alimenti (colore, odore, sapore) che sono parametri di notevole interesse commerciale. In questo contesto, per l'olio vergine di oliva, come per ogni altro prodotto tipico,

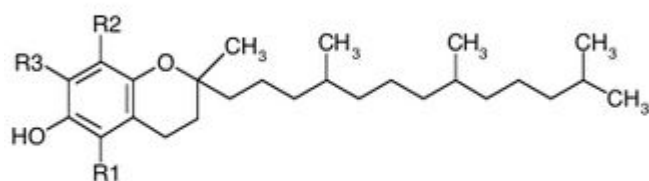
risultano fondamentali le sue caratteristiche olfattive e gustative. I composti volatili e non- volatili vengono trattenuti dalla matrice durante il processo di estrazione meccanica dai frutti di oliva (*Olea europea* L.). Le sostanze non volatili come quelle fenoliche stimolano i recettori gustativi e le terminazioni libere dei nervi trigeminali suscitando prima la sensazione di amaro ed in ultimo le sensazioni di pungenza, astringenza e di metallico (*Whitehead et al., 1985 Morales et al., 2000*). I composti volatili, invece, agendo sui recettori olfattivi, sono responsabili dell'aroma dell'olio vergine di oliva.

1.1. COMPOSIZIONE CHIMICA DEL OLIO VERGINE DI OLIVA

L'olio vergine di oliva si ottiene unicamente per estrazione meccanica, e può essere consumato direttamente, senza alcun ulteriore trattamento fisico-chimico di raffinazione o rettificazione. La sua composizione chimica è rappresentata da una frazione saponificabile e dai componenti che costituiscono la frazione in saponificabile.

Frazione Saponificabile: Come la maggior parte dei grassi vegetali, l'olio di oliva è costituito per il 98-99% da una miscela di gliceridi (esteri del glicerolo con acidi grassi) detta anche frazione saponificabile e, per il rimanente 1-2% da un insieme di composti minori che rappresentano l'insaponificabile. Mentre i componenti della prima frazione, con qualche eccezione di ordine quantitativo, sono pressoché uguali in tutti gli oli di oliva, quelli della seconda, invece, subiscono variazioni qualitative e quantitative molto importanti tali da comportare una netta differenziazione (organolettica, nutrizionale, dietetica e merceologica). Gli acidi grassi sono presenti nell'olio vergine di oliva come costituenti dei trigliceridi, (esteri della glicerina), pochissimi sono gli acidi grassi liberi: quando sono in grandi quantità fanno aumentare il valore dell'acidità, quindi la possibilità degli oli di ossidarsi, a partire dai radicali liberi, rendendo un olio sgradevole. La composizione percentuale degli acidi grassi nell'olio vergine di oliva, varia secondo le condizioni climatiche e agronomiche, si possono comunque riscontrare alcune differenziazioni e similitudini tra oli di regioni diverse. L'acido oleico (C18) è il più abbondante acido grasso presente nell'olio extravergine di oliva. Nella frazione saponificabile, accanto ai trigliceridi sono presenti, sia pure in quantità minime, digliceridi (2-3%) e monogliceridi (0,1-0,2%). I trigliceridi, che in origine si trovano quasi esclusivamente nella polpa delle olive, sono fonte di energia per l'organismo umano, infatti apportano acidi grassi essenziali (non riproducibili dall'organismo), favoriscono l'assorbimento di vitamine liposolubili, hanno azione plastica nella strutturazione delle membrane cellulari, azione funzionale come precursori delle prostaglandine, protettiva (quelli insaturi) per l'azione verso i radicali liberi e il colesterolo nell'organismo.

Frazione Insaponificabile: l'olio vergine di oliva è una sostanza grassa con caratteristiche chimiche peculiari per la sua composizione in componenti minori. A queste sostanze presenti in piccole quantità infatti rappresentano circa l'1-2% del peso dell'olio, corrispondono più di 230 sostanze chimiche appartenenti a diverse classi come alcoli alifatici e terpenici, steroli, cere, idrocarburi, carotenoidi, pigmenti, vitamine, composti volatili, tocoferoli, e sostanze fenoliche. Tra gli idrocarburi è presente lo squalene; tra gli alcoli triterpenici i più importanti sono il cicloartenolo il 24-metilen-cicloartenolo; tra gli steroli il più cospicuo è il β -sitosterolo mentre risulta quasi assente il colesterolo; tra i pigmenti sono da annoverare carotenoidi e clorofille che caratterizzano il colore dell'olio vergine di oliva, infatti le clorofille conferiscono all'olio colore verde mentre i carotenoidi sono responsabili del colore giallo. Tra le vitamine si possono annoverare le liposolubili quali A, D, PP e H. Molti composti volatili, invece sono alla base dell'aroma dell'olio vergine di oliva: ne sono stati identificati più di 180, ma loro correlazione con il flavour del prodotto non è ancora ben conosciuta. Nella frazione insaponificabile ritroviamo in particolare i cosiddetti antiossidanti naturali degli oli vergini di oliva rappresentati dai caroteni, tocoferoli e sostanze fenoliche idrofiliche (Boskou, 1996). Questi antiossidanti sono quelli maggiormente correlati con le proprietà salutistiche dell'olio vergine di oliva. Bisogna altresì ricordare che tocoferoli e carotenoidi si possono trovare in altri grassi vegetali o grassi animali, mentre le sostanze fenoliche idrofiliche sono presenti esclusivamente nell'olio di oliva (Boskou, 1996; Shahidi 1996). I tocoferoli (vitamina E), dell'olio extra vergine di oliva sono costituiti in prevalenza dall' α -tocoferolo che rappresenta circa il 90% dei tocoferoli totali e da quantità minori di β - e γ -tocoferolo e δ -tocoferolo. Tutte e quattro i composti sono caratterizzati dal punto di vista chimico dalla presenza comune dell'anello del cromen-6-olo e da una catena alifatica costituita dal fitile (Rovellini et al., 1997), la disposizione dei gruppi metilici sull'anello del cromen-6-olo permette di distinguere i quattro isomeri vedi Figura 1. I tocoferoli e in particolar modo l' α -tocoferolo (è la forma più attiva) svolgono un importante ruolo come sostanze ad attività antiossidante e vitaminica.



Tocoferolo	R₁	R₂	R₃
α-Tocoferolo	-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃
β-Tocoferolo	-CH ₃	-H	-CH ₃
γ-Tocoferolo	-H	-CH ₃	-CH ₃
δ-Tocoferolo	-H	-H	-CH ₃

Figura 1. Struttura dei tocoferoli presenti nell'olio vergine di oliva.

I composti fenolici sono originati durante il processo di estrazione meccanica dell'olio a partire da alcuni composti presenti nel frutto dell'oliva. Da questo esame si evidenzia, senza ombra di dubbio, che la qualità dell'olio vergine di oliva è diversa da tutte le altre. I motivi sono da ricondurre alle peculiari caratteristiche del frutto e dell'olio ed ai sistemi di estrazione che prevedono l'impiego di una tecnologia solo meccanica. Preme sottolineare a riguardo che sussistono numerose connessioni tra le esigenze richiamate dai nutrizionisti e quanto è riscontrabile nella tipologia degli oli di oliva vergini.

1.2. COMPOSIZIONE E BIOGENESI DELLE SOSTANZE FENOLICHE PRESENTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA.

Le sostanze fenoliche idrofiliche nell'olio vergine di oliva (VOO) furono osservate per la prima volta quaranta anni fa da *Cantarelli* 1961; *Montedoro e Cantarelli*, 1969. I composti fenolici dell'olio vergine di oliva si possono classificare (Tabella 1) in fenil-acidi, fenil-alcoli, flavonoidi, secoiridoidi e lignani. Questi composti si originano durante il processo di estrazione meccanica dell'olio dai polifenoli glucosidici presenti nell'oliva (*Servil et al.*, 1999; *Montedoro et al.*; 2001). Infatti il frutto dell'oliva contiene alte concentrazioni di composti fenolici dall'1-3% del peso fresco della polpa (*Garrido et al.*,1997). Come mostra Tabella 2 le classi di composti presenti nel frutto dell'oliva sono: fenil-acidi, fenil-alcoli, flavonoidi, secoiridoidi. La drupa dell'oliva contiene alte concentrazioni di fenil-alcoli quali (3,4-Diidrossifenil) etanolo (3,4-DHPEA) e (p-idrossifenil) etanolo (p-HPEA) (*Garrido Fernández Díez e Adamos*; 1997; *Vasquez Roncero et al.*,1974). Per quanto riguarda i flavonoidi nel frutto dell'oliva ritroviamo flavonoidi glucosidici quali luteina-7-glucoside e rutina (*Vasquez Roncero et al.*,1974); la drupa è pure ricca di antociani come cianidina e delphinidina glucoside (*Maestro Duran e Vasquez Roncero* , 1976; *Mazza e Miniati.*, 1993; *Marekow*, 1984). I fenil-acidi, fenil-alcoli e flavonoidi, sono presenti in molti frutti e specie vegetali, invece i secoridoidi sono dei composti esclusivi delle piante appartenenti alla famiglia delle *olearupace* che includono *Olea europea L.* quindi il frutto dell'oliva e l'olio vergine di oliva contengono secoridoidi. I composti fenolici classificati come secoridoidi sono caratterizzati dal punto di vista chimico dalla presenza di acido elenolico e dai suoi derivati (*Garrido Fernández Díez e Adamos*; 1997). I secoridoidi più abbondanti nell'oliva sono: l'oleuropeina, demetiloleuropeina, verbascoside e nüzhenide (*Garrido Fernández Díez e Adamos*; 1997; *Gariboldi et al.*,1986). *Bourquelot e Vintilesco*, 1908 furono i primi ad individuare nel frutto dell'oliva la presenza di oleuropeina ma fu *Panizzi et al.*,1960 a determinarne la struttura chimica. La demetiloleuropeina è stata isolata e caratterizzata da *Ragazzi et al.*, 1973 in olive mature, mentre il ligustroside fu separato dall'oliva da *Kubo e Matsumoto* 1984 (Figura 2 e 2 A). Il verbascoside un derivato dell'acido idrossicinnamico fu trovato nella drupa

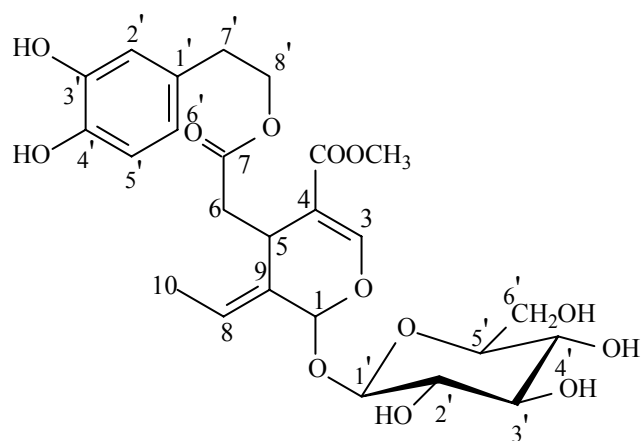
Tabella 1. Composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.

Acidi fenolici e derivati	Idrossi-isocromani	
Acido Vanillico		
Acido Siringico	Alcoli Fenolici	
Acido <i>p</i> -Cumarico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)	
Acido <i>o</i> -Cumarico	<i>p</i> -Idrossifenil)etanolo (p-HPEA)	
Acido Gallico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo-glucoside	
Acido Caffeico		
Acido Protocatechico		
Acido <i>p</i> -Idrossibenzoico	Lignani	flavonoidi
Acido Ferulico		
Acido Cinnammico	(+)-1-Acetossipinoresinolo	Apigenina
4-(acetossietil)-1,2-diidrossibenzene	(+)-Pinoresinolo	Luteolina
Acido Benzoico		
Secoiridoidi		
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA)		
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al <i>p</i> -HPEA (<i>p</i> -HPEA-EDA)		
Oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EA)		
Ligustroside aglicone		
Oleuropeina		
Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone		
Forma dialdeidica del ligustroside aglicone		

Tabella 2. Composti fenolici presenti nel frutto dell'oliva.

Antociani	Flavonoidi
Cianidina-3-glucoside	Quercetina-3-rutinoside
Cianidina-3-rutinoside	
Cianidina-3-caffeilglucoside	Flavoni
Cianidina-3-caffeilrutinoside	Luteolina-7-glucoside
Delfinidina 3-ramnosioglucoside-7-xilosio	Luteolina-5-glucoside
	Apigenina-7-glucoside
Acidi Fenolici	Alcoli Fenolici
Acido clorogenico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)
Acido caffeico	<i>p</i> -(Idrossifenil)etanolo (<i>p</i> -HPEA)
Acido <i>p</i> -idrossibenzoico	
Acido protocatechico	Secoiridoidi
Acido vanillico	Oleuropeina
Acido siringico	Demetioleuropeina
Acido <i>p</i> -cumarico	Ligustroside
Acido <i>o</i> -cumarico	Nüzhenide
Acido ferulico	
Acido sinapico	Derivati dell' Acido Idrossicinnamico
Acido benzoico	Verbascoside
Acido cinnammico	
Acido gallico	

Oleuropeina



Demetiloleuropeina

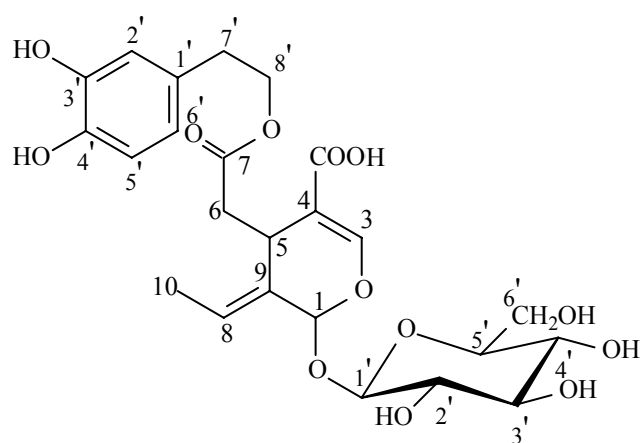
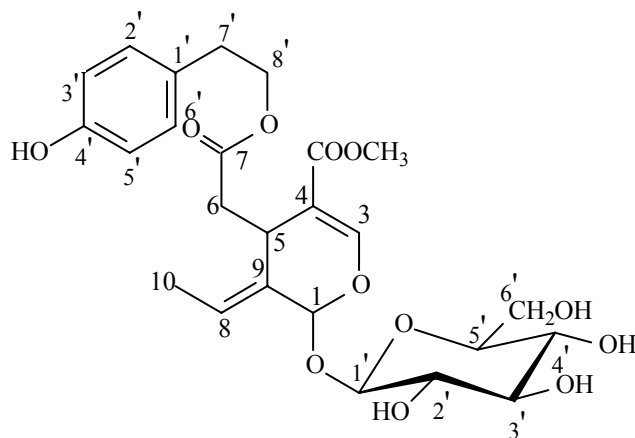


Figura 2. Strutture chimiche dei secoiridoidi glucosidici presenti nel frutto dell'oliva.

Ligustroside



Nüzhenide

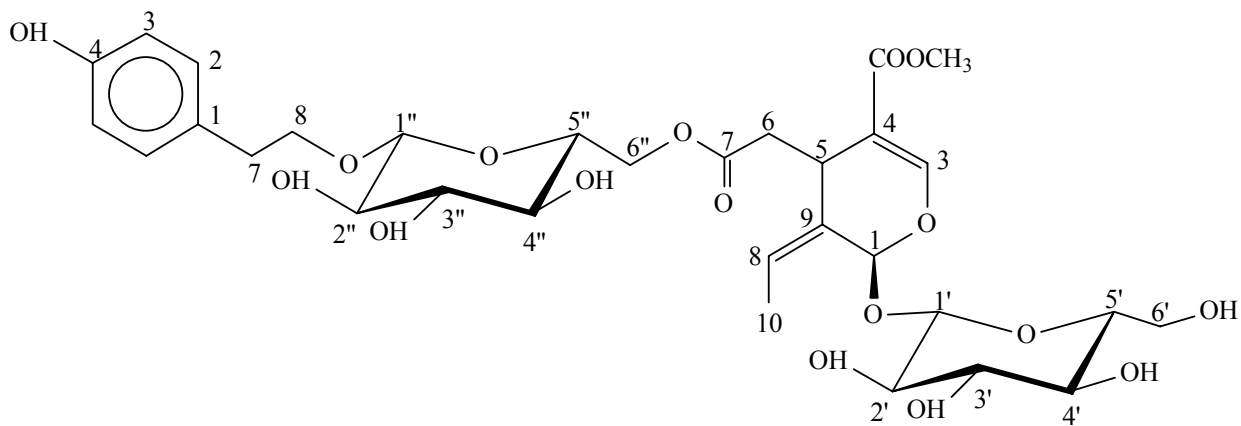


Figura 2 A. Strutture chimiche dei secoiridoidi glucosidici presenti nel frutto dell'oliva.

Verbascoside

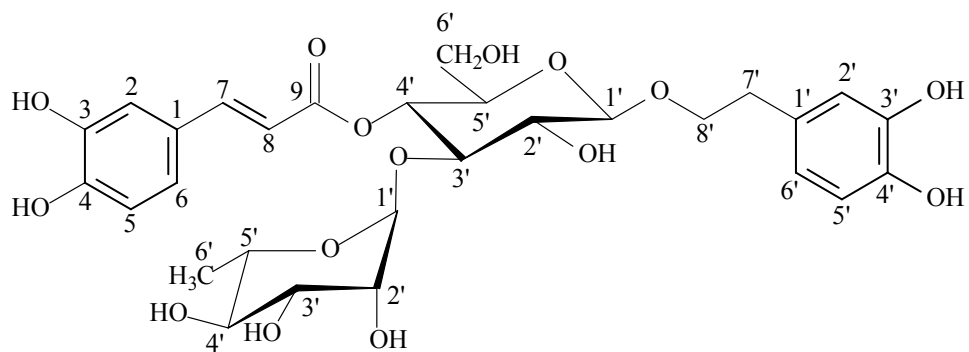


Figura 3. Struttura chimica del principale composto presente nella drupa dell'oliva.

di oliva e la sua struttura chimica è stata determinata da *Andary et al.*, 1982 vedi Figura 3 e successivamente confermata da *Servili et al.*, 1999 I secoiridoidi quali oleuropeina, demetiloleuropeina e verbascoside sono stati ritrovati nelle diverse parti costitutive del frutto dell'oliva (pelle, polpa e seme) al contrario la presenza del nüzhenide è stata riscontrata solo nel seme e la sua struttura chimica venne caratterizzata da *Servili et al.*, 1999 vedi Figura 3. Gli acidi-fenolici presenti nell'oliva derivano dall'acido benzoico e cinnamico (*Garrido Fernández Díez e Adamos;* 1997). A questa classe di composti appartengono l'acido caffeico, vanillico, siringico, *p*-cumarico, *o*-cumarico, protocatechico, sinapico e *p*-idrossibenzoico e sono storicamente i primi composti fenolici ritrovati nell'olio vergine di oliva vedi Figura 4 (*Montedoro* 1972; *Vasquez Roncero.*, 1978). Questi composti sono presenti in minime quantità nell'olio vergine di oliva (*Solinas e Cichelli* 1981; *Cortesi e Fedeli* 1983; *Solinas* 1987; *Montedoro et al.*, 1992; *Tsimidou et al.*, 1996; *Mannino et al.*; 1993), dove invece prevalgono i secoiridoidi. I secoiridoidi presenti in VOO derivano dai secoiridoidi glucosidici presenti nel frutto dell'oliva i composti più abbondanti in VOO sono la forma dialdeidica del acido elenoico legata al 3,4-DHPEA o *p*-HPEA (3,4-DHPEA-EDA o *p*-HPEA-EDA) e un isomero dell'oleuropeina aglicone 3,4-DHPEA-EA) (Figura 5). Questi composti sono stati trovati e caratterizzati nel VOO da *Montedoro et al.*; 1992 *nota 1*; *Montedoro et al.*; 1992 *nota 2*; *Montedoro et al.*; 1993 *nota 3*, le su dette strutture furono in seguito riconfermate da altri autori *Angerosa et al.*; 1995; *Angerosa et al.*; 1996; *Owen et al.*; 2000. I principali fenil-alcoli presenti nel VOO sono (3,4-Diidrossifenil) etanolo (3,4-DHPEA) e (p-idrossifenil) etanolo (p-HPEA) le loro concentrazioni sono generalmente basse nell'olio appena estratto e tendono ad aumentare durante lo stoccaggio (*Montedoro et al.*, 1992), ciò è da imputare a processi di idrolisi a carico dei secoridoidi quali 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA (le strutture molecolari di questi composti contengono 3,4-DHPEA e *p*-HPEA). Recentemente nell'olio vergine di oliva sono stati identificati e caratterizzati un'altro gruppo di sostanze fenoliche i lignani: (+)-1-acetossipinoresinolo, (+)-1-pinoresinolo e (+)-1-idrossipinoresinolo vedi Figura 6 (*Owen et al.*; 2000; *Owen et al.*; 2000). I lignani sono dei potenti agenti antiossidanti inoltre svolgono un azione protettiva nei confronti del tumore al seno, colon e prostata

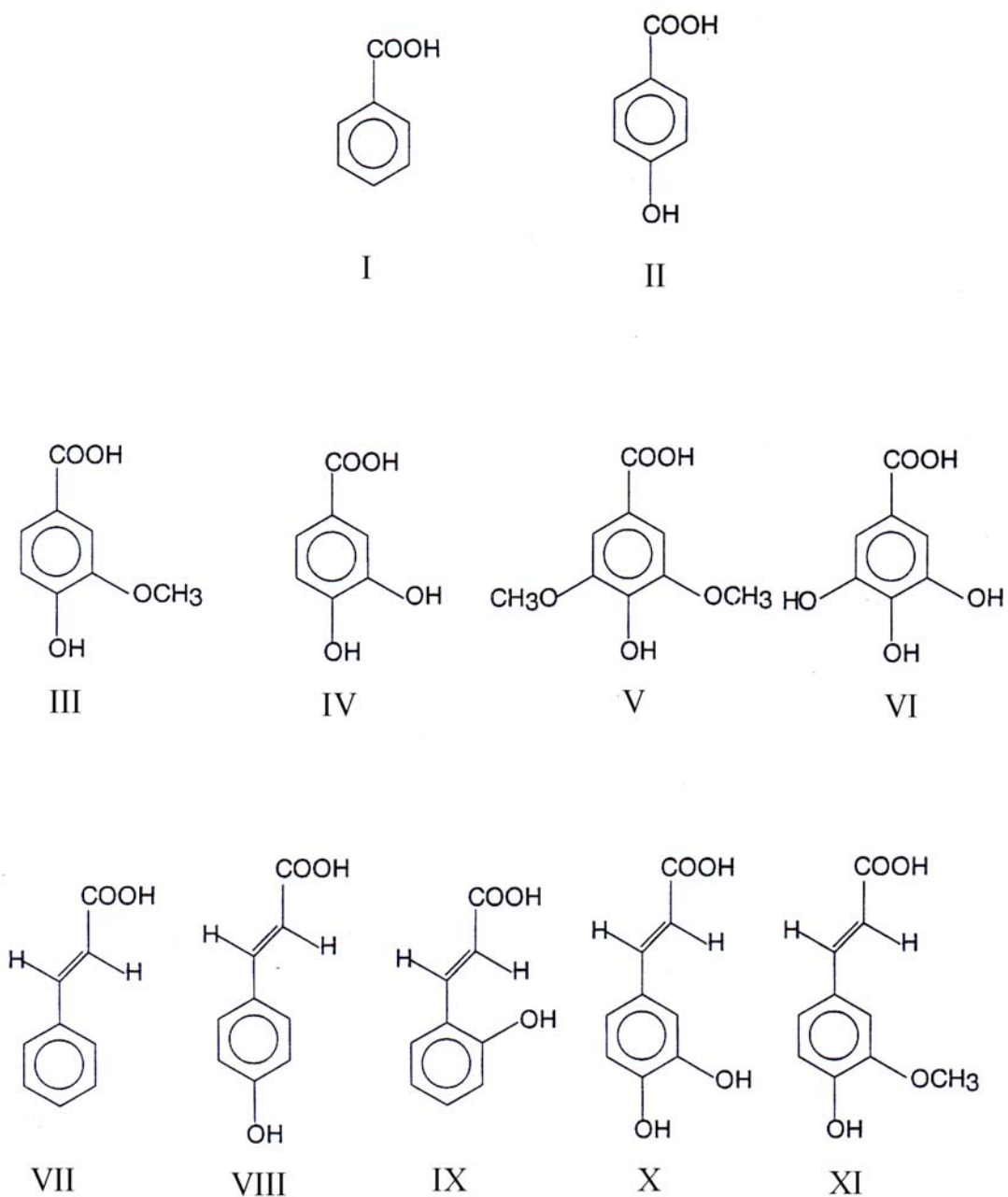
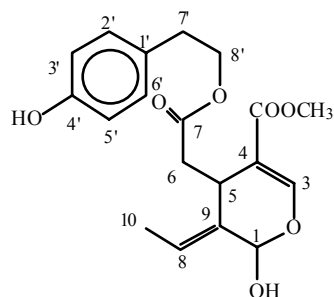
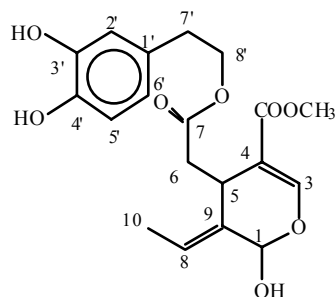


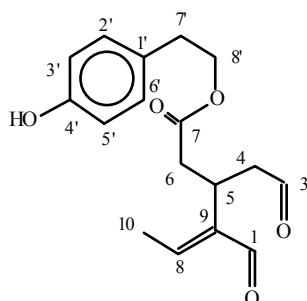
Figura 4. Struttura chimica dei principali acidi fenolici presenti nel VOO. (I) Acido benzoico, (II) acido *p*-idrossibenzoico, (III) acido vanillico, (IV) acido protocatechico, (V) acido siringico, (VI) acido gallico, (VII) acido cinnamico, (VIII) acido *p*-cumarico, (IX) acido *o*-cumarico, (X) acido caffeico, (XI) acido ferulico.



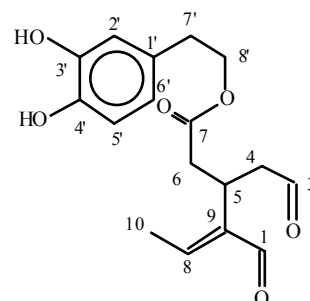
Ligustroside aglicone



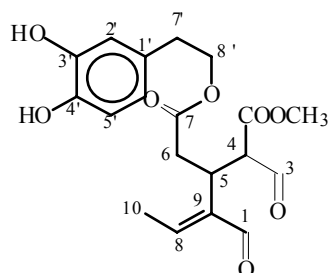
3,4-DHPEA-EA



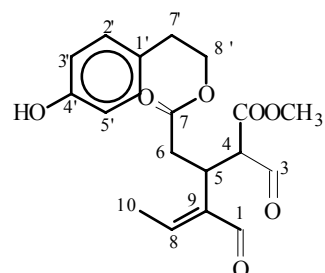
***p*-HPEA-EDA**



3,4-DHPEA-EDA



Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone



Forma dialdeidica del ligustroside aglicone

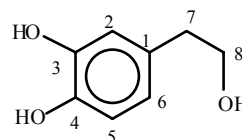
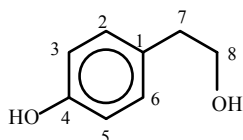


Figura 5. Formule di struttura dei derivati dei secoiridoidi e degli alcoli fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.

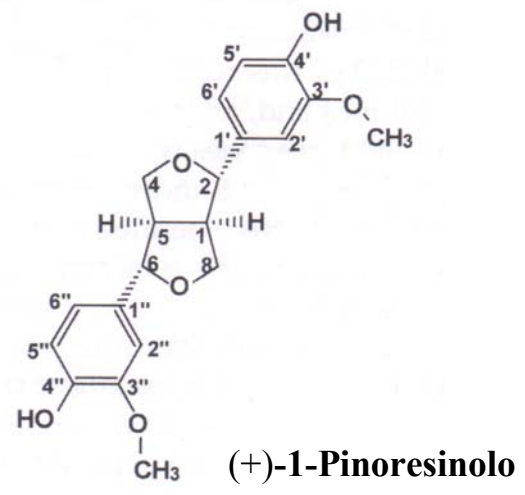
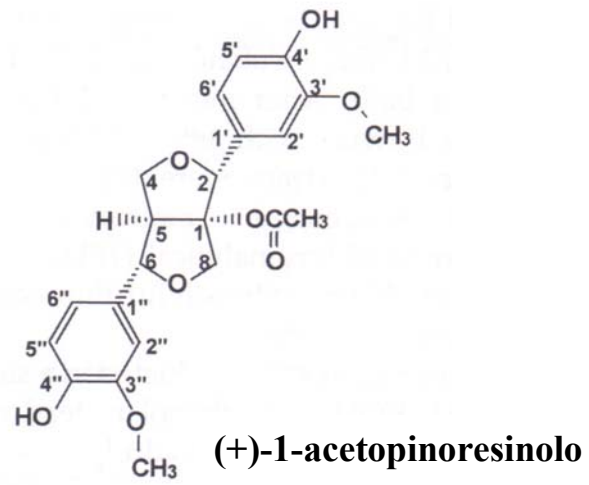


Figura 6. Formule di struttura dei lignani presenti nell'olio vergine di oliva.

La valutazione delle frazioni fenoliche appartenenti a 210 campioni di olio provenienti da diverse aree del mediterraneo ottenuti mediante HPLC, ed espressi come mediana dei derivati dei secoiridoidi e degli alcoli fenolici mostra, (Tabella 3) che vi è una grossa variabilità nei valori assoluti per quanto riguarda la concentrazione del 3,4-DHPEA-EDA e del 3,4-DHPEA-EA, questa variabilità è anche confermata dal cromatogramma HPLC (Figura 7) ottenuto analizzando diversi. La notevole differenza riscontrata a carico della composizione fenolica degli oli vergini di oliva, sono da imputare alle condizioni agronomiche e tecnologiche utilizzate per la loro produzione .

Tabella 3. Valori medi delle frazioni fenoliche (mg/kg) contenuti di oli vergini di oliva calcolati utilizzando 210 campioni.*

	MEDIANA	QUINTILE PIÙ BASSO	QUINTILE PIÙ ALTO
3,4-DHPEA	1.8	1	3.6
p-HPEA	1.9	0.6	5.0
Acido vanillico	0.2	0	0.3
Acido caffeico	0.4	0.2	0.7
3,4-DHPEA-EDA	185.7	48.2	631.1
p-HPEA-EDA	36.1	22.5	78.8
3,4-DHPEA-EA	126.3	61	231

* Le concentrazioni fenoliche sono state valutate mediante HPLC (Servili et al., 2004).

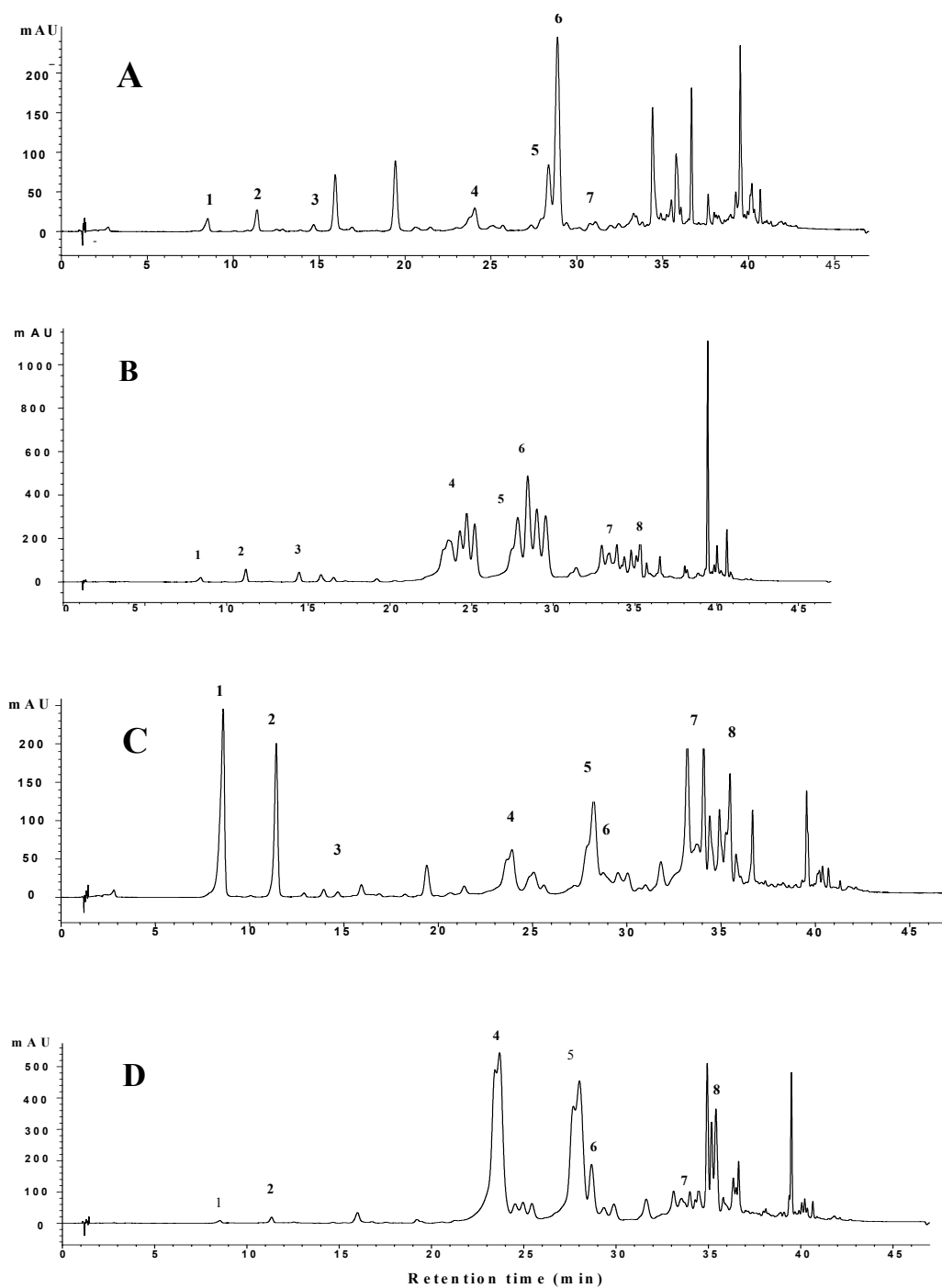


Figura 7. Tipico cromatogramma HPLC ottenuto da olivergini di oliva caratterizzati da diversa composizione fenolica totale valutata con metodo colorimetrico. (A) 43 mg/kg, (B) 626 mg/kg, (C) 262 mg/kg, (D) 551 mg/kg. Corrispondenza picchi (1) 3,4-DHPEA; (2) *p*-HPEA; (3) acido vanillico; (4) 3,4-DHPEA-EDA; (5) *p*-HPEA-EDA; (6) (+)-1-acetossipinoresinolo; (7) 3,4-DHPEA-EA; (8) ligustroside aglicone. (Servili et al 2004)

1.3. EFFETTO DELLE CONDIZIONI AGRONOMICHE E TECNOLOGICHE SULLA FRAZIONE FENOLICA.

Molte pratiche agronomiche e tecnologiche utilizzate nella produzione dell'olio vergine di oliva ne influenzano qualitativamente e quantitativamente la sua composizione fenolica di seguito verranno esaminati i più importanti:

1.3.1. ASPETTI CLIMATICI ED AGRONOMICI.

Cultivar. La composizione fenolica del frutto è strettamente legata al genotipo (*Montedoro et al;* 1989; *Pannelli et al* 1990; *Uceda et al* 1999; *Brenes et al;* 1999 ; *Gomez-Alonzo et al.,* 2002). La presenza dell'oleuropeina nelle olive è stata dimostrata in tutte cultivars, al contrario la demetiloleuropeina e il verbascoside sono direttamente correlate alla cultivar e, per questo, possono essere utilizzate come marker dell'origine genetica del frutto (*Amiot et al;* 1986 *Amiot et al;* 1989). La differente composizione fenolica delle olive provenienti da diverse cultivar si riflette, come mostra Tabella 4, anche sul contenuto fenolico dell'olio da esse estratto.

Maturazione dei frutti.

Il grado di maturazione delle drupe influenza fortemente la composizione fenolica. Durante la maturazione si assiste a un diminuzione della concentrazione dell'oleuropeina, e ad un aumento della demetiloleuropeina per poi decrescere entrambe nei momenti successivi alla pigmentazione completa della drupa (*Amiot et al.,* 1986). La fase successiva alla pigmentazione superficiale costituisce quindi un momento di profonda trasformazione fisiologica e anatomica del frutto, che si traduce in una diminuzione de costituenti fenolici (Tabella 5) e dei volatili con una conseguente tendenza all'appiattimento organolettico dell'olio (*Brenes et al;* 1999; *Montedoro et al.,* 1989; *Pannelli et al;* 1990; *Uceda et al;* 1999) In definitiva la concentrazione fenolica dell'olio vergine di oliva sia influenzata principalmente dalla cultivar dallo stadio di maturazione del frutto che incidono sia quantitativamente che qualitativamente sulla concentrazione di questi composti.

Condizioni climatiche.

Da quanto detto, l'effetto genetico legato alla cultivar è probabilmente il fattore più influente sulla composizione fenolica dell'olio di oliva. Le condizioni agronomiche e climatiche di sviluppo dell'olivo comunque, possono sicuramente influenzare qualitativamente e quantitativamente il contenuto fenolico di oli ottenuti dalla stessa cultivar. In questo ambito, le relazioni tra la disponibilità di acqua durante la maturazione del frutto e la composizione in sostanze fenoliche dell'olio sono stati ampiamente studiati (*Pannelli et al; 1994*). La relazione tra disponibilità di acqua e composizione fenolica del VOO non sono ancora del tutto chiari. Infatti alcuni dati ottenuti da ricerche condotte da *Moltiva et al; 1999* hanno dimostrato che, la concentrazione dei composti fenolici idrofilici subisce un aumento nel VOO quando le piante sono mantenute in condizione di stress idrico; in altre ricerche effettuate da *Ismail et al; 1999* sembra che un regolare irrigazione della pianta porti ad un incremento delle sopra citate sostanze nel VOO.

Tabella 4. Composizione fenolica (mg/kg) di oli vergini di oliva ottenuti da cinque diverse cultivars

	<i>CORATINA</i>	<i>MORAIOLO</i>	<i>FRANTOIO</i>	<i>CAROLEA</i>	<i>LECCINO</i>
3,4-DHPEA ⁽²⁾	1,96 ± 3,00	2,08 ± 1,79	1,38 ± 1,42	2,70 ± 2,03	7,94 ± 10,81
p-HPEA	0,89 ± 0,99	0,87 ± 0,65	0,82 ± 0,91	0,72 ± 1,11	12,3 ± 15,6
3,4-DHPEA-EDA	382,4 ± 138,2	340,0 ± 262,3	154,0 ± 260,9	268,0 ± 113,8	67,6 ± 15,5
p-HPEA-EDA	193,2 ± 65,2	99,84 ± 61,2	89,8 ± 78,8	189,6 ± 89,7	12,5 ± 6,2
3,4-DHPEA-EA	177,5 ± 92,6	157,1 ± 84,5	84,1 ± 103,0	134,5 ± 56,3	47,2 ± 15,0

⁽²⁾I risultati sono espressi come la media di dieci campioni ± la deviazione standard. Gli oli provengono da olive gramolate a 30° C per un tempo di 60 minuti (*Servili et al 2004*). La composizione fenolica è stata valutata mediante HPLC come riportato da *Montedoro et al., 1992*

Tabella 5. Composizione fenolica (mg/g di peso secco) di oli vergini di oliva provenienti da differenti cultivars a due stadi di maturazione (Montedoro et.,al 2003)

		<i>Cv. Moraiolo</i>	<i>Cv. Leccino</i>	<i>Cv. Frantoio</i>	<i>Cv. Coratina</i>
3,4-DHPEA	Verde	9,7	20,5	2,7	1,4
	Pigmentata	3,2	1,3	1,2	0,0
<i>p</i> -HPEA	Verde	3,0	35,6	3,5	4,8
	Pigmentata	1,5	1,7	1,8	2,0
3,4-DHPEA-EDA	Verde	365,5	552,0	198,5	281,3
	Pigmentata	254,3	99,9	120,1	96,1
<i>p</i> -HPEA-EDA	Verde	17,1	37,1	15,7	13,1
	Pigmentata	11,6	10,6	12,7	1,6
<i>p</i> -HPEA estere	Verde	19,4	9,9	115,7	98,8
	Pigmentata	19,0	8,9	108,2	63,0
3,4-DHPEA-EA	Verde	311,8	206,2	37,8	284,9
	Pigmentata	173,1	64,8	27,1	104,3

Condizioni climatiche.

Da quanto detto, l'effetto genetico legato alla cultivar è probabilmente il fattore più influente sulla composizione fenolica dell'olio di oliva. Le condizioni agronomiche e climatiche di sviluppo dell'olivo comunque, possono sicuramente influenzare qualitativamente e quantitativamente il contenuto fenolico di oli ottenuti dalla stessa cultivar. In questo ambito, le relazioni tra la disponibilità di acqua durante la maturazione del frutto e la composizione in sostanze fenoliche dell'olio sono stati ampiamente studiati (*Pannelli et al; 1994*). La relazione tra disponibilità di acqua e composizione fenolica del VOO non sono ancora del tutto chiari. Infatti alcuni dati ottenuti da ricerche condotte da *Moltiva et al; 1999* hanno dimostrato che, la concentrazione dei composti fenolici idrofilici subisce un aumento nel VOO quando le piante sono mantenute in condizione di stress idrico; in altre ricerche effettuate da *Ismail et al; 1999* sembra che un regolare irrigazione della pianta porti ad un incremento delle sopra citate sostanze nel VOO.

1.3.2. ASPETTI TECNOLOGICI.

Le diverse operazioni tecnologiche hanno notevole ripercussione sulla composizione dell'olio vergine di oliva. L'influenza di ogni singola operazione sarà accuratamente analizzata.

Metodi di raccolta. Oggigiorno la raccolta delle olive è condotta meccanicamente e sempre meno frequentemente a mano direttamente dalle pianta. Gli effetti di una raccolta meccanica sono benefici in quanto in quanto producono oli con un maggior contenuto fenolico e più resistenti alle ossidazioni (*Pannelli et al; 1990*). Il fenomeno però si manifesta solo per interventi di raccolta praticati durante l'epoca ottimale, mentre successivamente si assiste ad uno scadimento e ad un livellamento delle concentrazioni fenoliche.

Defogliatura e lavaggio delle olive. L'operazione di defogliatura è un'operazione accessoria sempre consigliabile specialmente quando la raccolta viene effettuata meccanicamente. Infatti la presenza di foglie non apporta nessuna nota positiva agli oli ma, al contrario può modificarne in senso negativo l'aroma e il gusto. Il lavaggio delle olive è sempre consigliato dai tecnologi ed è particolarmente importante quando le drupe, dopo diversi giorni di pioggia, si presentano sporche da schizzi di fango o hanno attaccati pezzi di terra (*Di Giovacchino 1996*). Talvolta, specialmente quando le olive sono piuttosto mature, esse vengono lavorate evitando la fase di lavaggio per ridurre le potenziali perdite di olio dovute al possibile distacco di pezzi di polpa durante la suddetta fase: gli oli corrispondenti avranno un odore di terra, non ascrivibile ancora a nessuno specifico composto volatile o gruppo di sostanze volatili.

Conservazione delle drupe.

La conservazione delle olive in condizioni non adeguate, all'interno di sacchi o impilate, causa pesanti e negative ripercussioni sulla qualità e sul contenuto fenolico degli oli ottenuti. Infatti durante la conservazione delle olive si attuano dei processi enzimatici di natura idrolitica a carico della parete cellulare che comportano una iniziale degradazione della struttura cellulare, questo processo porta nel tempo ad una perdita netta delle sostanze fenoliche (*Pérez et al., 2003*). In base alle osservazioni fatte si può concludere che la conservazione andrebbe sempre evitata. Le condizioni ottimali di processo vedono la lavorazione delle olive da svolgersi massimo nelle ventiquattro ore successive la raccolta. Per le brevi conservazioni, che non dovrebbero superare questo tempo, le olive andrebbero conservate in olivato su graticci o, più propriamente, in pallets forate o in cassette forate in strati sottile 20-30 cm di spessore per evitare processi fermentativi e idrolitici.

Frangitura. L'innovazione tecnologica nel campo dell'estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva vede tra i punti meno trattati la fase di frangitura. Negli ultimi trenta anni, infatti si è passati da sistemi a frangitura discontinui quali le molazze, a frangitori continui. La frangitura delle olive rappresenta una fase critica per la qualità dell'olio estratto meccanicamente. Infatti tutti i composti fenolici di un olio si originano

durante il processo frangitura per cui questo risulta essere un punto critico nella produzione di VOO di qualità (Capella et al; 1997; Servili et al; 1994). La concentrazione fenolica nell'olio vergine di oliva è strettamente correlata all'attività del patrimonio enzimatico endogeno nel frutto dell'oliva. Durante il processo di frangitura (Capella et al.,1997; Servili et al; 1994; Caponi et al; 1999; Servili et al.;2002) si ha l'attivazione del patrimonio enzimatico endogeno, in particolare vi è l'attivazione della β -glucosidasi contenuta nell'epicarpo del frutto questo enzima catalizza l'idrolisi dell'oleuropeina, demetiloleuropeina e ligustroside contenuti nel frutto dell'oliva portando alla formazione dei corrispondenti agliconici quali 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA con il meccanismo riportato in Figura 8. Il meccanismo di idrolisi enzimatica della è stato studiato usando come substrati l'oleuropeina e demetiloleuropeina (Scalzo e Scarpati; 1993 e da Bianco et al.; 1999). Da questi studi tramite NMR è emerso chiaramente (Scalzo e Scarpati; 1993) che il prodotto finale dell'idrolisi della demetiloleuropeina risulta essere il 3,4-DHPEA-EDA. Al contrario il meccanismo di formazione del, *p*-HPEA-EDA a partire dall'oleuropeina e dal ligustroside aglicone non è del tutto chiarito. Infatti (Bianco et al.; 1999; Rovellini e Cortesi.;2002) studiando in laboratorio l'idrolisi enzimatica dell'oleuropeina si ottiene come prodotto finale la forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone; e non vi è traccia della formazione 3,4-DHPEA-EDA. Se così fosse nell'olio vergine di oliva dovremmo ritrovare grosse quantità della forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone, e il 3,4-DHPEA-EDA dovrebbe essere presente solo in alcuni oli, in quanto la demetiloleuropeina è cultivar dipendente (Esti et al.,1998; Amiot et al., 1986; Amiot et al., 1989), per cui la composizione fenolica degli oli vergini di oliva sarebbe regolata dal rapporto tra demetiloleuropeina/oleuropeina presente nella drupa. In realtà questo non è stato dimostrato infatti gli oli vergini di oliva presentano basse quantità della forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone e alte concentrazione di 3,4-DHPEA-EDA, sia che provengano da frutti poveri o ricchi di demetiloleuropeina (Servili e Montedoro., 2002). Questo ha fatto supporre che l'oleuropeina oltre al processo d'idrolisi va incontro anche ad altre reazioni, che infine portino alla formazione del 3,4-DHPEA-EDA, l'enzima che è coinvolto in questo processo sembra essere una metilesterasi, questa catalizza il distacco di un gruppo metilico dalla forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone, portando così alla formazione del 3,4-DHPEA-EDA (Figura 8). In recenti

studi per confermare la relazione tra l'idrolisi enzimatica, dei secoiridoidi glucosidici e il contenuto dei loro derivati agliconici nell'olio vergine di oliva (*Servili e Montedoro, 2002*), è stata effettuata una inattivazione termica della β -glucosidasi

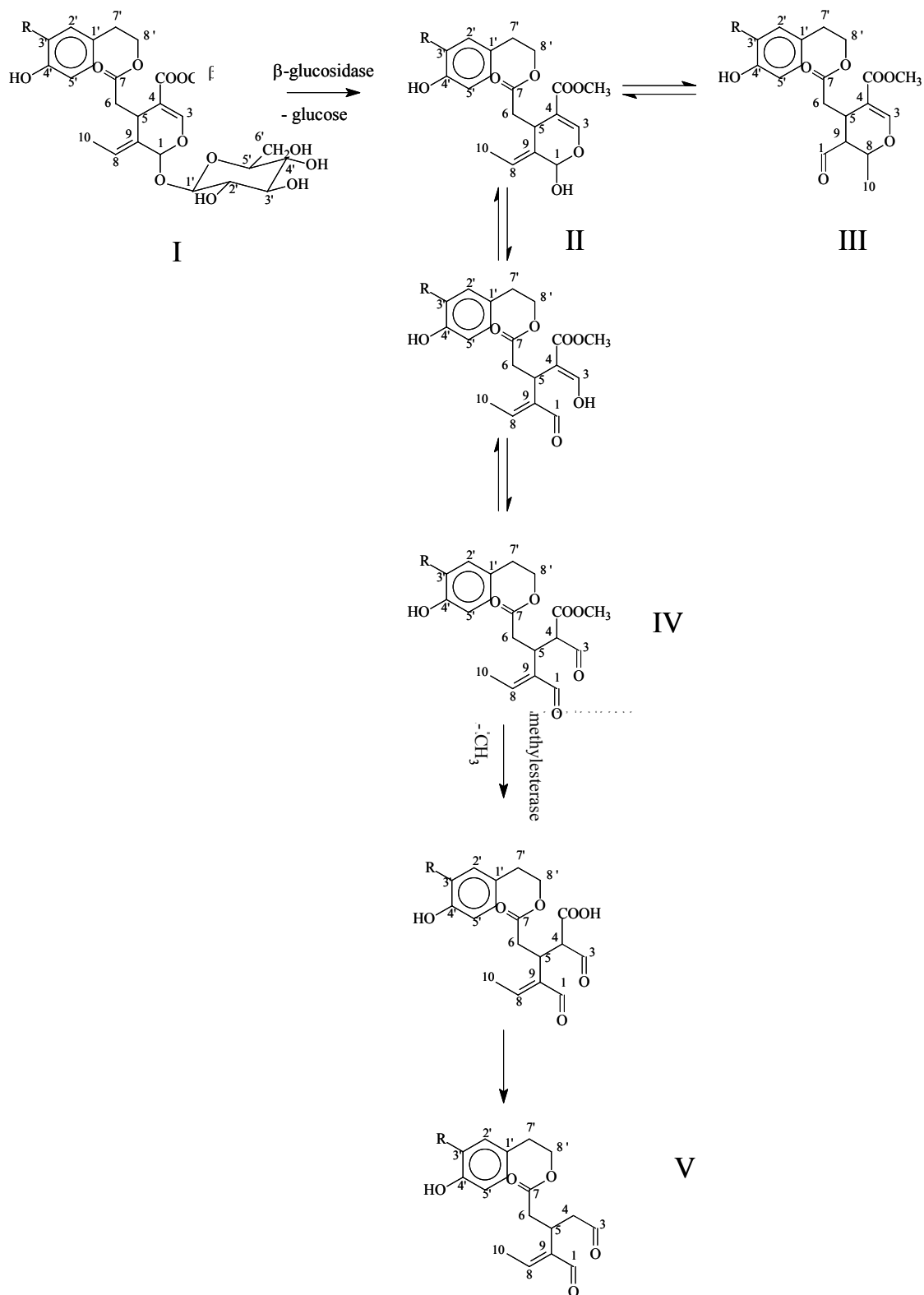


Figura 8. Meccanismo biochimico per la formazione dei derivati dei secoiridoidi: (I) H: ligustroside, R=OH: oleuropeina; (II) R=H: ligustroside aglicone; (III) R=OH: 3,4 DHPEA-EA; (IV) R=H: forma dialdeidica del ligustroside aglicone; R=OH:formadialdeidica dell'oleuropeina agl'icone;(V) R=H:*p*-HPEA-EDA; R=OH: 3,4 DHPEA-EDA

endogena delle olive prima della frangitura. Come mostra la Tabella 6 l'inibizione della β -glucosidasi nelle olive che hanno subito un trattamento termico non modifica il contenuto dei secoiridoidi glucidici rispetto al controllo, ma le paste di olive e l'olio ottenuto dalla lavorazione delle drupe trattate non contiene 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA. Durante il processo di frangitura oltre all'attivazione positiva della β -glucosidasi, si attivano anche complessi enzimatici negativi quali polifenolossidasi (PPO) e perossidasi (POD). Questi ultimi hanno effetto negativi sulla qualità sensoriale e salutistica degli oli aspetto strettamente connesso alla presenza di alcune classi di composti chimici come le sostanze fenoliche. L'attivazione della PPO e POD catalizza la degradazione delle sostanze fenoliche nella fase di gramolatura. Questi enzimi sono distribuiti in forma diversa nelle parti costitutive della drupa in particolare la perossidasi è ampiamente contenuta nella mandorla (*Servili et al; 2000*), la polifenolossidasi e le glicosidasi sono presenti quasi esclusivamente nel mesocarpo. Questa 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 in maniera selettiva sulle varie parti costitutive della drupa in fase di frangitura. Su questo concetto si basano i processi di denocciolatura delle olive, che eliminando la mandorla, riducono la liberazione dell'attività perossidasi nelle paste e quindi l'ossidazione delle sostanze fenoliche dell'olio (*Montedoro e Servili; 1999; Amirante et al; 2001; Montedoro et al; 2001*) come mostra Tabella 7. Un percorso alternativo a questo riguarda la frangitura "differenziata" delle drupe il cui principio è quello che comporti un'efficiente rottura delle strutture cellulari della polpa (dove è contenuto circa il 98% dell'olio) e della parte legnosa della mandorla (che funge da drenante nella fase di separazione solido/liquido) a cui possa corrispondere una limitata rottura dei tegumenti del seme. Elemento quest'ultimo che può ridurre la liberazione di perossidasi e lipasi nelle paste durante la fase di gramolatura. Va osservato a riguardo che i sistemi tradizionali di frangitura come le molazze esplicano questa attività selettiva, cosa non possibile per i sistemi di frangitura continui. La frangitura con molazze pur essendo un processo che si avvicina al concetto di frangitura differenziata di cui abbiamo parlato in precedenza, rispetto ai frangitori continui ha in ogni caso dei limiti che sono da individuare nella bassa capacità lavorativa oraria, l'elevato ingombro della macchina, difficile pulizia delle parti e bassa capacità di estrarre il colore in particolare

Tabella 6. Composizione fenolica delle paste e dell'olio vergine di oliva ottenuto da olive non trattate e trattate termicamente.

	Olive*		Paste		Paste frante		Paste frante	
	Controllo (mg/g di peso fresco)	Trattamento Termico (mg/g di peso fresco)	Paste (mg/g di peso fresco) ^Z		Olio (mg/kg)	Paste (mg/g di peso fresco)	Olio (mg/kg)	
3,4-DHPEA	0.3 ± 0,008 a	0.5 ± 0,14a	0.6 ± 0,07b	0.8 ± 0,04ab	0.4 ± 0,02ac	0.4 ± 0,55bc		
p-HPEA	0.1 ± 0,01a	0.1 ± 0,04a	0.2 ± 0,05b	1.3 ± 0,10ab	0.2 ± 0,02b	0.7 ± 0,08bc		
Acido caffeico	0.1 ± 0,01a	0.1 ± 0,01c	0.0 ± 0,01b	0.9 ± 0,08ab	0.1 ± 0,01b	0.1 ± 0,02bc		
Demetiloleuropeina	8.4 ± 0,74a	9.2 ± 0,64a	1.1 ± 0,15b	n.d.	7.3 ± 06,0ac	n.d.		
Verbascoside	16.4 ± 0,4a	17.1 ± 0,92a	15.0 ± 0,92b	n.d.	14.5 ± 0,38b	n.d.		
3,4-DHPEA-EDA	1.5 ± 0,21a	1.9 ± 0,15c	11.8 ± 0,71b	535.2 ± 7,11d	1.7 ± 0,25ac	n.d.		
Oleuropeina	10.7 ± 0,48a	11.1 ± 0,85a	2.0 ± 0,25b	n.d.	11.2 ± 0,49ac	n.d.		
3,4-DHPEA-EA	n.d.	n.d.	n.d.	178.9	n.d.	n.d.		

*I risultati rappresentano la media di tre ripetizioni ± la deviazione standard le lettere si riferiscono alle significatività p<0,05.

^Z La concentrazione fenolica nelle olive e nelle paste è stata valutata tramite HPLC secondo quanto riportato da *Servili et al., 1999*.

la clorofilla responsabile della colorazione verde degli oli. L'operazione di molazzatura vista la bassa capacità lavorativa è stata sostituita da frangitori di tipo continuo. Tra i frangitori continui vanno annoverati quelli a martelli che sono stati storicamente i primi ad essere utilizzati. Queste macchine presentano numerosi vantaggi che sono da ricondurre alla elevata capacità lavorativa, al basso ingombro, ai bassi costi di impianto ma, al contempo presentano alcuni inconvenienti che riguardano il forte effetto emulsionante prodotto sulla pasta di olive in fase di frangitura un incremento di temperatura delle paste dovuto a fenomeni di attrito, inoltre operano una degradazione del tegumento della mandorla con attivazione delle perossidasi endogene e conseguente scadimento della qualità salutistica e sensoriale dell'olio. L'innovazione tecnologica in questo settore va verso l'uso di macchine di tipo continuo ma con l'introduzione di corpi battenti che aggiungano, nel corso della frangitura, all'effetto di percussioni, tipico dei frangitori a martelli quello di taglio, elemento questo che può tradursi in una riduzione della degradazione del tegumento della mandorla e quindi una limitata attivazione delle perossidasi endogene in essa contenute, che sono alla base dei processi di degradazione delle sostanze fenoliche nella fase successiva di gramolatura e quindi dello scadimento qualitativo dell'olio. In questo contesto si inquadra l'introduzione di alcuni nuovi sistemi di frangitura quali il frangitore a denti ed il frangitore a coltelli. Il frangitore a coltelli sembra particolarmente interessante in quanto riesce a frangere selettivamente le parti costitutive della drupa operando una efficiente degradazione della polpa e una ridotta azione frangente sia sulla buccia che sulla mandorla. Una serie di prove sperimentali che vedevano a confronto il frangitore a martelli e quello a coltelli ha evidenziato un incremento delle sostanze fenoliche negli oli estratti da paste frante con il frangitore a coltelli rispetto a quello a martelli (Tabella 8). I frangitori a denti hanno un comportamento simile ai frangitori a coltelli dal punto di vista qualitativo, possono però evidenziare alcuni problemi nell'efficienza di frangitura intesa come granulometria della pasta franta che va corretta regolando opportunamente la distanza tra i corpi battenti. Un altro tipo di frangitura è il cosiddetto frangitore lento. Questo tipo di frangitore è caratterizzato da un basso numero di giri, non provoca surriscaldamento delle paste in seguito alla frangitura ed infine effettua un'azione selettiva sulla buccia e sulla mandorla causando una minore degradazione dei composti fenolici. In conclusione possiamo affermare che il sistema di frangitura va

personalizzato alla tipologia delle olive della zona di lavorazione ed al tipo di olio che si vuole produrre.

Tabella 7. Composizione fenolica determinata mediante HPLC (mg/kg) degli oli vergini di oliva provenienti da cultivars *Coratina* e *Ogliarola* frante con frangitore a martelli e coltelli.

	Coratina		Ogliarola	
	Martelli	Coltelli	Martelli	Coltelli
3,4-DHPEA*	2,3 ± 1,7	1,1 ± 0,4	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,5
p-HPEA	2,9 ± 0,1	3,8 ± 0,9	7,3 ± 5,7	8,1 ± 7,1
Acido vanillico	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,3
Acido caffeico	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
3,4-DHPEA-EDA	301,6 ± 15,2	367 ± 36,4	53,3 ± 9,4	54,6 ± 5,2
p-HPEA-EDA	52,6 ± 9	67 ± 10,6	43 ± 6,5	40,6 ± 5,7
p-HPEA-estere	36,1 ± 8,7	42 ± 2,2	32,4 ± 22	37,6 ± 10,4
3,4-DHPEA-EA	257 ± 4,8	269 ± 31	97,2 ± 9,6	124,6 ± 19,4
Polifenoli Totali**	328,5 ± 58,7	383 ± 38,2	175 ± 15	186,7 ± 27,2

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

Tabella 8. Composizione fenolica determinata mediante HPLC (mg/kg) degli oli vergini di oliva provenienti da cultivars *Coratina* e *Ogliarola* frante con frangitore a martelli e denocciolate.

	<i>CV Coratina</i>		<i>CV Ogliarola</i>	
	Martelli	Denocciolato	Martelli	Denocciolato
3,4 DHPEA	3,1 ± 0,1*	4,4 ± 0,1	2,4 ± 0,05	2,1 ± 0,1
p-HPEA	2,6 ± 0,1	2,9 ± 0,3	5,1 ± 0,11	3,2 ± 0,04
3-4 DHPEA-EDA	452,7 ± 5,5	593,5 ± 3,4	230,6 ± 1,18	265,5 ± 1,8
p-HPEA-EDA	129,0 ± 4,6	150,0 ± 3,5	105,8 ± 0,42	113,6 ± 0,9
(+)-1- Acetossipinoresinolo	17,0 ± 0,6	24,4 ± 1,2	36,1 ± 0,91	38,8 ± 0,8
(+)-1- Pinoresinolo	28,5 ± 1,8	32,2 ± 3,1	14,2 ± 0,07	19,9 ± 0,2
3-4 DHPEA-EA	127,1 ± 4,8	147,2 ± 6,8	89,4 ± 1,66	96,5 ± 1,8

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard.

Gramolatura. Un altro punto critico del processo di estrazione meccanica dell'olio è rappresentato dalla gramolatura. Infatti nella fase di gramolatura si verificano forti modificazioni a carico dei componenti minori, e in special modo dei composti fenolici e volatili. Il punto critico di questo processo sono: il tempo di esposizione all'aria e la temperatura questi influenzano il profilo fenolico e quindi, le caratteristiche degli oli corrispondenti. L'incremento della temperatura e la prolungata esposizione all'aria durante la fase di gramolatura determinano un abbattimento della concentrazione degli alcoli fenolici e dei secoiridoidi agliconici come 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA nell'olio (*Servili et al;* 1999; *Servili et al;* 1994). Tutti i derivati agliconici che si formano durante la frangitura, e di gran parte degli altri polifenoli, oltre il 96% di essi si disperde nei sottoprodotti come le acque di vegetazione e sanse. Il maggior grado di idrofilia delle sostanze fenoliche spiegherebbe la loro perdita attraverso le acque di vegetazione ma sembra che, in questo fenomeno, un ruolo fondamentale sia svolto dal sistema colloidale elettropositivo delle paste (acido poligalatturonico e proteine), con il

quale i composti fenolici idrofilici si uniscono (legami ad idrogeno e forze di Van der Waals), riducendone il passaggio nell'olio (*Spencer et al; 1988*). Tuttavia la perdita dei composti fenolici durante la fase di gramolatura è da ricondurre principalmente a fenomeni di ossidazione di natura autocatalitica ed enzimatica. In questo caso la temperatura delle paste in gramolatura, provoca l'attivazione delle ossidoreduttasi endogene quali polifenolossidasi e perossidasi (*Servili et al; 1999; Sciancalepore 1972; Servili et al; 1998*). La gestione del patrimonio antiossidante dell'olio durante la fase di gramolatura ed il controllo delle variabili, di tempo, temperatura e concentrazione di ossigeno, che sono implicati in questa fase sono pertanto indispensabili per l'ottenimento di un prodotto che sia apprezzabile dal punto di vista qualitativo e salutistico. Durante gli ultimi dieci anni, diverse ricerche sono state condotte per controllare selettivamente le attività delle ossidoreduttasi endogene durante questo processo tecnologico. Questo problema ha portato alla sperimentazione di diverse tecnologie, le più recenti acquisizioni in merito riguardano l'uso di preparati a base di talco al fine di favorire un maggior recupero di olio e sostanze fenoliche. Sono stati usati preparati enzimatici ad attività depolimerizzante per ottenere un sostanziale recupero dei polifenoli durante la fase di gramolatura (*Ranalli e De Mattia; 1997; Siniscalco e Ranalli et al; 2003*). Recentemente *Vierhuis et al; 2001* hanno dimostrato che l'aggiunta

di preparati enzimatici in fase di gramolatura riducono la formazione dei complessi tra polisaccaridi e composti fenolici idrofili questo si riflette in un aumento di sostanze fenoliche nelle paste di olive e il loro negli oli e nelle acque di vegetazione (Tabella 9 e 10). Riduzione della concentrazione di ossigeno per l'inibizione dei processi ossidativi in fase di gramolatura. In tale ambito si è studiato in particolare l'uso di gas inerti per rimuovere l'ossigeno nello spazio di testa della gramola (*Servili et al.*, 1999; *Servili et al.*, 2000). I risultati ottenuti mostrano che l'uso dell' N_2 riduce la degradazione ossidativa delle sostanze fenoliche, portando ad un aumento di queste nelle paste e nei relativi oli come mostrato dalla Tabella 11. Con l'uso di questo gas inerte gli aumenti più importanti si sono registrati a carico delle forme dialdeidiche dell'acido elenolico legato all'diidrossifeniletanolo (3,4-DHPEA-EDA) ed ad un isomero dell'aglicone dell'oleuropeina (3,4-DHPEA-EA) cioè i composti fenolici più attivi nei riguardi dei fenomeni ossidativi. Gli studi condotti hanno dimostrato come l'azoto agisca indirettamente sull'attività degli enzimi endogeni dell'oliva quali polifenolossidasi (PPO), perossidasi (POD) e lipoossigenasi (LPO) in quanto l'effetto dell'azoto consiste in una netta riduzione del contenuto di ossigeno nelle paste gramolate; conseguenza di questo fenomeno è l'inibizione selettiva del complesso enzimatico ossidativo per cui, l'ossidazione fenolica promossa da (PPO) (POD) viene sensibilmente ridotta. Per ottimizzare l'incremento delle sostanze fenoliche si è studiato quale fosse l'esatto tempo di esposizione all'aria delle paste (TEOPAC) come parametro di controllo della concentrazione di ossigeno presente nelle paste durante la fase critica di gramolatura. Dall'analisi di oli ottenuti da paste, provenienti da olive a tre stadi differenti maturazione e gramolate a diverso tempo di esposizione all'aria, si può evidenziare che il contenuto fenolico decresce all'aumentare del TEOPAC (Tabella 12). I risultati della ricerca inoltre evidenziano come le condizioni di processo relative al tempo di esposizione all'aria delle paste ed alla temperatura di gramolatura possano essere ottimizzati al fine di ottenere elevati livelli di qualità degli oli vergini di oliva. (*Servili et al.*, 2003)

Tabella 9. Composizione fenolica determinata mediante HPLC (mg/kg), delle paste gramolate con e senza trattamento enzimatico.

	Paste frante Controllo	Paste gramolate Controllo	Paste gramolate + enzima NF12/Olivex
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	2,7 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,1 ^c
p-HPEA	2,3 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,1 ^b
3,4-DHPEA-EDA	515,0 ± 23 ^a	317,0 ± 16 ^b	439,0 ± 16 ^c
p-HPEA-EDA	24,8 ± 1,9 ^a	25,8 ± 1,4 ^a	29,4 ± 0,8 ^b
p-HPEA derivative	32,5 ± 1,4 ^a	24,2 ± 0,8 ^b	28,5 ± 0,9 ^c
3,4-DHPEA-EA	357,0 ± 13 ^a	177,0 ± 8 ^b	218,0 ± 8 ^c

⁽¹⁾ I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard, (Servili et al.,2004).

Tabella 10. Composizione fenolica determinata mediante HPLC (mg/kg), delle acque di vegetazione ottenute da paste granolate con e senza trattamento enzimatico.

	Paste granolate Controllo	Paste granolate + enzima NF12/Olivex
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	0,37 ± 0,03 ^a	0,44 ± 0,01 ^a
p-HPEA	n.d. ^a	0,04 ± 0,01 ^b
Demetiloleuropeina	0,47 ± 0,06 ^a	0,82 ± 0,01 ^b
Verbascoside	n.d.	n.d.
3,4-DHPEA-EDA	17,50 ± 1,7 ^a	31,90 ± 2,6 ^b
Oleuropeina	0,60 ± 0,04 ^a	1,10 ± 0,1 ^b
Luteolina-7-glucoside	0,11 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
Rutina	0,06 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,01 ^b

⁽¹⁾ I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard, (Servili et al.,2004).

Tabella 11. Composizione fenolica determinata mediante HPLC (mg/kg), ottenute da paste gramolate in presenza di aria e azoto.

	Paste frante Controllo	Paste gramolate Controllo	Paste gramolate in presenza di un flusso N ₂
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	2,7 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,2 ^a
p-HPEA	2,3 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,1 ^b	2,6 ± 0,3 ^a
3,4-DHPEA-EDA	515,0 ± 23 ^a	317,0 ± 16,0 ^b	504,0 ± 6,0 ^a
p-HPEA-EDA	24,8 ± 1,9 ^a	25,8 ± 1,4 ^{ab}	28,4 ± 1,4 ^b
p-HPEA derivati	32,5 ± 1,4 ^a	24,2 ± 0,8 ^b	21,6 ± 1,3 ^b
3,4-DHPEA-EA	357,0 ± 13,0 ^a	177,0 ± 8,0 ^b	242,0 ± 5,0 ^c

⁽¹⁾ I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard, (Servili et al.,2004).

Tabella 12. Effetto TEOPAC sulla composizione fenolica valutata per HPLC, dell'olio vergine di oliva ottenuto da olive a diverso stadio di maturazione.*

	<i>Tempo di esposizione all'aria (TEOPAC)</i>						
	0'	10'	20'	30'	40'	50'	60'
<i>Frazioni fenoliche (mg/kg)</i>							
Indice di pigmentazione: 22							
3,4DHPEA:EA	146,0 ± 16,6	137,0 ± 6,42	117,7 ± 28,76	111,9 ± 11,31	149,3 ± 0	143,3 ± 1,23	95,8 ± 6,03
3,4 DHPEA	1,3 ± 0,21	1,1 ± 0,08	0,8 ± 0,26	0 ± 0,00	1,3 ± 0,03	1,5 ± 0,05	1,0 ± 0,40
3,4DHPEA:EDA	804,3 ± 26,04	848,6 ± 14,47	738,1 ± 11,40	681,6 ± 20,26	622,0 ± 15,24	581,4 ± 13,23	337,6 ± 8,57
pHPEA:EDA	29,8 ± 1,34	33,7 ± 0,69	27,5 ± 0,20	26,2 ± 0,07	40,4 ± 1,34	37,9 ± 2,50	28,6 ± 4,14
Indice di pigmentazione: 26							
3,4DHPEA:EA	354,9 ± 28,90	384,8 ± 12,56	327,7 ± 20,94	291,7 ± 21,08	290,8 ± 20,9	281,3 ± 27,56	245,9 ± 8,10
3,4DHPEA	3,7 ± 1,11	2,7 ± 0,32	1,9 ± 0,08	2,8 ± 0,74	1,6 ± 0,08	2,4 ± 0,30	1,9 ± 0,11
3,4DHPEA:EDA	1206,2 ± 37,79	1103,9 ± 23,83	1108,1 ± 14,13	1063,7 ± 10,02	1060,0 ± 23,14	834,3 ± 18,72	645,3 ± 6,47
pHPEA:EDA	40,5 ± 1,41	41,4 ± 1,15	44,3 ± 1,73	49,8 ± 3,10	39,0 ± 0,26	32,5 ± 0,38	53,3 ± 0,16
Indice di pigmentazione: 29							
3,4DHPEA:EA	368,5 ± 27,83	381,7 ± 24,48	337,5 ± 15,78	310,3 ± 16,61	314,5 ± 17,03	279,6 ± 11,12	246,0 ± 16,52
3,4 DHPEA	1,9 ± 0,13	2,7 ± 0,71	2,0 ± 0,34	2 ± 0,03	1,3 ± 0,03	1,3 ± 0,21	1,2 ± 0,26
3,4DHPEA:EDA	1003,0 ± 54,47	956,5 ± 61,10	841,0 ± 45,28	882,7 ± 26,89	665,8 ± 50,38	492,2 ± 60,93	364,6 ± 36,00
pHPEA:EDA	34,5 ± 1,10	36,8 ± 2,22	44,9 ± 1,63	37,1 ± 1,21	29,6 ± 2,19	24,9 ± 1,41	25,4 ± 1,44

*I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard, (Servili et al.,2004).

Il rapporto che emerge dallo studio tra le condizioni di processo e la cultivar, ha portato a concludere che per l'ottenimento di oli di alta qualità, le condizioni operative nel processo di estrazione meccanica dell'olio, devono essere definite in funzione delle variabili agronomiche (cultivar) caratterizzanti l'assetto chimico e biochimico della materia prima.

Sistemi di separazione.

Il contenuto fenolico di un olio vergine di oliva dipende anche dal tipo di estrazione sfruttata per il recupero dell'olio da mosto oleoso. I più diffusi sistemi per la separazione dell'olio dalle paste di oliva gramolate sono la centrifugazione e il sistema per pressione. Le centrifughe tradizionali a tre fasi permettono la separazione dell'olio dall'acqua di vegetazione e della sansa vergine esse prevedono una diluizione delle paste, effettuata per ridurre la viscosità e quindi per facilitare la separazione olio-acqua di vegetazione (*Montedoro e Servili.*, 1992; *Giovacchino et al.*, 1994), con un rapporto di diluizione compreso tra 1:0.5 ad 1:1 questo significa che vengono utilizzate da 50 a 100 litri di acqua di fonte per 100 Kg di pasta da centrifugare. Questo comporta oltre l'accumulo di grosse quantità di acqua di vegetazione da smaltire (70-120 litri per 100 Kg di pasta di olive), una riduzione della qualità dell'olio principalmente dovuta al dilavamento, provocato dall'acqua aggiunta, dei composti fenolici presenti nell'olio con riduzioni imponenti di questa frazione antiossidante. Al fine di limitare la perdita di sostanze antiossidanti negli ultimi dieci anni sono state sviluppate nuove centrifughe che operano la separazione dell'olio dal mosto oleoso utilizzando minori quantità di acqua. Le centrifughe di nuova generazione sono di due tipi: centrifughe a tre fasi a basso consumo di acqua (10-30 litri per 100 Kg di pasta di olive) e a due fasi che opera senza l'aggiunta di acqua. Numerose ricerche hanno messo a confronto il sistema tradizionale a tre fasi con quello a due fasi vegetazione., 1992;(Giovacchino et al., 1994; *Garcia et al* 2001; *Giovacchino et al* 2001; *Ranalli e Angerosa*;1996; *Stefanoudakii et al.*, 1999), come mostra Tabella 13 gli oli provenienti da cultivars italiane (*Coratina e Ogliarola*) estratti utilizzando il sistema tradizionale a tre fasi (*De Stefano et al*; 1999) presentano un minor contenuto fenolico di quelli separati con il sistema due fasi . Risultati simili sono stati ottenuti da altri (*Garcia et al* 2001; *Giovacchino et al* 2001) e utilizzando cultivars spagnole e greche. Un incremento della frazione fenolica è stato osservato anche negli oli estratti con il sistema di

centrifugazione a tre fasi a basso consumo di acqua rispetto a quello tradizionale a tre fasi (*Amirante et al 2001;*). Il sistema di estrazione a pressione è un sistema millenario che nel corso dei secoli ha subito diverse modificazioni. Attualmente nei frantoi dotati di questo tradizionale sistema, la separazione dell'olio dalla polpa avviene attraverso l'utilizzo di presse idrauliche. Il sistema di estrazione per pressione è, in linea teorica, quello che maggiormente rispetta la qualità intrinseca dell'olio, infatti non si ha la perdita di sostanze fenoliche, dal momento che non viene utilizzata acqua durante il processo di separazione (*Montedoro e Servili., 1992; Giovacchino et al., 1994*). Tuttavia nella pratica il suddetto processo presenta, una serie di problemi applicativi che sono legati soprattutto alla bassa capacità operativa oraria (fattore che si traduce spesso in un aumento della conservazione delle olive) e alla difficile manutenzione. Per questi inconvenienti viene poco utilizzato.

Conservazione dell'olio. La fase di stoccaggio dell'olio rappresenta un ulteriore punto critico di estrazione e condizionamento dell'olio. L'olio estratto è un prodotto torbido di relativa stabilità. La torbidità, frutto della sospensione di tracce di acqua e sostanze solide, rende ancora l'olio sede di attività enzimatiche di degradazione, soprattutto a carico della componente fenolica. È quindi buona norma stabilizzare l'olio attraverso la sua chiarificazione mediante travasi e filtrazioni. L'olio limpido, essendo privo di acqua, è potenzialmente oggetto solo di fenomeni di degradazione non enzimatici, quali l'autossidazione e la fotossidazione dei trigliceridi e l'idrolisi e l'ossidazione non enzimatica dei composti fenolici. I tempi lunghi di conservazione (le tecniche produttive e commerciali dovrebbero garantire fino ad un anno di conservabilità) permettono a questi fenomeni di procedere e portare al decadimento qualitativo, a cominciare dal mancato rispetto dei parametri di legge. La suscettibilità dell'olio a questi fenomeni dipende innanzitutto dalle caratteristiche originarie dell'olio; elevata acidità, e il basso contenuto di composti fenolici rappresentano in forma combinata condizioni di composizione favorevoli alla degradazione in conservazione. Ciononostante l'ossigeno, la luce, le alte temperature, combinati a lunghi tempi di esposizione, favoriscono i fenomeni degradativi, aumentandone significativamente la velocità. Le tecniche produttive possono quindi essere condotte cercando di rimuovere le cause ambientali di degradazione. Finché l'olio è conservato in azienda è possibile tenere sotto controllo la degradazione utilizzando recipienti opachi alla luce (ad esempio

serbatoi di acciaio inox) privi di aria nello spazio di testa e posti in ambienti a 18-20°C; utile è anche limitare il più possibile sbattimenti e lavorazioni dell'olio, che ne favoriscono l'ossigenazione. Quando l'olio è sul mercato e ancora di più quando è consumato diventa però difficile tenere sotto controllo le modalità di utilizzo del prodotto; diventano essenziali nella conservazione del prodotto le sue caratteristiche compositive di maggiore o minore stabilità, eventualmente unite a modalità di confezionamento e commercializzazione che possano ridurre l'impatto dell'esposizione incontrollata del prodotto alle cause ambientali di degradazione (ad esempio l'uso di confezioni primarie di protezione dalla luce, confezioni di ridotta capacità, tecniche logistiche che riducano i tempi di stoccaggio del prodotto prima dell'acquisto).

Tabella 13. Composizione fenolica e periodo induzione dell'olio vergine di oliva ottenuto da olive appartenenti a tre diverse cultivars, estratti con decanter a tre fasi e a due fasi ⁽¹⁾.

	Coratina		Oliarola	
	Due fasi	Tre fasi	Due fasi	Tre fasi
3,4 DHPEA ⁽²⁾	0,87 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,08 ^b	0,66 ± 0,11 ^a	0,50 ± 0,11 ^A
p-HPEA	3,74 ± 0,07 ^a	2,34 ± 0,08 ^b	3,30 ± 0,10 ^a	4,22 ± 0,10 ^b
Acido vanillico	0,41 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^b	0,26 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,05 ^b
Acido caffeico	0,16 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,03 ^b
3,4 DHPEA-EDA	522,2 ± 13,5 ^a	427,2 ± 13,8 ^b	30,09 ± 1,03 ^a	18,53 ± 0,68 ^b
p-HPEA-EDA	78,16 ± 0,52 ^a	67,26 ± 2,55 ^b	20,99 ± 0,82 ^a	22,40 ± 0,33 ^a
p-HPEA-estere	38,41 ± 0,10 ^a	35,62 ± 1,11 ^b	48,00 ± 3,40 ^a	46,72 ± 5,78 ^a
3,4 DHPEA-EA	351,7 ± 11,0 ^a	244,9 ± 13,6 ^b	68,01 ± 6,00 ^a	52,04 ± 3,11 ^b
Polifenoli Totali ⁽³⁾	673 ± 4 ^a	585 ± 7 ^b	304 ± 5 ^a	263 ± 4 ^b
Periodo di induzione [h]	17,8 ± 0,1 ^a	15,5 ± 0,2 ^b	5,2 ± 0,1 ^a	4,6 ± 0,1 ^b

⁽¹⁾ I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti ± deviazione standard, (Servili et al., 2004).

⁽²⁾ La concentrazione fenolica è stata valutata mediante HPLC.

⁽³⁾ La concentrazione fenolica è stata valutata con metodo colorimetrico.

1.4. PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DEI COMPOSTI FENOLICI E DEI TOFEROLI CONTENUTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA.

I fenomeni di trasformazione a carico della componente lipidica degli oli portano ad uno scadimento sia dal punto di vista sensoriale che nutrizionale del prodotto, le modificazioni della componente lipidica sono essenzialmente di tipo idrolitico ed ossidativo. L'idrolisi, o lipolisi, consiste nella rottura del legame tra il glicerolo ed uno o più degli acidi grassi ad esso esterificati. La reazione è catalizzata dalle lipasi endogene presenti nelle olive e dalle lipasi delle muffe contaminanti; come ogni attività enzimatica la lipolisi avviene in presenza di acqua. La liberazione di acidi grassi nell'olio è la principale conseguenza della lipolisi ed è misurabile valutando il grado di acidità di un olio. L'idrolisi è pertanto un fenomeno di degradazione di un olio extra vergine di oliva, anche perché il contenuto di acidi grassi liberi è un fattore proossidante: oli ad alta acidità presentano una resistenza all'ossidazione minore rispetto ad oli a bassa acidità. La degradazione ossidativa è un fenomeno notevolmente più complesso rispetto all'idrolisi. Per ossidazione, infatti, non si intende una singola reazione chimica, ma il risultato di una serie di fenomeni (autossidazione, fotossidazione) si sviluppa a carico dei pigmenti presenti nel VOO provocando cambiamenti di colore, ossidazione enzimatica o "via della lipossigenasi" porta alla formazione di composti volatili, quali aldeidi, alcoli ed esteri a sei atomi di carbonio. Tali composti volatili conferiscono all'olio caratteristiche sensoriali positive (aroma e "flavor") che si verificano a carico degli acidi grassi sia liberi che esterificati con il glicerolo. L'autossidazione è un processo radicalico a catena in tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione. (Frankel, 1991; Sanchez e Salas; 2003). La fase di iniziazione è costituita da serie di reazioni che portano alla formazione di radicali liberi (R.) a partire da acidi grassi (RH) prevalentemente insaturi, in presenza di attivatori quali le alte temperature, la luce e i metalli. Maggiore è il grado di insaturazione di un acido grasso maggiore è la sua suscettibilità alla fase di iniziazione.

La fase di propagazione è costituita da una serie di reazioni di ossidazione dei radicali liberi che implicano la presenza di ossigeno e di acidi grassi (R'H); i prodotti che si ottengono sono radicali liberi (R.') e idroperossidi (ROOH), che vanno successivamente

incontro a reazioni di decomposizione formando vari composti, tra cui altri radicali. I prodotti finali sono aldeidi e chetoni a 7-10 atomi di carbonio, alcuni dei quali responsabili dei "flavor" negativi tipici di un olio rancido. La fase di terminazione è costituita da una serie di reazioni nelle quali i radicali liberi si associano per dare composti non radicalici oppure reagiscono con un composto antiossidante, come le sostanze fenoliche e in misura minore i tocoferoli. La conseguente riduzione dei radicali lipidici ostacola la propagazione dell'autossidazione lipidica. Quindi la qualità dell'olio vergine di oliva è strettamente legata all'attività antiossidante svolta dalle sostanze fenoliche idrofiliche in esso contenute (Gordon et al.; 1997; Chimi et al., 1991; Gutierrez Gonzales-Quijano et al., 1997; Chimi et al., 1998; Papadopoulos e Boskou; 1991; Ninfali et al., 2001; Bachiocca et al., 2001; Servili e Montedoro; 1989; Evangelisti et al., 1997 Briante et al., 2001). In questo senso numerosi studi sono stati condotti sulle proprietà antiossidanti delle sostanze fenoliche presenti nel VOO, da questi studi è emerso che la concentrazione totale dei composti fenolici, valutata colorimetricamente sull'estratto metanolico ottenuto dall'olio, ed espressa come polifenoli totali, è strettamente correlata con lo shelf-life dell'olio stesso. (Chimi et al., 1991; Gutierrez Gonzales-Quijano et al., 1997; Papadopoulos e Boskou; 1991). Il potere antiossidante dei polifenoli totali contenuti nell'olio vergine di oliva viene dosata con il metodo (ORAC) che esprime la capacità di assorbire l'ossigeno radicale. I metodi per la determinazione della stabilità ossidativa degli oli (shelf-life), sono basati essenzialmente sulla velocità di assorbimento dell'ossigeno da parte di queste sostanze messe a contatto con l'aria. Tale assorbimento di ossigeno può essere valutato indirettamente valutando la quantità di perossidi o di altri prodotti di dissociazione ottenuti durante la fase di ossidazione. Tra i metodi indiretti, quello storicamente più utilizzato risulta essere quello all'ossigeno attivo, AOM Active Oxygen Method, il quale sfrutta la determinazione del numero di perossido in condizioni controllate, tale metodica, però, ha come principale svantaggio l'elevato tempo necessario per l'analisi, nonché l'impossibilità di automatizzare l'intero procedimento. Per questo si preferisce il metodo diretto tramite l'apparato di Warburg metodo Rancimat. Dalla correlazione dei dati ORAC e Rancimat si è potuto stabilire che i composti fenolici riducono l'ossidazione dei trigliceridi presenti nell'olio vergine di oliva preservandone nel tempo la qualità. Lo studio dell'attività antiossidante di alcuni composti fenolici del VOO

quali, 3,4-DHPEA, *p*-HPEA e acidi fenolici (acido caffeico, acido ferulico acido siringico acidovanillico) a messo in evidenza che il 3,4-DHPEA ha potere un antiossidante maggiore rispetto agli altri composti sopra elencati (*Chimi et al., 1997; Chimi et al., 1998; Papadopoulos e Boskou; 1991*). L'attività antiossidante dei composti fenolici è stata studiata da *Baldioli et al., 1996*, in questa ricerca i derivati dei secoiridoidi sono stati isolati dall'olio e successivamente miscelati ad olio rettificato (privo di composti fenolici), la miscela è stata successivamente analizzata con il Rancimat test. I risultati ottenuti con il test hanno dimostrato che gli orto-difenoli quali 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA posseggono un alto potere antiossidante rispetto al *p*-HPEA e ai tocoferoli (*Baldioli et al., 1996; Gonzales-Quijano et al., 1997*). Quindi se ne deduce che il 3,4-DHPEA e tutti i derivati, dei secoiridoidei che contengono questo composto nella loro struttura molecolare (3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA) hanno una elevata azione antiossidante, proteggendo i trigliceridi dell'olio vergine di oliva dai fenomeni di natura ossidativa. La correlazione tra contenuto di lignani e stabilità dell'olio vergine di oliva è piuttosto controversa infatti alcuni autori sostengono (*Owen et al., 2000*) che la concentrazione dei lignani sia relazionata con l'attività antiossidante. Per contro altri autori asseriscono (*Tovor et al., 2001*) che non vi sia relazione tra contenuto dei lignani e del shelf life VOO. Negli ultimi anni sono stati condotti degli studi sul comportamento dell'olio vergine di oliva e in particolare della frazione fenolica ad esso associata durante i processi cottura e frittura. Da queste ricerche si è avuta una ulteriore conferma del ruolo che esplicano i derivati dell'oleuropea quali 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA nei confronti della stabilità dell'olio vergine di oliva. Infatti questi composti durante i processi di cottura subiscono un sostanziale e brusco decremento preservando l'olio che li contiene da fenomeni di natura ossidativa. Al contrario *p*-HPEA e i derivati del ligustroside come *p*-HPEA-EDA e *p*-HPEA-EA e i lignani contenuti in VOO, mostrano una notevole stabilità nei confronti dei processi di cottura, confermando in questo modo il loro scarso effetto sulla stabilità dell'olio vergine di oliva.

1.4.1 PROPRIETÀ SALUTISTICHE DEI COMPOSTI FENOLICI PRESENTI NEGLI OLI VERGINI DI OLIVA:

Molte ricerche sono state avviate sui componenti della dieta mediterranea, principalmente olio, con l'obiettivo di fornire un contributo alla spiegazione dei loro effetti nella prevenzione primaria e secondaria di alcune patologie. Su questa base cercheremo di fare un breve *excursus* sulle proprietà antiossidanti dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva. Il gruppo funzionale caratteristico di questi composti fenolici è un ossidrile (-OH) legato direttamente a un carbonio di un anello benzenico. Tale struttura influenza le proprietà di questi composti poiché il gruppo ossidrilico attiva le reazioni di sostituzione elettrofila nell'anello aromatico in quanto vi è la presenza di elettroni "mobili" o "disponibili". Tra le proprietà più significative conseguenti si annoverano l'attività idrofobica, la formazione di legami idrogeno, la formazione di complessi con i metalli (chelazione), proteine ed alcaloidi, la formazione di ossidi-esteri, le reazioni di condensazione con le aldeidi ed infine, la più importante, le reazioni di ossido-riduzione (redox). La possibilità di complessare i metalli e di scambiare protoni consente a questi composti di esercitare una spiccata attività inibitoria nei confronti dei fenomeni ossidativi di tipo enzimatico e non, in sistemi biologici sia in fase preventiva sia di iniziazione-propagazione, riducendo così lo "stress ossidativo". Ai composti fenolici, sono stati attribuiti effetti rilevanti nella prevenzione primaria e secondaria di alcune importanti patologie: cardiovascolari (*Ames et al., 2000*), oncologiche (*Block et al., 1992*) invecchiamento precoce (*Ames et al., 1993*), degenerative del sistema nervoso (*Hensley et al., 1994*)

e più recentemente anche nella spermatogenesi (*Brézillon et al 1998*); tutte legate alla presenza eccessiva di "radicali liberi" e proossidanti non radicalici ed ai loro effetti degenerativi. Al fine di favorire un quadro conoscitivo, seppure sintetico, sulle diverse attività legate agli effetti biologici in generale ed a quelli nutrizionali in particolare ricordiamo la loro partecipazione ai seguenti fenomeni:

a) formazione di complessi con ioni metallici (cofattori di enzimi e catalizzatori di processi redox);

b) formazione di molecole complesse con proteine, polisaccaridi ed alcaloidi;

c) formazione di addotti con l'ossigeno ed i suoi derivati instabili quali radicali e proossidanti (Reactive Oxygen Species o ROS) come indicato nella Tabella 14.

Tabella 14. Alcune importanti Specie Ossigenate Reattive (ROS) per gli organismi viventi.

Radicali liberi

Radicale ossidrilico	$\bullet\text{OH}$
Radicale superossido	$\bullet\text{O}_2^-$
Radicale ossido nitrico	$\text{NO}\bullet$
Radicale lipidico perossido	$\text{LOO}\bullet$

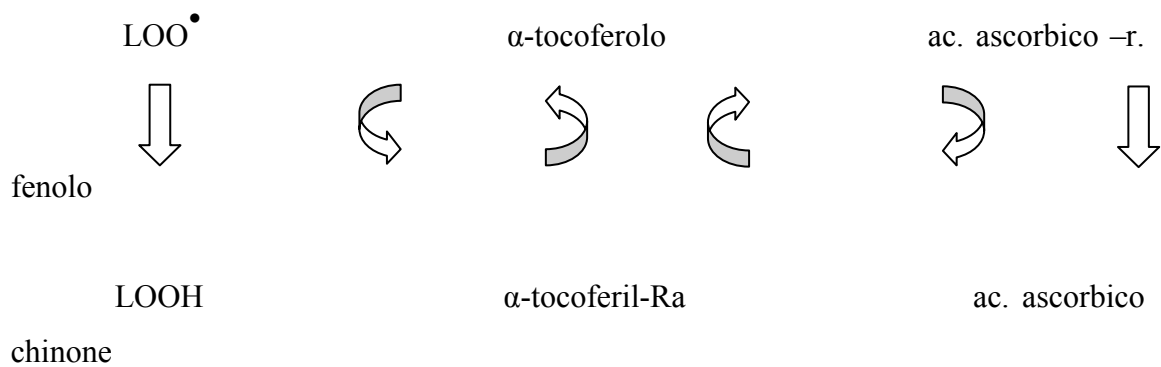
Non Radicali

Acqua ossigenata	H_2O_2
Ossigeno singoletto	$^1\text{O}_2$
Acido ipocloroso	HClO
Ozono	O_3

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono responsabile delle reazioni da stress ossidativo coinvolte in tutte le forme patologiche prima elencate. Le fonti delle specie reattive dell'ossigeno nell'organismo sono tutte le reazioni conseguenti alla catena respiratoria, alla fagocitosi, alla sintesi delle prostaglandine, al sistema del citocromo P450, in tutte queste reazioni una piccola parte dell'ossigeno sfugge alla normale utilizzazione portando così alla formazione di composti instabili ed altamente reattivi (ROS). È noto che a livello cellulare circa il 5 % del metabolismo dell'ossigeno si svolge attraverso reazioni di riduzione implicanti il trasferimento di un solo elettrone e la formazione a cascata di diverse forme radicaliche endogene ($\text{ROO}\bullet$, $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$) ed esogene ($\text{NO}\bullet$, $\bullet\text{ONO}_2^-$), che principalmente si situano intorno alla struttura mitocondriale ma possono distribuirsi anche in vari distretti cellulari, in relazione alla

loro polarità (neutra nel caso di radicale ossidrilico, polare come anione superossido). Nello Schema 1 sono descritte le possibili vie di “fuga” delle diverse forme radicaliche. Queste sostanze reagiscono con molecole organiche creando così uno stato di “proossidazione” all’interno della cellula e soprattutto nei suoi diversi compartimenti vitali: tra questi composti la struttura più reattiva è il radicale ossidrilico la cui semivita è stata valutata in circa 10^{-9} sec. La conseguenza di tale fenomeno è che tali composti funzionali divengono essi stessi dei radicali. Come già ricordato i substrati maggiormente interessati, con effetti e conseguenze patologiche, sono proteine e lipidi ma anche amminoacidi, acidi nucleici e nucleotidi. I prodotti di ossidazione delle sostanze lipidiche (idroperossidi ed aldeidi) interagiscono con il DNA ed alcuni carboidrati. I danni provocati toccano diversi aspetti della funzionalità primaria e secondaria cellulare (mutagenesi ed incremento del turnover, decremento delle attività enzimatiche, danni alle membrane, alterazione delle LDL e delle lipoproteine in generale, alterazione dei recettori-trasmettitori ed infine riduzione della viscosità dei fluidi). Nei confronti di questi meccanismi diversi sono gli interventi che vedono coinvolte le sostanze fenoliche:

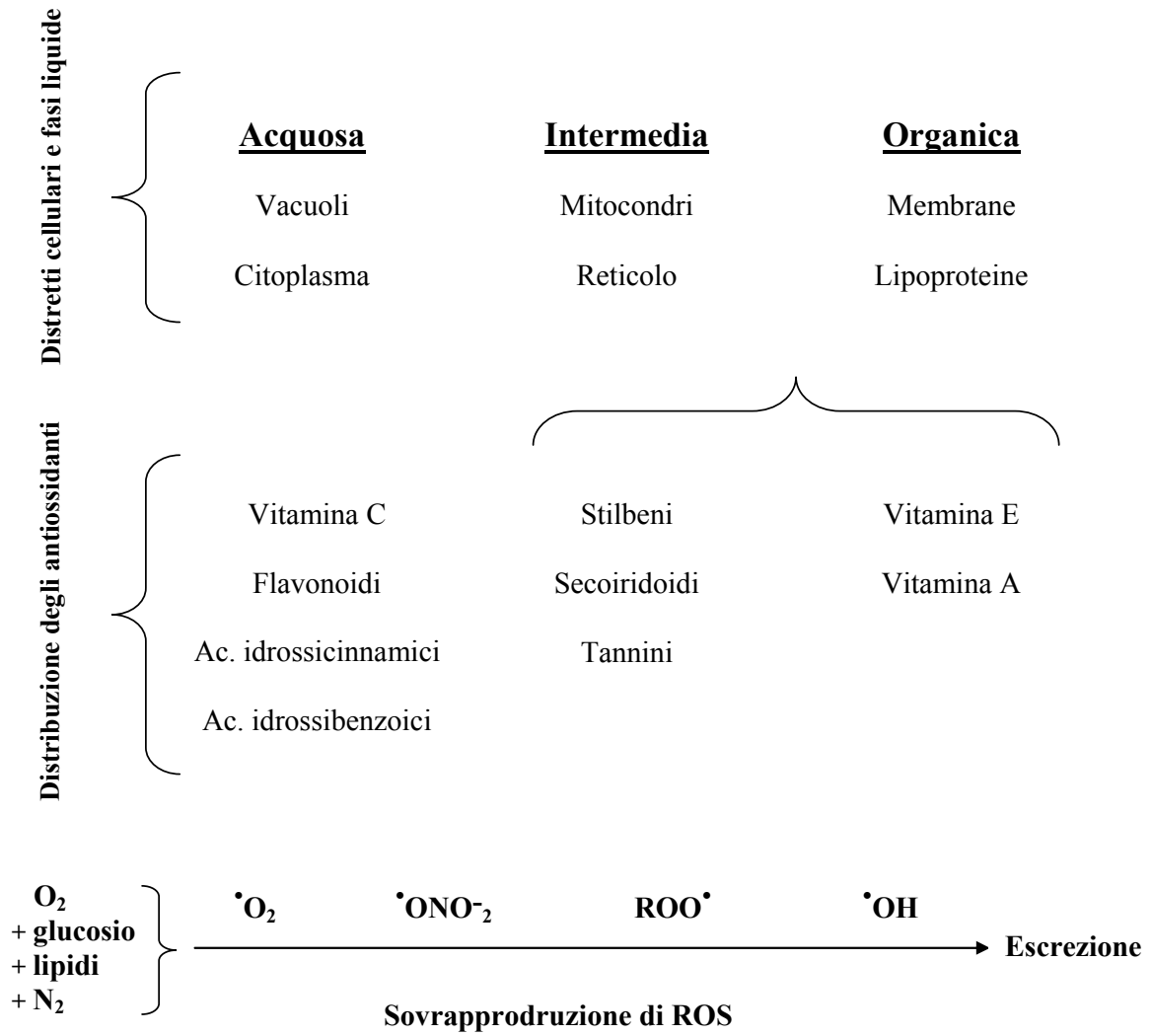
- a) riduzione delle possibilità di avviare la reazione e/o limitarne l’intensità fino all’interruzione mediante formazione di chelati, eliminazione dell’ O_2 (“head space”) e disattivazione dei derivati (scavenger), decomposizione degli idroperossidi in specie non radicaliche ed assorbimento nell’UV (poliossidazione). Generalmente questo tipo di attività è mostrata solo se nel mezzo è presente un secondo antiossidante attivo (secondario) ad azione complementare (sequestrante, riducente). Da questo punto di vista tutti i polifenoli sono sequestranti (come nel caso della chelazione). Come riducenti sono abilissimi ad intervenire nei meccanismi di salvaguardia dell’acido ascorbico in presenza di tocoferolo;



- b) interruzione della reazione ossidativa (chain-breaking antioxidation) in cui l'antiossidante reagisce con l'O₂ attivo ed il "radicale" (lipidico) e li converte in un composto stabile (primary antioxidants).

Al riguardo preme ricordare che possono sussistere delle condizioni (elevate concentrazioni) in cui si verifica una perdita di attività antiossidante fino alla inversione, esercitando un'attività proossidante (Montedoro et al., 1992). Il diverso potenziale antiossidante delle numerose molecole (poli)fenoliche dipende in parte dalla stessa struttura molecolare, dalla loro interazione con altre strutture antiossidanti (effetto sinergico), dalla partizione tra la fase acquosa e quella lipidica in sistemi complessi come il cibo, ma, più direttamente, dalla presenza di gruppi metossilici ([•]OCH₃), di due o più ossidrili in posizione vicinale (incremento della stabilità dei radicali ossiarilici per formazione di legami idrogeno intramolecolari).

Schema 1. Compartimentazione degli organelli cellulari, delle fasi liquide e distribuzione di antiossidanti e ROS.



Come già accennato in precedenza, tra le sostanze più recettive a subire l'insulto ossidativo esplicito dai ROS ricordiamo gli acidi grassi che costituiscono le membrane cellulari, e delle lipoproteine (LDL), le proteine, i peptidi e gli amminoacidi di natura enzimatica, le basi azotate che formano il DNA e l'RNA. Le LDL ossidate non sono più capaci di svolgere il loro ruolo (trasporto del colesterolo) quindi si accumulano all'interno dei vasi sanguigni, costituendo così la principale causa dell'aterosclerosi (Berliner et al., 1995). I danni di natura ossidativi subiti dall'DNA sono spesso coinvolti nei processi di carcinogenesi (Nakae et al., 1997). I ROS risultano essere coinvolti nei processi infiammatori a carico dell'intestino come la colite ulcerativa cronica (IBD), in questo caso il danno all'intestino è causato da un'iperproduzione di ROS da parte dei linfociti che si accumulano sulla superficie epiteliale della mucosa intestinale (Orlando et al., 2002). Inoltre la produzione delle specie reattive dell'ossigeno è implicata nel ciclo della cicloossigenasi (COX 2), questa ultima provoca la produzione di diversi fattori quali (IL1, TNF- α , LPS), che sono a loro volta responsabili di processi infiammatori, IBD e tumori (Rocca e Fitzgerald; 2002). Lo stress ossidativo è in stretta relazione con i processi di invecchiamento. Avendo la necessità di produrre energia, l'organismo produce inevitabilmente ROS durante tutto l'arco della vita favorendo in questo modo l'invecchiamento. Tale teoria è stata confermata da studi condotti sui ratti, nei quali si è visto che la formazione della superossido dismutasi è fortemente aumentata negli individui anziani rispetto a quelli giovani (O'Donnell e Lynch; 1998) (Benkovic e Condor; 1993;) aggiungere GSH Recentemente (Giovannelli et al., 2002) hanno visto che i danni ossidativi a carico del DNA della sostanza nigra del cervello aumenta notevolmente in ratti anziani, favorendo in questo modo la progressione di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson (Giovannelli et al., 2003). La produzione incontrollata dei radicali liberi dell'ossigeno può provocare gravi danni all'organismo umano il quale, però si difende, in parte con gli antiossidanti in parte di natura congenita ed in parte assunti con l'alimentazione. Si comprende da ciò quanto importante sia migliorare il patrimonio antiossidante, ma non potendo noi influire sulla componente costituzionale, dovremmo cercare di incrementarne l'assunzione alimentare. in modo da mantenere in costante equilibrio la bilancia ossidativa. Per questa ragione negli ultimi anni i cibi ricchi di composti antiossidanti, frutta, verdura e olio di oliva, hanno ricevuto particolare attenzione, un ruolo molto importante è stato

attribuito all'olio vergine di oliva. L'olio vergine di oliva è un tipico componente della dieta mediterranea ad esso sono state attribuite proprietà antitumorali. Gli studi condotti *Martin Moero et al., 1994; Trichopoulou et al., 1995 e La Vecchia et al., 1995* dimostrano che un aggiunta di olio di oliva nella dieta riduce il rischio di tumori al seno, il risultato è stato poi confermato da studi condotti da altri autori *Lipworth et al., 1997 e kushi e Giovannucci; 2002*. L'olio di oliva è risultato essere coinvolto anche nella prevenzione di altri tipi di tumori che si originano negli organi più disparati: pancreas (*Soler et al., 1998*), cavità orale e esofago (*Bosetti et al., 2003*) colon retto (*Stoneham et al., 2000*), prostata (*Tzonou et al., 1999; Hodge et al., 2004*) e polmoni (*Fortes et al., 2003*). Studi condotti su modelli animali hanno dimostrato che la somministrazione dell'olio di oliva è in grado anche di contrastare i danni provocati dalle radiazioni UV a carico dell'epidermide (*Ichihashi et al., 2003*), e risulta essere un fattore di prevenzione per il cancro dell'colon nei ratti (*Bartoli et al., 2000*). L'effetto protettivo svolto dall'olio nei confronti di queste gravi malattie viene attribuito alle sostanze fenoliche, in particolare all'idrossitiroso piuttosto che a agli acidi grassi insaturi in esso contenuto. L'azione protettiva svolta dalle sostanze fenoliche contenute nell'olio sono molteplici di seguito verranno elencate le più importanti. I composti fenolici sono responsabili della riduzione della perossidazione dei fosfolipidi liposomiali (*Aschbach et al., 1994*) limitano la per perossidazione delle LDL (*Grignaffini et al., 1994; Visioli et al., 1995*) limita l'aggregazione piastrinica che conduce alla formazione delle placche aterosclerotiche, il fenomeno dell'aggregazione viene attivato dalla liberazione, del trombossano derivato dell'acido arachidonico per azione della ciclossigenasi in particolare il 3,4-DHPEA inibisce l'enzima ciclossigenasi (azione aspirina simile), limitando così l'aggregazione delle piastrine (*Manna et al., 1999; Petroni et al., 1995*). Inoltre i composti fenolici impediscono l'ossidazione delle basi azotate del DNA causata dalla perossido nitrico (*Dejana et al., 1999*), la produzione dei radicali liberi nella matrice fecale (*Owen et al., 2000*), coinvolti nei tumori dell'intestino, inibiscono i processi infiammatori in modelli animali (*Martinez-Dominquez et al., 2001*). Recentemente studi in vitro hanno aperto, interessanti prospettive sul ruolo svolto dal 3,4-DHPEA nei confronti, dell'inibizione della proliferazione cellulare incontrollata, infatti bloccano il ciclo cellulare in fase G0/G1 inducendo l'apoptosi nelle cellule (HL 60) tumorali (*Fabiani et al., 2002*).

1.4.2 PROPRIETÀ BIOLOGICHE DEI TOCOFEROLI CONTENUTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA.

Come già visto in precedenza i tocoferoli (vitamina E) rivestono un ruolo importante quali antiossidanti naturali, responsabili della conservabilità e della stabilità nel tempo dell'olio in cui sono contenuti, anche se in misura molto minore rispetto alle sostanze fenoliche. Essi inoltre in sinergia con i composti fenolici, svolgono un ruolo fondamentale nel mantenere l'integrità delle membrane cellulari biologiche evitando la formazione di radicali liberi e rallentando il fenomeno dell'ossidazione delle lipoproteine. Per cui si è ipotizzato che il potere antiossidante dei tocoferoli fosse responsabile della protezione nei confronti di alcune malattie cardiovascolari. A tal proposito dagli anni '80 in poi si sono effettuati numerosi studi epidemiologici per valutare una potenziale correlazione tra apporto di vitamina E e malattie cardiovascolari. Tali ricerche, basate sulla somministrazione di dosi elevate di vitamina E per almeno due anni, fornite sotto forma di integratori, piuttosto che di alimenti ricchi di tale sostanza, hanno dimostrato la riduzione significativa del rischio di coronopatie (*Jha et al.*, 1996). Per contro è stato dimostrato che integrazioni a breve termine ed a basso dosaggio di vitamina E, non hanno sortito effetti importanti su queste patologie (*Stampfer et al.*, 1995). In antitesi con quanto ottenuto, le ricerche di intervento terapeutico finora completate, non hanno dato una risposta chiara: in uno studio di prevenzione secondaria, condotto dal gruppo italiano GISSI (Gruppo Italiano Studio Sopravvivenza Infarto Miocardico), la somministrazione di 300 mg giornalieri di α -tocoferolo per 3-5 anni non ha ridotto il rischio di morte o di infarto del miocardio (*GISSI*, 1999). Nell'anno 2000 si è concluso un altro studio che ha dimostrato come il trattamento con 268 mg giornalieri di α -tocoferolo per 1, 4, e 5 anni non sortisca alcun effetto significativo sugli esiti clinici di pazienti ad elevato rischio di malattie cardiovascolari (*Yusuf et al.*, 2000); nel complesso quindi, le ricerche fin qui condotte, non hanno fornito prove convincenti che consentano di raccomandare l'integrazione di vitamina E come misura sanitaria generale. In sintesi, l'attività biochimica manifestata da questa sostanza, non è correlabile alle sue proprietà antiossidanti ma piuttosto, sembra essere legata ad effetti diretti sull'espressione genica nei confronti delle molecole preposte all'adesione o sull'attività di enzimi quali la 5-lipossigenasi e la chinasi.

1.5. PROPRIETÀ SENSORIALI DELLA FRAZIONE FENOLICA CONTENUTA NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA.

Colore e “aroma” sono due importanti attributi certamente qualitativi dei prodotti alimentari tra i quali certamente non fa eccezione l’olio di oliva. Al primo partecipano i pigmenti liposolubili come clorofilla, feofitine, xantofille e carotenoidi, al secondo un più numeroso repertorio di composti volatili aromatici ed i polifenoli. Numerose distinte sensazioni gustative possono essere spiegate dalle differenti parti della cavità orale quando entrano in contatto con diversi composti chimici. La loro intensità dipende dal numero di siti gustativi delle papille fungiformi, dalla struttura e dalla natura delle molecole con cui vanno in contatto. Mentre l’astringenza caratteristica dei composti fenolici tannici interessa tutta la lingua (per effetto dell’inattivazione della ptialina), l’amaro di cui sono responsabili molti di questi stessi composti, è percepito nella parte posteriore e laterale della lingua. Tale sensazione è dovuta all’interazione tra le molecole polari e i lipidi che costituiscono la porzione di membrana delle papille gustative. Nell’olio vergine di oliva le sostanze fenoliche sono associate alla sensazione di amaro e accanto a questa provocano una reazione gustativa molto distinta e specifica che si manifesta come un senso di bruciore orale che in analisi sensoriale è stata definita con il termine di pungenza, in quanto ricorda l’effetto esercitato dal peperoncino e dal pepe. Diversi studi sono stati condotti per dimostrare la relazione tra la sensazione di amaro e pungenza dell’olio vergine di oliva e la concentrazione totale di sostanze fenoliche in esso presenti (*Gutiérrez Rosales et al., 1992; Montedoro et al., 1992*). Tuttavia il rapporto tra le singole frazioni fenoliche idrofiliche contenute nel VOO e le note sensoriali di amaro e pungenza non sono del tutto chiarite. Infatti *Graciani Costante e Vasquez Roncero; 1981*, esaminando numerosi campioni di VOO con composizione fenolica (determinata per HPLC) diversa, non sono riusciti a stabilire una correlazione con il loro profilo sensoriale. A conferma di questo studio *Ucella et al 2001* hanno purificato dall’olio la frazione fenolica idrofilica, dopodiché le hanno sciolte in una soluzione lipofila ma il test non ha stabilito relazione tra concentrazioni fenoliche e sensazione di amaro. Durante gli ultimi dieci anni molti autori hanno focalizzato le loro ricerche sull’impatto

sensoriale determinato dai derivati secoiridoidei presenti nell'VOO. Diversi autori sostengono che i derivati dei secoiridoidi quali 3,4- DHPEA-EDA e 3,4- DHPEA-EA sono quelli che maggiormente contribuiscono a dare la sensazione di amaro nell'olio vergine di oliva (*Garcia et al., 2001*). Altri ricercatori (*Tovar et al., 2001*), hanno dimostrato che nell'olio la sensazione di amaro e pungenza è strettamente correlata con il contenuto dei derivati del ligustroside quale il *p*-HPEA-EDA. Negli ultimi anni *Gutierrez-Rosales et al., 2003* hanno ottenuto una soddisfacente relazione lineare tra i derivati dell'oleuropeina e dell'ligustroside (3,4- DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA) contenuti del VOO e la nota di amaro e pungenza. Della nota di pungenza nell'olio il principale responsabile è il *p*-HPEA-EDA, infatti (*Andrewes et al., 2003*), isolando dal VOO i derivati dei secoiridoidi si è visto che le frazioni che contengono una maggiore quantità di *p*-HPEA-EDA, a livello gustativo, mostrano spiccate caratteristiche di pungenza, mentre le frazioni che presentano alte concentrazioni di 3,4- DHPEA-EDA hanno una bassa sensazione di pungenza. La nota olfattiva dell'olio in realtà, è molto più complessa di quella sopra citata, in quanto oltre ai composti fenolici partecipano anche una serie di composti volatili a temperatura ambiente, nell'insieme queste sostanze definiscono un quadro sensoriale complessivo che viene considerato anche il printing identificativo del prodotto.

1.6 SEPARAZIONE DEI COMPOSTI FENOLICI PRESENTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA .

Contenuto fenolico totale dell'olio vergine di oliva.

La concentrazione fenolica totale presente nell'olio vergine di oliva viene determinata con il metodo colorimetrico a 765 nm, che prevede l'utilizzo del reattivo Folin-Ciocalteu sull'estratto metanolico ottenuto dall'olio vergine di oliva. Per ottenere l'estratto metanolico 10 ml di una soluzione metanolo/acqua (80:20 v/v) più Tween 20 (2% v/v) viene miscelata con 10 gr di olio di oliva, la miscela viene poi omogeneizzata con l'ultra-turrax T 25 a 15000 g per un minuto, a questo punto l'omogenato viene centrifugato per dieci minuti a 5000 g. Dopo la centrifugazione viene raccolto il surnatante (estratto metanolico) dove sono presenti le sostanze fenoliche (l'estrazione

viene ripetuta per due volte). L'estratto metanolico così ottenuto viene posto in congelatore a per 24 h a -20 °C questo per permettere la decantazione dell'olio residuo nel estratto metanolico (*Montedoro e Cantarelli, 1969; montedoro et al., 1978; Vasquez Roncero, 1978; Solinas e cichelli, 1981*). All'estratto metanolico così ottenuto viene aggiunto il reattivo Folin-Ciocalteu, quest'ultimo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico e fosfomolibdico, che in presenza dei polifenoli si ossida, portando portando alla formazione di un complesso colorato che assorbe a 765 nm , la concentrazione totale dei polifenoli viene espressa in funzione dell'idrossitiroso.

Valutazione delle frazioni fenoliche contenute nell'olio di oliva.

In letteratura sono riportati diversi metodi per la determinazione dei composti fenolici nel VOO (*Vasquez Roncero, 1978; Solinas e Cichelli, 1981; Cortesi e Fedeli, 1983; Solinas, 1987; Montedoro et al., 1992; Tsimidou et al., 1996; Mannino et al., 1993; Montedoro et al., 1992, Angerosa et al., 1995; Angerosa et al., 1996; Owen et al., 2000; Cortesi et al., 2002; Romero et al., 2002; Brenes et al., 2002; Baldioli et al., 1996*), le principali differenze tra questi metodi proposti, sono riconducibili a differenti procedure per la separazione dei fenoli dalla matrice oleosa e ai diversi sistemi di rivelazione per quantificarli.

Estrazione delle sostanze fenoliche dalla matrice oleosa.

Per estrarre le sostanze fenoliche dall'olio vengono utilizzate sostanzialmente due tecniche: estrazione liquido-liquido (LLE) (*Vasquez Roncero, 1978; Solinas e cichelli, 1982; Cortesi e Fedeli, 1983; Solinas, 1987; Montedoro et al., 1992; Tsimidou et al., 1996*) e estrazione in fase solida (SPE) (*Servili et al., 1999; Mannino et al., 1993; Pirisi et al., 1997; Pirisi et al., 2000*). Per estrarre i composti fenolici tutte le tecniche LLE riportate in letteratura utilizzano una miscela di metanolo ed acqua, l'unica differenza tra questi metodi, sta nella quantità di acqua presente nella miscela che va dallo 0% al 40%. In alcuni casi prima di procedere con l'estrazione LLE al VOO viene aggiunto un solvente lipofilo che può essere esano (nella maggior parte dei casi), o etere di petrolio o cloroformio, tale aggiunta viene effettuata al fine di migliorare la capacità di recupero delle sostanze fenoliche (*Vasquez Roncero, 1978; Solinas e Cichelli, 1981; Cortesi e Fedeli, 1983; Solinas, 1987; Tsimidou et al., 1996*). Vista l'ampia gamma di tecniche LLE sono stati fatti degli studi per vedere quale tra queste fosse la più efficiente

nell'estrarre i composti fenolici dalla matrice oleosa. A tal proposito *Montedoro et al.* 1992 ha comparato le diverse metodiche LLE, giungendo alla conclusione che i risultati migliori si ottengono con una miscela di metanolo e acqua nelle proporzioni 80: 20 (v/v). Inoltre ha dimostrato che l'aggiunta di esano o altro solvente organico in prima dell'estrattiva non ha nessun effetto sull'efficienza di recupero dei composti fenolici presenti nella matrice oleosa. Negli ultimi anni è stata proposta una nuova tecnica LLE (*Brenes et al.*, 2000), che al posto della miscela composta da metanolo ed acqua si avvale del uso di N,N-dimetilformammide. Il metodo proposto da *Brenes et al.* 2000 è molto interessante per diversi motivi: si effettua con quantitativi di VOO e solventi molto bassi, è molto rapido, e presenta dei soddisfacenti risultati in termini di efficienza di recupero delle sostanze fenoliche; rispetto alla classica estrazione liquida, condotta con la miscela metanolo e acqua 80:20 (v/v) l'estrazione delle sostanze fenoliche dalla matrice oleosa condotta in fase solida viene effettuata utilizzando delle cartucce C18, (la fase stazionaria è costituita da octadecilsilossano) come solvente di eluizione alcuni autori utilizzano metanolo (*Mannino et al.*, 1993), altri invece acetonitrile (*Pirisi et al.*, 2000). Dal confronto tra i due metodi utilizzati per estrarre i composti fenolici dall'olio vergine di oliva sono emersi risultati contrastanti. Infatti alcuni autori (*Servili et al.*, 1999) hanno dimostrato che l'estrazione in fase liquida condotta con metanolo e acqua 80:20 (v/v) (*Montedoro et al.*, 1992) è molto efficiente nel recupero dei derivati dei secoiridoidi, mentre lo è molto meno per i fenoli semplici presenti nel VOO, invece l'estrazione in fase solida presenta un comportamento opposto alla prima (mostrando maggiore efficienza nei riguardi dei fenoli semplici). Tuttavia sostituendo il solvente di estrazione sia in fase liquida che solida con acetonitrile (*Pirisi et al.*, 2000) i risultati cambiano nel senso tra i due metodi non c'è alcuna differenza in termini di recupero delle sostanze fenoliche presenti nella matrice

Separazione e valutazione delle frazioni contenute nell'estratto fenolico.

Questa come già detto prima viene effettuata attraverso tecniche cromatografiche, di queste la più usata è l'HPLC. La cromatografia è un metodo chimico-fisico di separazione che sfrutta la tendenza delle varie sostanze distribuirsi, secondo determinati rapporti, tra due fasi distinte e separate, di cui una è mantenuta fissa e l'altra è mobile. Questo metodo fu scoperto dal botanico russo Tswett, che lo utilizzò per la separazione di componenti vegetali, dopo alcuni decenni si diffuse rapidamente come valido metodo di separazione, tra i più efficienti che attualmente l'analisi chimica abbia a disposizione. Va precisato che questa particolare efficacia è dovuta al fatto che in cromatografia la separazione viene realmente attuata, contrariamente a quanto succede nella maggior parte degli altri metodi analitici come, ad esempio in spettrofotometria, laddove i singoli componenti rimangono uniti e la separazione consiste nell'evidenziare il diverso comportamento delle sostanze di fronte alla radiazione. Attualmente la cromatografia si differenzia in un gran numero di tecniche operative e strumentali, che sono basate tutte sugli stessi principi, ma si differenziano nella pratica attuazione del principio stesso. Dal punto di vista teorico la cromatografia si basa su principi teorici diversi, tra cui l'adsorbimento, la ripartizione e lo scambio ionico. Ciascuno di questi, a sua volta, può essere sfruttato con equipaggiamenti strumentali molto diversi, che vanno da un semplice foglio di carta porosa che pesca in una bacinella contenente solvente, a sistemi elettronici computerizzati. Comunque è bene tenere presente, che queste tecniche cromatografiche, diversificate tra loro, sono tutte basate su processi di natura assolutamente continua, ed hanno la caratteristica comune di realizzare la separazione attraverso lo scorrimento di una fase mobile, contenente le sostanze da separare, su una fase fissa, che esercita una azione selettiva nei loro confronti. Nello schema 2 sono riportate le varie tecniche cromatografiche suddivisi in base allo stato fisico della fase mobile, in funzione del principio chimico-fisico sfruttato e della strumentazione utilizzata.

Schema. 2 Classificazione dei metodi cromatografici.

FASE MOBILE	STRUMENTAZIONE	PRINCIPIO DI SEPARAZIONE	TECNICA
Liquida	Colonna	Ripartizione	LLC
		Adsorbimento	LSC
		scambio Ionico	IEC
		Esclusione	GPC
	Strato Sottile	Ripartizione	TLC
		Adsorbimento	TLC
		scambio Ionico	TLEC
Cromatografo Liquido	Ripartizione	HPLC	
Gassosa	Gas Cromatografo	Ripartizione	GLC
		Adsorbimento	GSC

La cromatografia su colonna in fase liquida ha subito, in tempi più recenti, un'evoluzione tecnologica che ha trasformato la semplice colonnina di vetro contenente la fase fissa, in apparecchi elettronici complessi. Questa nuova tecnica viene solitamente indicata come cromatografia liquida ad alte prestazioni o anche cromatografia liquida ad alte pressioni o più comunemente HPLC. I principi del HPLC sono sempre quelli dell'adsorbimento e della ripartizione, ma le fasi stazionarie sono impaccate in colonne chiuse, con materiali di granulometria molto fine (5-10 μm) e controllata: in tal modo viene aumentata la superficie di contatto fra fase mobile e fase stazionaria e l'impaccamento diviene più omogeneo. Utilizzando queste colonne è necessario che la fase mobile venga fatta fluire ad alta pressione perché, attraverso colonne con impaccamento a granulometria così fine, il flusso dell'eluente diventa molto lento. Con l'impiego di pompe particolari, capaci di applicare pressioni di 50-150 atm, diventa possibile ottenere flussi di alcuni ml/min, sufficienti ad ottenere l'eluizione in tempi ragionevolmente brevi. Le fasi stazionarie utilizzate per la separazione dei composti fenolici contenuti nell'olio vergine di oliva lavorano in fase inversa ovvero, sono meno

polari della fase mobili. Le fasi stazionarie inverse usate sono in genere formate da silice su cui sono legati dei gruppi non polari. I gruppi non polari che più spesso si trovano legati alla superficie del supporto sono i gruppi organici $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_{17}$, $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. Di questi il gruppo a 18 atomi di carbonio (gruppo ottadecil) è il più frequente. I nomi comunemente usati per questo tipo di fase stazionaria sono ODS e C18. Con questo tipo di fasi stazionarie non polari di solito l'eluizione viene condotta con fase polare, che è quasi sempre una miscela di solvente polare e di uno apolare, in modo da poterne variare la forza mediante la composizione. In questo caso saranno le sostanze polari, trascinate dalla fase mobile ad essere eluite per prime. L'eluente, dopo aver attraversato la colonna cromatografica, viene spesso chiamato eluito. La valutazione qualitativa e quantitativa delle separazioni cromatografiche possono essere ricavati sottoponendo gli eluiti ad ulteriori misurazioni, che possono essere eseguite in continuo. Le misurazioni in continuo possono essere ottenute facendo passare l'eluito attraverso un rivelatore strumentale. Il rivelatore registra la variazione di una determinata proprietà dell'eluito mentre questo lo attraversa. Un tipico esempio è la variazione nel tempo dell'assorbanza quando un analita passa attraverso il rivelatore. Si può, infatti, osservare un aumento ed una successiva diminuzione (o viceversa) della luce assorbita rispetto alla linea di base. Tale variazione si verifica ogni volta che uno dei componenti arriva, attraversa, e lascia il rivelatore. Se la variazione nel tempo è registrata su carta, in un grafico, oppure immagazzinata nel file di un computer, l'immagine è formata da una serie di picchi che prende il nome di cromatogramma. Per operare correttamente i rilevatori devono possedere le seguenti caratteristiche:

1. Alta sensibilità
2. Ampio range di linearità. La diretta proporzionalità del segnale alla concentrazione o quantità dell'analita deve coprire un ampio intervallo di valori.
3. Basso disturbo. Il disturbo (noise) è l'oscillazione del segnale nei due sensi che può anche formare picchi, positivi o negativi. Limita la sensibilità del rivelatore.
4. Bassa deriva. La deriva (drift) è l'allontanamento della linea di base dalla linea orizzontale.

5. Alta efficienza della cella. Definita anche come larghezza di banda strumentale, è determinata dal volume della cella, che deve essere il più piccolo possibile per mantenere i componenti eluiti in bande nette con trascurabile effetto diluizione.

I rivelatori più usati sono ad assorbimento a serie di diodi a fluorescenza, a indice di rifrazione, elettrochimico (amperometrico e a conducibilità), a spettrometro di massa. L'analisi dei picchi cromatografici ci permette di individuare la presenza di uno specifico componente (analisi qualitativa), e quantificare le sostanze presenti nella miscela (analisi quantitativa). L'analisi quantitativa delle sostanze presenti in una miscela in cromatografia può essere valutata, in base al fatto che il segnale prodotto dal rivelatore è, ad ogni istante, proporzionale al flusso delle molecole eluite (cioè massa nell'unità di tempo, $s = dm/dt$), si deduce che la quantità totale di sostanza eluita sarà data dall'integrale $m = \int s dt$ cioè dall'area sottesa al picco cromatografico. Tuttavia la proporzionalità tra aree e concentrazioni sussiste solo nel caso in cui il rivelatore sia rigorosamente aspecifico. Quindi bisogna tener conto della risposta di quest'ultimo, nei confronti delle varie sostanze analizzate, introducendo dei fattori correttivi come standardizzazione interna ed esterna. Le tecniche HPLC adottate nella separazione e valutazione delle sostanze fenoliche presenti nell'estratto fenolico differiscono tra loro per il metodo di rivelazione applicato. Il sistema di rivelazione più usato per l'identificazione delle sostanze fenoliche è quello ad assorbimento a serie di diodi. Nel rivelatore a serie di diodi la luce UV proveniente da una lampada a deuterio passa attraverso una cella a flusso prima che venga scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa ad ogni lunghezza d'onda viene misurata simultaneamente attraverso un sistema di alcune centinaia di fotodiodi. Un computer può processare, registrare e mostrare gli spettri di assorbimento in continuo durante l'analisi. Inoltre si possono registrare i cromatogrammi a ciascuna λ . Il rivelatore a serie di diodi risulta essere molto versatile: è possibile selezionare λ che vanno da 190 a 800 nm, mostra elevata sensibilità, (potendo scegliere la λ ottimale (max assorbenza) per un analita), è piuttosto selettivo, infatti quando si hanno sovrapposizioni di picchi si può variare la λ in modo tale da minimizzare l'assorbimento degli interferenti. Il largo uso del detector a serie di diodi (*Solinas e cichelli, 1982; Cortesi e*

Fedeli, 1983; Solinas, 1987; Montedoro et al., 1992; Tsimidou et al., 1996; Owen et al., 2000; Pirisi et al., 1997; Pirisi et al., 2000; Brenes et al., 1999) per le analisi qualitative e quantitative dell'olio vergine di oliva è dovuto al fatto che è in grado di fornire spettri di assorbimento, che ci permettono di identificare con certezza le sostanze fenoliche separate tramite HPLC. Questo aspetto è molto importante per la valutazione analitica delle sostanze fenoliche presenti nel VOO. Infatti per effettuare un'analisi quantitativa dei composti fenolici abbiamo bisogno di conoscere il loro fattore di risposta questo si ottiene iniettando in HPLC gli standard delle sostanze. Purtroppo in commercio sono disponibili solo gli standard degli acidi fenolici i derivati dei secoiridoidi e lignani devono essere purificati dall'olio. Pertanto la purificazione dei lignani e derivati dei secoiridoidi può essere ottenuta utilizzando la cromatografia HPLC con sistema di rivelazione a serie di diodi in quanto ci permette con certezza di identificarli e procedere poi alla loro quantificazione. Alcuni autori (*Mannino et al., 1993*) hanno utilizzato un rivelatore elettrochimico (EC) per l'analisi delle sostanze fenoliche. Questo rivelatore permette l'analisi di composti elettroattivi che possono essere ossidati o ridotti. Ad esempio possono essere elettrochimicamente ossidati i fenoli, le ammine, mercaptani, perossidi, purine e alcuni eterocicli. Mentre possono essere elettrochimicamente ridotte le aldeidi, chetoni e i nitrocomposti. Un potenziale costante viene mantenuto tra l'elettrodo di lavoro e l'elettrodo di riferimento e la corrente, prodotta dalla reazione di ossidazione o riduzione dell'analita, è misurata tra l'elettrodo di lavoro e il contro elettrodo ed è proporzionale alla concentrazione di analita nel campione. La comparazione tra il detector UV a serie di diodi, e quello EC (*Tsimidou et al., 1996; Brenes et al., 2000*) ha mostrato che quest'ultimo è molto sensibile ed capace di rivelare quantità minime di sostanze fenoliche rispetto al sistema UV a serie di diodi. Negli ultimi anni *Cartoni et al.* 2000 hanno proposto l'utilizzo di un detector fluorimetrico per la valutazione delle sostanze fenoliche. Il principio di funzionamento del detector a fluorescenza è il seguente: la luce UV proveniente da una lampada (filtrata alla opportuna λ) o da un laser, passa attraverso la cella a flusso. Quando un campione fluorescente passa attraverso la cella, assorbe la radiazione, viene eccitato e quindi emetterà la radiazione di fluorescenza ad una maggiore λ . L'intensità della luce emessa viene misurata attraverso un fotomoltiplicatore posto a 90° rispetto al fascio incidente. L'utilizzo del rivelatore a fluorescenza, se paragonato al detector UV a serie di diodi

all'elettrochimico e allo spettrometro di massa (*Brenes et al., 2000*) si è dimostrato molto efficace per la valutazione dei composti fenolici, in generale, e in particolare, per i lignani. La capacità del detector a fluorescenza di discriminare i lignani, rende interessante il suo utilizzo nelle analisi routinarie del VOO. L'altro tipo di rivelatore utilizzato per l'identificazione delle sostanze fenoliche presenti nell'olio vergine è lo spettrometro di massa (MS), applicato sia alla cromatografia liquida (HPLC-MS o LC-MS), che gassosa (GC-MS). Lo spettrometro di massa può fornire informazioni qualitative e quantitative sui componenti della miscela analizzata mediante HPLC o GC. Per ottenere uno spettro di massa, le molecole portate in fase gassosa, vengono ionizzate. Gli ioni sono quindi accelerati per mezzo di un campo elettrico e vengono poi separati in base al loro rapporto massa/carica (m/q). L'accoppiamento HPLC-MS è una tecnica relativamente "giovane" e sempre più utilizzata. L'accoppiamento HPLC/MS è stato tentato già molti anni fa (fine anni '60), ma soltanto dalla metà degli anni '70 appaiono le prime pubblicazioni scientifiche. Le difficoltà di tutti i metodi HPLC-MS derivano dal fatto che in HPLC si utilizzano solventi molto diversi, in funzione del tipo di analisi, (es. acqua, solventi organici, tamponi); inoltre i flussi in LC sono molto elevati rispetto a quelli richiesti per lo spettrometro di massa. Per accoppiare le due tecniche sono pertanto necessarie opportune interfacce che oltre a ridurre i flussi dovranno consentire anche la vaporizzazione degli analiti mediante riscaldamento. Le tecniche di LC-MS e GC-MS vista la loro alta sensibilità possono essere utilizzate sia per compiere analisi qualitative che quantitative dei composti fenolici presenti nel VOO (*Rovellini e Cortesi., 2002 Cortesi et al., 1997; Angerosa et al., 1995; Angerosa et al., 1996; Owen et al., 2000; Brenes et al., 2000*). Tuttavia anche se LC-MS e GC-MS permettono di ottenere ottimi risultati sono poco utilizzati per compiere le analisi di tipo routinario sui composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva, questo perché sono degli apparecchi molto costosi e di difficile gestione, per tale motivo si preferisce l'HPLC accoppiata al rivelatore UV, visto che questo è di facile gestione, e consente di ottenere buoni risultati a bassi costi. Per ottenere l'esatta concentrazione dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva, è indispensabile conoscere i loro fattori di risposta nei confronti del detector utilizzato per rivelarli. Solitamente la concentrazione delle sostanze fenoliche viene riferita all'acido gallico, acido caffeico e 3,4-DHPEA, (normalmente reperibili in commercio), naturalmente queste sostanze (acido

gallico, acido caffeico e 3,4-DHPEA) non hanno lo stesso fattore di risposta degli altri componenti fenolici quali i derivati dei secoiridoidi e i lignani presenti nel VOO (Montedoro et al., 1992; Owen et al., 2000; Baldioli et al., 1996). Questo ovviamente porta ad una grossa differenza in termini di concentrazione dei secoiridoidi e dei lignani contenuti nel VOO, che non può essere spiegata con le differenti procedure di estrazione e le diverse tecniche cromatografiche usate per identificarle (Owen et al., 2000; Baldioli et al., 1996; Tsimidou et al., 1998). Per cui per definire correttamente la concentrazione delle sopra citate sostanze bisogna prima estrarle e purificarle dalla matrice oleosa, i secoiridoidi e i lignani così, purificati possono essere utilizzati per definire il loro fattore di risposta nei confronti del detector che si vuole utilizzare per la loro valutazione (Baldioli et al., 1996). La concentrazione fenolica nel VOO varia notevolmente infatti la concentrazione totale dei polifenoli valutata colorimetricamente oscilla tra 40 e 900 mg /kg (Montedoro et al., 1992; Baldioli et al., 1996)

1.6.1. VALUTAZIONE DEI TOCOFEROLI PRESENTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA.

I metodi di analisi dei tocoferoli presenti nell'olio vergine di oliva sono effettuate essenzialmente attraverso tecniche di cromatografia, generalmente nell'olio vergine di oliva viene valutata la concentrazione dell' α -tocolferolo in quanto le quantità dell' β -tocolferolo, γ -tocolferolo e δ -tocolferolo sono trascurabili, come già detto nella precedente sezione. Un tempo, le tecniche cromatografiche più utilizzate per la determinazione dell' α -tocolferolo erano quelle su strato sottile di gel di silice (TLC) accoppiata alla gas cromatografia (Rovellini et al., 1997) Entrambe i metodi richiedono tuttavia lunghi tempi di analisi con la possibilità che si verificano ossidazioni degradative a carico dell' α -tocolferolo durante la preparazione del campione. Recentemente la cromatografia HPLC è stata utilizzata con successo per la determinazione quantitativa dell' α -tocolferolo negli oli vergini di oliva. Le tecniche HPLC applicate per la determinazione dei tocoferoli differiscono tra loro essenzialmente per i diversi rivelatori utilizzati. Il rivelatore più utilizzato che permette di ottenere buoni risultati e senza dubbio quello UV- VIS a serie di diodi, operante alla lunghezza d'onda di 294 nm; ultimamente si è

diffuso anche l'utilizzo del detector fluorimetrico settato alle seguenti lunghezze d'onda: 294 nm (energia di eccitazione) e 330 nm (energia di emissione) (*Psmiadou et al.*, 1998; *Psmiadou et al.*, 2000; *Psmiadou et al.*, 2002). Le fasi stazionarie che si usano per la separazione dei tocoferoli sono polari come ad esempio ammine, ed il corrispondente uso di fasi mobili tendenzialmente apolari, in questo modo essendo i tocoferoli sostanze apolari verranno eluiti per primi. L'analisi HPLC dei tocoferoli viene compiuta su olio preventivamente sciolto in esano. La separazione dei tocoferoli è molto semplice in quanto non prevede nessuna estrazione dalla matrice oleosa, infatti il campione di olio viene sciolto in un solvente di solito esano o acetone o una miscela composta da esano e alcol isopropilico all'99:1 v/v (*Rovellini et al.*, 1997; *Psmiadou et al.*, 1998) e quindi iniettato in HPLC. Recentemente sono stati proposti dei metodi che si avvalgono dell'utilizzo della spettrofluorimetro per l'analisi dell' α -tocoferolo (*Guimet et al.*, 2004). Le tecniche spettrofluorimetriche sfruttano l'interazione delle radiazioni elettromagnetiche con la materia. I dati così ottenuti possono anche essere mostrati sottoforma di spettro, che viene rappresentato con un grafico che riporta l'energia emessa o assorbita in funzione della lunghezza d'onda. Studi fatti sull'utilizzo della fluorescenza per l'analisi dei tocoferoli e delle clorofille sono stati eseguiti da *Guimet et al.*, 2004 che però hanno usato tali dati solo per discriminare a livello qualitativo mediante l'uso di una elaborazione statistica multivariata (cluster analysis) oli vergini di oliva, oli monovarietali e di sansa. Tale metodo non ha fornito informazione sulle concentrazioni analitiche di tali sostanze.

2. SCOPO DEL LAVORO

Dalla valutazione dei metodi di analisi fino ad ora impiegati per lo studio delle sostanze fenoliche dell'olio vergine di oliva, è emerso sicuramente che una delle tecniche più valide è l'estrazione liquido-liquido accoppiata all'HPLC con rivelatore a serie di diodi. Tale tecnica consente la valutazione quali-quantitativa della composizione fenolica dell'olio vergine di oliva. Tuttavia l'estrazione liquido-liquido è un metodo laborioso che prevede tempi lunghi e consente solo un recupero parziale dei composti fenolici del VOO.

Questo studio triennale è nato con lo scopo di valutare le sostanze antiossidanti presenti nell'olio con metodi veloci che non prevedessero grosse manipolazioni del campione. Da studi bibliografici è emerso che fino ad ora non sono state sviluppate metodiche analitiche di tipo quantitativo che rispettassero questi criteri. Per tale motivo in questo lavoro si è messo a punto un nuovo metodo per la valutazione dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva. Il nuovo metodo prevede l'iniezione diretta (ID) dell'olio in HPLC utilizzando come sistema di rivelazione quello che prevede l'utilizzo di un rivelatore a fluorescenza (FLD). Per testare l'attendibilità del metodo di analisi così sviluppato, questo è stato poi comparato con quello che prevede l'estrazione liquido-liquido dall'olio vergine di oliva. A tale scopo è stato eseguito un confronto tra i due sistemi di rivelazione: da una parte quello a serie di diodi (DAD) e dall'altra quello a fluorescenza; per ottenere questo è stato effettuato un confronto tra i dati ottenuti utilizzando l'estratto metanolico contenente le sostanze fenoliche idrofiliche. Per una ottimale separazione delle sostanze fenoliche sono state testate anche due colonne C18, ODS-1 e ODS-3.

Dopo aver messo a punto il metodo dell'iniezione diretta si è cercato di trovare una tecnica veloce che consentisse la valutazione contemporanea della concentrazione fenolica totale e dei tocoferoli presenti nell'olio di oliva (che sostituisse il laborioso metodo colorimetrico per i primi ed il metodo HPLC per i secondi): per fare questo si è pensato di sfruttare la tecnica della spettrofluorimetria. Anche in questo caso per verificare l'attendibilità del nuovo metodo per la valutazione dei polifenoli contenuti nel VOO è stato effettuato un confronto tra questi dati e quelli raccolti mediante la tecnica colorimetrica ed HPLC. Per quanto riguarda i risultati ottenuti sui tocoferoli, essi sono

stati comparati con quelli ottenuti tramite HPLC con rivelatore a fluorescenza, in modo da avere informazioni rapide ed attendibili sui principali antiossidanti presenti nell'olio vergine di oliva.

3. MATERIALI E METODI.

3.1. Materiali.

Per la valutazione dei composti fenolici e dell' α -tocoferolo sono stati analizzati trenta campioni di olio vergine di oliva appartenenti a diverse cultivars di interesse nazionale ed internazionale quali Coratina, Carolea, Frantoio, Leccino, Ogliarola, Canino, Nocellara, Biancolilla, Cerasuola, Cornicabra, Arbequina, Picual, Picholine, Chetoui e Chemlali, e di diversa provenienza geografica: Italia, Spagna, Egitto, Israele, Tunisia e Cile.

Gli oli italiani sono stati estratti avvalendosi di un impianto pilota della ditta Rapanelli comprendente un frangitore a martelli, una gramola ed un decanter mod. 400 ECO/G a basso consumo d'acqua. Il processo di estrazione è stato condotto a 25 °C con un tempo di gramolatura di 30 minuti. Successivamente gli oli sono stati filtrati e conservati a 13 °C prima di essere sottoposti all'analisi.

Solventi e composti standard.

Per quanto riguarda l'estrazione liquido-liquido (LLE) e la successiva analisi HPLC degli oli vergini di oliva sono stati utilizzati i seguenti solventi: metanolo, *n*-esano, acetonitrile ed acetone tutti di purezza HPLC, alcol isopropilico ed acido acetico glaciale di purezza RPE. Tutti questi reagenti sono stati acquistati presso la ditta Carlo Erba (Milano, Italia). L'acqua deionizzata utilizzata per le analisi HPLC è stata ottenuta con un sistema di purificazione Elga (High Wycombe, UK) composto da due unità: una per l'ottenimento di acqua con grado di purezza laboratorio e l'altra con purezza HPLC.

Composti standard.

I derivati dei secoiridoidi 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA e 3,4 DHPEA-EA), ed i lignani (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo sono stati estratti dall'olio vergine di oliva e separati con l'HPLC semipreparativa secondo la procedura riportata da Montedoro et al., 1993. La struttura dei derivati dei secoiridoidi e dei lignani è stata successivamente confermata tramite Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) in accordo con Montedoro et al., 1993. ed Owen et al., 2000. Il 3,4-DHPEA è stato acquistato presso la ditta Cabru S.p.A. (Milano, Italia), mentre il *p*-HPEA è stato comprato presso

la ditta Fluka (Milano, Italia) L' α -tocoferolo il β -tocoferolo e γ -tocoferolo e δ -tocoferolo sono stati presi presso la ditta Sigma-Aldrich S.r.l. (Milano, Italia).

3.2. METODI.

Preparazione dei campioni di VOO per l'analisi HPLC.

L'estrazione liquido-liquido (LLE) dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva è stata condotta seguendo quanto riportato da *Montedoro et al.*, 1992. Prima di condurre l'analisi HPLC l'estratto fenolico è stato solubilizzato con 1 mL di metanolo e filtrato mediante un filtro da siringa in fluoruro di polivinilidene (PVDF) da 0,2 μ m. Per quanto riguarda la preparazione del campione per iniezione diretta 2 g di olio vergine di oliva sono stati disciolti in 10 mL di acetone e filtrati con filtro da siringa PVDF sempre da 0,2 μ m. Per l'analisi dell' α -tocoferolo 2 g di olio vergine di oliva sono stati solubilizzati in 10 mL di *n*-esano e filtrati con filtri PVDF come già riportato.

Preparazione dei campioni di VOO per il dosaggio dei polifenoli totali. È stata effettuata secondo quanto riportato da *Montedoro et al.*, 1992. E valutati secondo il metodo colorimetrico Folin-Ciocalteu.

Preparazione dei campioni di VOO per analisi spettrofluorimetrica.

In questo caso l'olio è stato solubilizzato in *n*-esano; per trovare le migliori condizioni di intensità di emissione in maniera da evitare fenomeni di autoassorbimento sono state preparate soluzioni a diversa diluizione e precisamente 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60 e 1:80 dopodiché sono state eseguite le letture spettrofluorimetriche.

Analisi HPLC.

L'analisi dei composti fenolici e dell' α -tocoferolo sono state condotte impiegando uno strumento HPLC Agilent Technologies serie 1100 composto da pompa quaternaria completa di degassatore, autocampionatore, comparto della colonna termostato, rivelatore a serie di diodi e rivelatore a fluorescenza.

Analisi HPLC dei composti fenolici.

Tale analisi è stata eseguita utilizzando due colonne operanti in fase inversa C18: una ChromSep Inertsil ODS-3 250 mm x 4,6 mm con diametro delle particelle 5 µm provvista di una precolonna di dimensioni 100 mm x 3,0 mm (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) ed una colonna Spherisorb ODS-1 250 x mm 4,6 mm avente un diametro delle particelle sempre di 5 µm (Phase Separation Ltd., Deeside, UK). Il volume di estratto metanolico iniettato in HPLC era di 20 µL. L'eluizione delle sostanze fenoliche è stata effettuata con gli stessi solventi per entrambe le colonne impiegate. I solventi binari erano costituiti da una miscela composta da acqua ed acido acetico allo 0,2 % (solvente A) e metanolo (solvente B). Il flusso dei solventi in colonna era di 1,5 mL/min per la colonna ODS-3 ed 1,0 mL/min per ODS-1. Per entrambe le colonne il gradiente dei solventi usato per l'eluizione dei composti era il seguente: 95 % A / 5 % B per 2 minuti, 75 % A / 25 % B in 8 minuti, 60 % A / 40 % B in 10 minuti, 50 % A / 50 % B in 16 minuti., 0 % A / 100 % B in 14 minuti, questo ultimo gradiente veniva mantenuto per 10 minuti, per poi tornare nella fase iniziale (95 % A / 5 % B) che durava 13 minuti (equilibratura); quindi la durata totale della corsa era 73 minuti.

La lunghezza d'onda del rivelatore a serie di diodi era stata settata a 278 nm, invece per il rivelatore a fluorescenza la lunghezza d'onda di eccitazione (Ex) era di 278 nm, mentre quelle di emissione (Em) erano di 313 nm, 339 nm, 353nm e 453 nm. Il guadagno del fotomoltiplicatore di quest'ultimo detector è stato settato a otto per l'analisi dell'estratto fenolico, mentre è stato aumentato a tredici per l'iniezione diretta dell'olio per accrescerne la sensibilità.

Analisi HPLC dell' α -tocoferolo.

Questa è stata condotta utilizzando una colonna in fase normale, Waters µPorasil 300 mm x 3,9 mm (Milford, MA, USA) avente un diametro delle particelle di 10 µm. Il volume di campione iniettato in colonna era di 50 µL. I solventi utilizzati erano costituiti da una miscela di *n*-esano con lo 0,5 % di alcol isopropilico (solvente A) e *n*-esano con lo 10 % di alcol isopropilico (solvente B). Il flusso del solvente in colonna era di 2 mL/min. Il gradienti dei solventi durante l'analisi era il seguente: 100 % A / 0 % B per 4 minuti, 60 % A / 40 % B in 14 minuti, 40 % A / 60 % B in 4 minuti., 100 %

A / 0 % B in 3 minuti e quest'ultimo gradiente veniva mantenuto per 5 minuti; per una durata complessiva di analisi di 30 minuti.

La lunghezza d'onda del rivelatore a serie di diodi è stata settata a 294 nm, invece per il rivelatore a fluorescenza la lunghezza d'onda di eccitazione era di 294 nm (Ex), mentre quella di emissione (Em) era di 330 nm. La sensibilità del fotomoltiplicatore è stata settata a otto.

Analisi spettrofluorimetrica. La valutazione dell' α -tocoferolo e dei composti fenolici presenti nell'olio di oliva è stata condotta con uno spettrofluorimetro Varian Cary Eclipse 68 (Walnut Creek, CA, USA). Gli spettri di emissione ed eccitazione per la valutazione dell' α -tocoferolo sono stati ottenuti settando la lunghezza d'onda di eccitazione tra 250-315 nm e quella di emissione tra 315-400 nm. Le condizioni operative per quanto riguarda la valutazione dei polifenoli erano le seguenti: la lunghezza d'onda di eccitazione era stata fissata tra 220-300 mentre quella di emissione tra 300-500 nm.

Analisi spettrofluorimetrica in modalità di Scansione Sincrona.

La valutazione dei composti fenolici e dell' α -tocoferolo in questo caso è stata condotta facendo variare contemporaneamente la lunghezza d'onda di eccitazione e quella di emissione mantenendo costante la differenza tra queste due lunghezze di un certo delta lambda in modo da ottenere uno spettro planare con l'eventuale presenza di diverse bande attribuibili alle varie sostanze che assorbono ed emettono radiazione elettromagnetica nel range investigato, l'area sottesa alle bande è stata utilizzata per le valutazioni quantitative. La scelta del delta lambda è stata operata analizzando il risultato di diverse prove aventi un $\Delta\lambda$ di 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 30 e 40 nm in modo da avere uno spettro in cui le bande fossero le più separate ed intense. Il risultato di tali prove ha permesso il conseguimento delle seguenti condizioni analitiche: range di acquisizione 250-350 nm e $\Delta\lambda$ di 10 nm.

Analisi statistica.

I risultati ottenuti applicando i due metodi di valutazione sia per quanto riguarda i polifenoli (iniezione diretta ed LLE) e l' α -tocoferolo (HPLC e Scansione Sincrona) sono stati confrontati utilizzando l'analisi dei minimi quadrati allo scopo di verificare l'esistenza di una correlazione tra le due coppie di variabili e quantificarne il grado di correlazione. Con gli stessi dati per verificare se le differenze fossero statisticamente significative è stata anche eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il one-way *t-test* impiegando il software SigmaStat v. 2.0 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE.

Comparazione tra la colonna ODS-1 e ODS-3.

Due fasi stazionarie inverse sono state testate, per la separazione dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva. Per verificare l'efficienza di separazione si sono prima iniettati nelle due colonne gli standard dei composti fenolici (Figura 9). Dall'esame del cromatogramma ottenuto si nota che le due colonne mostrano una diversa efficienza di separazione nei confronti delle sostanze fenoliche. In particolare (Figura 9) il cromatogramma HPLC relativo ai composti fenolici standard, e ottenuto utilizzando la colonna ODS-3, mostra una bassa risoluzione dei picchi corrispondenti, al *p*-HPEA-EDA ed al (+)-pinoresinolo, infatti questo ultimo coeluisce insieme al *p*-HPEA-EDA pertanto risulta impossibile sua separazione con questo tipo di colonna, nello stesso tempo si osserva anche un frazionamento a carico dei picchi relativi al 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e *p*-HPEA-EDA. Il frazionamento registrato nel cromatogramma è dovuto probabilmente alla formazione di addotti tra i gruppi aldeidici del 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e *p*-HPEA-EDA con il metanolo, come già evidenziato da Montedoro et al., 1993. I risultati relativi alla bassa efficienza di separazione della colonna ODS-3 nei confronti del *p*-HPEA-EDA e (+)- pinoresinolo sono confermati anche dall'analisi sull'estratto metanolico del VOO ottenuto dalla Cv Ogliarola (Figura 9), in cui si vede benissimo come i due composti siano totalmente sovrapposti. D'altra parte la colonna ODS-3 risulta essere molto selettiva nella regione in cui avviene la separazione 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA in quanto permette un'ottima risoluzione delle differenti forme dell'oleuropeina e del ligustroside aglicone (Rovellini et al., 2002). La colonna ODS-1 al contrario del ODS-3 mostra una migliore separazione dei picchi relativi al *p*-HPEA-EDA, (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo (Figura 9), questo infatti risulta essere quasi completamente separato dagli altri composti. Come mostra Figura. 8 tra le due colonne esiste anche un'inversione dell'ordine di eluizione dei lignani., infatti utilizzando la colonna ODS-1 al contrario del ODS-3 il (+)-1-acetossipinoresinolo viene eluito per primo. Per tentare di ottenere una migliore separazione nella regione in cui cadono il *p*-HPEA-EDA e il (+)-pinoresinolo, si è provato a modificare la composizione della fase mobile ma l'efficienza di separazione rimane invariata (dati non mostrati).

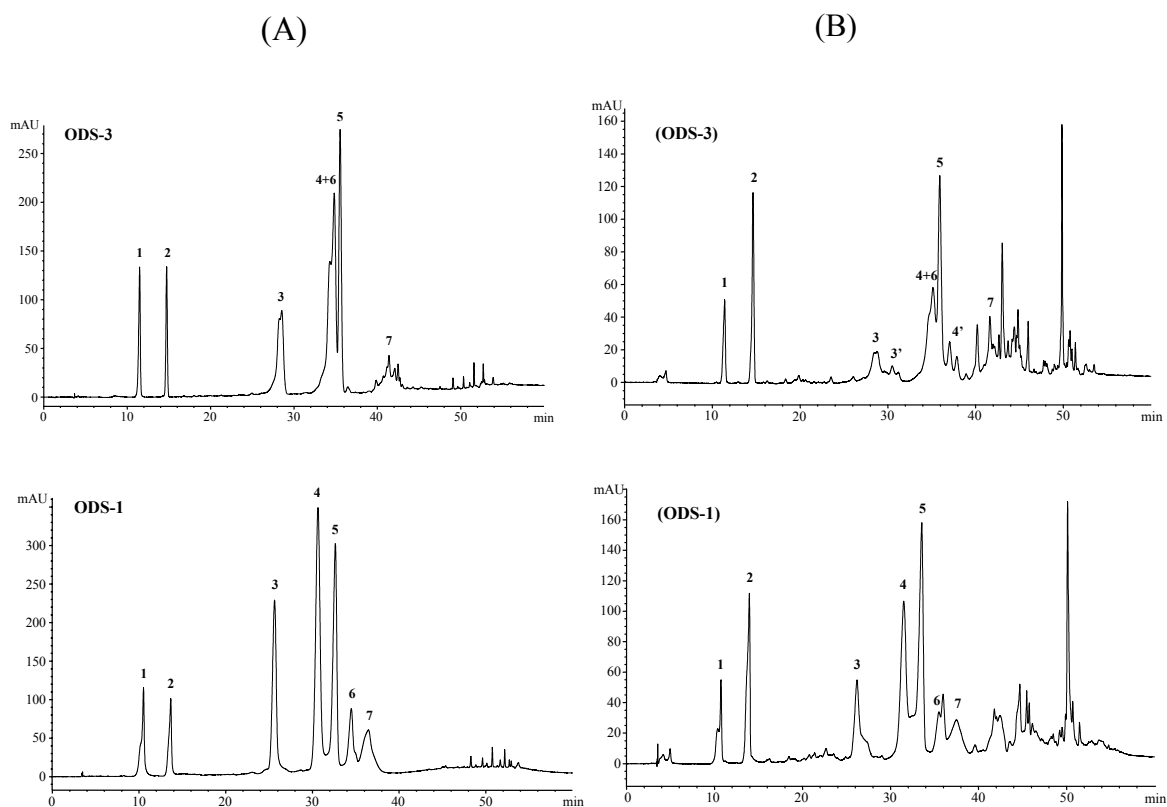


Figura 9. Cromatogrammi HPLC dei composti fenolici standard (A) e dell'estratto metanolico del VOO ottenuto dalla *cv Ogliaiola* (B). Corrispondenza picchi (1) 3,4-DHPEA; (2) p-HPEA; (3) 3,4-DHPEA-EDA (4) p-HPEA-EDA; (5) (+)-1-acetossipinoresinolo, (6) (+)-pinoresinolo; (7) 3,4-DHPEA-EA. (3'e 4') strutture identificate da *Rovellini et. al. 1997*.

Per quanto riguarda l'efficienza di separazione degli alcoli fenolici tra le due colonne non vi è sostanziale differenza (Figura. 9). In questo lavoro si è scelto di utilizzare la colonna ODS-1, visto che questa permette una migliore separazione dei lignani e quindi ci dà la possibilità di quantificarli al fine di ottenere un quadro completo dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.

Confronto tra detector fluorimetrico e a serie di diodi.

L'efficienza del detector fluorimetrico e quello a serie di diodi è mostrata nei cromatogrammi di Figura 10, ottenuti dall'iniezione dei composti standard e dell'estratto metanolico ottenuto dal VOO di cv *Moraiolo*, nella colonna ODS-1. Da questi si evince che la risposta del detector fluorimetrico è particolarmente elevata nei confronti degli alcoli fenolici, lignani e 3,4-DHPEA-EA, mentre la risposta risulta essere più bassa nei confronti 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA. Questa differenza in termini di risposta del detector fluorimetrico è probabilmente da imputare alla diversa struttura chimica del 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA, infatti, queste contengono un anello aromatico aperto (acido elenolico) a cui è legato un gruppo dialdeidico. Questa particolare struttura fa sì che la molecola non sia planare e di conseguenza l'intensità di fluorescenza è minore. Infatti la planarità e la presenza di un anello aromatico sono requisiti fondamentali affinché una molecola possa emettere radiazioni fluorescenti. Per un migliore rivelamento dei picchi corrispondenti alle sostanze fenoliche il detector fluorimetrico è stato settato in modo da registrare a diverse lunghezze d'onda il segnale emesso. Infatti la figura 10 mostra i cromatogrammi HPLC acquisiti iniettando i composti fenolici standard e l'estratto metanolico del VOO ottenuto da cv *Coratina*, con fase stazionaria ODS-1, a diverse lunghezze d'onda di emissione, dal esame di questi si evince che ci sono delle lunghezze d'onda ottimali di rivelabilità, per gli alcoli fenolici, e i derivati dei secoiridoidi e i lignani; permettendoci così, di ottenere un'accurata analisi qualitativa e quantitativa. La lunghezza d'onda di eccitazione è fissata per tutti i composti a 280 nm invece le lunghezze d'onda di emissione sono settate a 353 nm per *p*-HPEA, 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA, mentre per il *p*-HPEA-EDA è di 313 nm e di 339 nm per il (+)-1-acetossipinoresinolo e il (+)-pinoresinolo. Nel presente lavoro non sono stata possibile la valutazione degli acidi fenolici quali acido vanillico e acido *p*-cumarico in quanto non emettono radiazioni fluorescenti alle

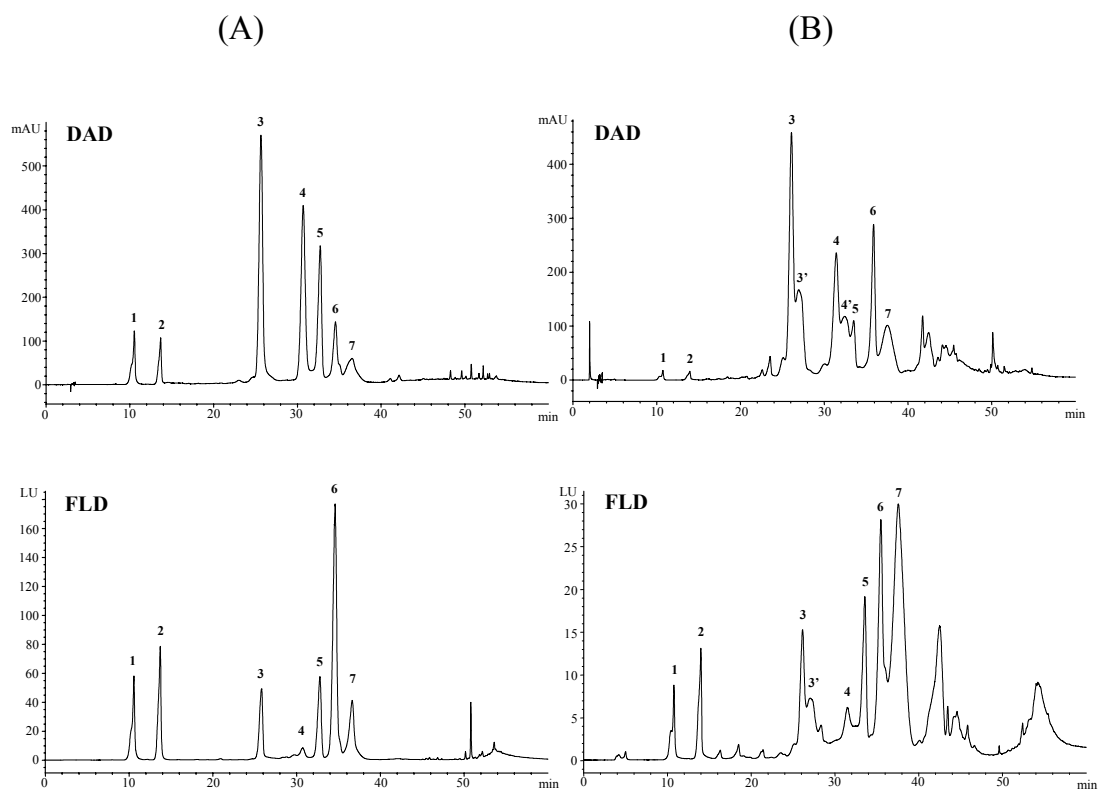


Figura 10. Cromatogrammi HPLC dei composti fenolici standard (A) e dell'estratto metanologico del VOO ottenuto dalla *cv Moraiolo*(B), registrato mediante l'utilizzo del detector a serie di diodi settato a 278 nm e fluorimetro settato $E_c = 278\text{nm}$, $E_m = 339\text{ nm}$. Per la corrispondenza picchi fare riferimento alla Figura 9.

lunghezze d'onda esaminate. Per ottenere una analisi quantitativa corretta delle sostanze fenoliche presenti nell'olio vergine di oliva la risposta strumentale del sistema usato per la rivelazione delle sostanze sopra citate. Uno strumento analitico è un sistema che, reagendo a determinate sollecitazioni in entrata, produce in uscita una reazione o risposta. La sollecitazione in entrata è normalmente applicata sottoforma di variazione della variabile chimica che si deve misurare (ad esempio concentrazione), quantificata mediante una variabile X. Per quanto riguarda la risposta strumentale, essa dipende dal principio chimico fisico su cui si basa lo strumento (fluorimetria). In ogni caso anch'essa è quantificata attraverso una variabile Y che contiene l'informazione richiesta. La relazione $Y = f(X)$ che lega le due variabili in questione sono definite come funzione di risposta strumentale e la sua rappresentazione grafica è comunemente nota come curva di calibrazione. Tornando alla nostra ricerca la valutazione quantitativa della risposta del detector fluorimetrico usando la fase stazionaria ODS-la è stata ottenuta costruendo una curva di calibrazione con i composti fenolici standard come mostra Tabella 15 La curva di calibrazione è stata tracciata seguendo un approccio di tipo statistico nel senso che sono utilizzati più punti per individuare la retta (più soluzioni standard a diverse concentrazioni) in questo modo si tiene conto anche della presenza di una componente aleatoria dovuta alla esistenza di errori casuali della misura. Una volta costruita la curva di calibrazione si è proceduto alla misura del limite di dosabilità sia del detector a serie di diodi che fluorimetrico. Il limite di rivelabilità si definisce come la più piccola quantità(o concentrazione) di analita che può essere dosata con una determinata procedura. Il limite di dosabilità (QLs) è un parametro analitico che deriva direttamente dalla sensibilità, all'occorrenza integrata da informazioni di precisione o, se si preferisce, di rapporto segnale rumore (S/N). Il calcolo del limite di dosabilità nel presente lavoro è stato effettuato in base a quanto stabilito dalla convenzione ACS, in base alla quale il QLs strumentale viene fissato a dieci volte il valore della deviazione standard della misura. Più semplicemente, equivale ad affermare che non sono suscettibili di determinazione quantitativa analiti che abbiano fornito una lettura strumentale inferiore a dieci deviazioni standard, o anche che non è opportuno procedere ad un dosaggio quando $S/N < 10$, se si esprime in termini di rapporto segnale rumore.

I risultati presentati in Tabella 15 mostrano che vi è un'ottima linearità nella risposta del fluorimetro nel range di concentrazione usato per la valutazione dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva, infatti il coefficiente di correlazione è prossimo all'unità dimostra che i punti giacciono esattamente su una retta la cui equazione interpreta il legame (di tipo deterministico) che intercorre tra la risposta fluorimetrica e la quantità delle frazioni fenoliche. Allo stesso tempo la Tabella 15 mostra che il detector fluorimetrico è più sensibile del rivelatore a serie di diodi, infatti presenta un limite di dosabilità molto più basso, rendendolo valido per l'analisi quantitativa dei composti fenolici presenti nel VOO. La risposta del sistema di rivelazione fluorimetrico è stata messa a confronto con quella del detector a serie di diodi per ottenere ciò, si è effettuata l'analisi quantitativa sull'estratto metanolico dell'olio vergine di oliva ottenuto da diverse cultivars con fase stazionaria ODS-1 usando i due sistemi di rivelazione. I dati sono riportati in Tabelle 16 e 17, dall'esame dei risultati, si evince che, le concentrazioni misurate con il detector a fluorescenza non sono molto differenti da quelle ottenute con il sistema di rivelazione a serie di diodi, soprattutto per quanto riguarda gli alcoli fenolici, e i derivati dell'oleuropeina e del ligustroside, quali il 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e *p*-HPEA-EDA. L'analisi statistica dei risultati ottenuti, fatta con il *t-test*, mostra che questi risultano essere statisticamente differenti, ma questo è da imputare al fatto che, presentano bassi valori di deviazione standard, pertanto la loro sovrapposizione è impossibile.

L'analisi quantitativa dei lignani, e soprattutto del (+)-pinoresinolo, mostra un comportamento diverso rispetto ai derivati dell'oleuropeina e del ligustroside, infatti, la concentrazione del (+)-pinoresinolo misurata con il detector fluorimetrico è di gran lunga superiore a quella rivelata dal sistema a serie di diodi. L'utilizzo della fase stazionaria ODS-3 a dato risultati simili (dati non riportati) a quelli ottenuti con la colonna ODS-1 eccetto per il *p*-HPEA-EDA e (+)-pinoresinolo, in quanto questi ultimi, coeluiscono insieme quando si utilizza la fase stazionaria ODS-3. Le differenti concentrazioni rilevate dai due detector, a carico (+)-pinoresinolo non sono (Tabelle 16 e 17-17A) costanti, ma variano secondo la cultivar a cui appartiene l'olio vergine di oliva esaminato, infatti risultano essere più basse nella di cv *Chemlali*, *Moraiolo* e *Ogliarola Frantoio* e nettamente più alte nelle cv di *Coratina*, *Canino* e *Carolea Chetoui Picholine*. In un primo momento si è ipotizzato che la disparità di risposta fra i

due detector a carico dei lignani, fosse dovuta a interferenze provocate dalla matrice grassa presente nell'olio di oliva. A tal fine per eludere l'interferenza potenziale della parte trigliceridica del VOO, si è effettuata un'analisi HPLC di un olio rettificato (olio in cui sono presenti solo i trigliceridi), (Figura 11) dall'esame del cromatogramma si può escludere oltre ragionevole dubbio, che la matrice grassa contenuta nell'olio vergine di oliva non interferisce in alcun modo nella regione cromatografica dove vengono eluite le sostanze fenoliche di nostro interesse. Anche l'interferenza potenziale dell' α -tocoferolo è stata presa in considerazione nella valutazione della risposta fluorimetrica, ed è stato visto che questo composto, con le condizioni cromatografiche scelte per la valutazione dei composti fenolici non può avere nessun effetto di sovrapposizione in quanto viene eluito intorno ai 55 minuti, conseguentemente non può avere nessun conseguenza sulla rivelazione dei lignani che al contrario fluiscono intorno ai 32 minuti. L'effetto potenziale della matrice grassa e dell' α -tocoferolo, contenuti nell'olio vergine di oliva non è stato studiato con l'utilizzo della colonna ODS-3 in quanto questa non permette la separazione del (+)-pinoresinolo e quindi non potrebbe darci nessuna spiegazione del fatto che esso presenti una alta intensità di fluorescenza e una bassa assorbenza nel UV.

Tabella 15. Linearità e limite di dosabilità determinato sui composti di riferimento mediante DAD e FLD^a.

Composti	Range di concentrazione (mg/L)	R² (FLD)	QL (DAD) (µg/kg)	QL (FLD) (µg/kg)
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	0,3 – 30	0,997	350	85
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	0,6 – 53	0,997	315	100
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	20 – 1100	0,998	1000	3500
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	5 – 600	0,998	1100	850
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	5 – 700	0,997	200	40
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	5 – 700	0,998	250	150
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	20 – 800	0,998	1800	600

^a I composti fenolici sono stati determinati mediante DAD e FLD a diverse lunghezze d'onda: (1) Ee 280 nm - Em 353, (2) Ee 280 nm - Em 313, (3) Ee 280 nm - Em 339.



Figura 11. Cromatogramma HPLC ottenuto mediante iniezione diretta dell'olio rettificato, determinato mediante FLD impostato alle lunghezze d'onda Ec 280 nm - Em 339.

Tabella 16. Concentrazione fenolica dei composti fenolici presenti nel VOO: comparazione tra DAD e FLD valutati sull'estratto metanolico (mg/kg) usando la colonna ODS-1*.

Composti	Cultivar					
	Carolea		Ogliarola		Frantoio	
	DAD	FLD	DAD	FLD	DAD	FLD
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	2,1 (0,02) ^a	2,2 (0,04) ^b	2,4 (0,05) ^a	2,7 (0,06) ^b	1,0 (0,02) ^a	1,2 (0,05) ^b
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	1,6 (00,1) ^a	1,8 (0,02) ^b	5,0 (0,11) ^a	5,3 (0,09) ^b	11,2 (0,7) ^a	12,3 (0,7) ^b
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	152,7 (1,2) ^a	132,4 (1,1) ^b	230,6 (1,2) ^a	221,7 (1,2) ^b	71,8 (1,9) ^a	69,4 (1,3) ^b
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	129,0 (0,1) ^a	138,1 (0,3) ^b	105,8 (0,42) ^a	111,0 (0,2) ^b	54,2 (0,5) ^a	59,0 (0,8) ^b
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	10,0 (0,01) ^a	17,0 (0,5) ^b	36,2 (0,9) ^a	49,6 (0,08) ^b	31,0 (0,01) ^a	46,4 (0,1) ^b
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	18,4 (0,02) ^a	36,1 (0,8) ^b	14,1 (0,1) ^a	23,6 (0,01) ^b	9,7 (0,07) ^a	32,3 (0,3) ^b
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	117,1 (0,9) ^a	122,2 (1,8) ^b	89,4 (1,7) ^a	93,4 (0,2) ^b	76,0 (0,4) ^a	78,7 (0,6) ^b

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$).
Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Tabella 17. Concentrazione fenolica dei composti fenolici presenti nel VOO: comparazione tra DAD e FLD valutati sull'estratto metanolico (mg/kg) usando la colonna ODS-1^a.

Composti	Cultivar					
	Picholine		Chetoui		Chemlali	
	DAD	FLD	DAD	FLD	DAD	FLD
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	8,5 (0,2) ^a	8,8 (0,1) ^b	4,6 (0,01) ^a	4,7 (0,02) ^b	0,9 (0,007) ^a	0,9 (0,003) ^b
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	21,5 (0,2) ^a	23,1 (0) ^b	6,9 (0,1) ^a	7,4 (0,04) ^b	3,4 (0,1) ^a	3,6 (0,6) ^b
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	200,3 (1,8) ^a	193,8 (1,5) ^b	193,7 (5,2) ^a	186,6 (1,3) ^b	80,0 (1,6) ^a	76,4 (1,5) ^b
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	85,6 (1,5) ^a	91,0 (1,1) ^b	75,3 (0,3) ^a	80,6 (0,1) ^b	53,1 (0,3) ^a	55,6 (1,2) ^b
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	6,3 (1,2) ^a	9,3 (0,2) ^b	17,5 (0,1) ^a	23,4 (0,4) ^b	12,0 (0,97) ^a	18,6 (0,3) ^b
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	43,8 (0,1) ^a	61,4 (0,7) ^b	64,5 (0,1) ^a	123,2 (0,7) ^b	11,2 (0,6) ^a	17,6 (0,6) ^b
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	151,6 (0,2) ^a	155,7 (1,8) ^b	133,5 (0,3) ^a	137,5 (1,1) ^b	84,5 (0,8) ^a	87,7 (1,1) ^b

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$). Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Tabella 17 A. Concentrazione fenolica dei composti fenolici presenti nel VOO: comparazione tra DAD e FLD valutati sull'estratto metanolico (mg/kg) usando la colonna ODS-1^a.

Composti	Cultivar					
	Coratina		Canino		Moraiolo	
	DAD	FLD	DAD	FLD	DAD	FLD
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	4,0 (0.1) ^a	4,3 (0.1) ^a	1,1 (0.05) ^a	1,3 (0.03) ^b	1,5 (0.02) ^a	1,5 (0.004) ^a
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	5,8 (0.1) ^a	6,3 (0.04) ^b	2,6 (0.01) ^a	2,7 (0.02) ^b	2,2 (0.004) ^a	2,5 (0.1) ^b
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	230,2 (1.5) ^a	216,4 (2.8) ^b	111,2 (0.4) ^a	105,0 (1.4) ^b	285,1 (0.7) ^a	273,0 (4.4) ^b
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	72,1 (0.2) ^a	80,0 (2.9) ^b	36,2 (0.04) ^a	39,1 (0.1) ^b	93,2 (0.2) ^a	109,7 (0.4) ^b
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	13,7 (0.03) ^a	22,6 (0.2) ^b	2,0 (0.1) ^a	2,9 (0.02) ^b	8,3 (0.01) ^a	11,5 (0.2) ^b
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	7,0 (0.01) ^a	34,1 (0.3) ^b	5,2 (0.1) ^a	27,4 (0.1) ^b	27,4 (0.03) ^a	23,9 (0.2) ^b
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	221,7 (0.5) ^a	223,8 (3.6) ^a	81,2 (0.1) ^a	86,2 (0.3) ^b	139,4 (0.7) ^a	141,1 (0.1) ^a

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$).

Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Confronto tra estrazione liquido-liquido e iniezione diretta.

La figura 12 mostra il confronto tra il cromatogramma HPLC dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva proveniente dalla cv. *Frantoio* ottenuto utilizzando la colonna ODS-1, e il detector a fluorescenza, relativi al metodo dell'iniezione diretta e dell'estrazione liquido-liquido. Dall'esame dei due cromatogrammi risulta evidente che l'efficienza di separazione e la distribuzione dei picchi è molto simile tra il metodo dell'iniezione diretta e dell'estrazione liquido-liquido, inoltre questo ci dimostra che l'introduzione diretta in colonna dell'olio vergine di oliva, non ne modifica, nel tempo l'efficienza di separazione. Tuttavia si è notato, dopo aver effettuato diverse prove, che quando l'olio viene introdotto direttamente in colonna è necessario effettuare un corsa in bianco con metanolo ogni sei analisi, per pulire la colonna al fine di mantenere invariate le sue prestazioni e avere picchi ben definiti. Al fine di stimare con precisione la ripetibilità del nuovo metodo è stata determinata la variabilità intra-giorno e inter-giorno riguardanti l'iniezione diretta e all'estrazione liquido-liquido. La variabilità è stata espressa come coefficiente di variazione (CV) per tutti i composti fenolici valutati con detector fluorimetrico. Il coefficiente di variazione è stato determinato su sei analisi (utilizzando ambedue i metodi) dello stesso olio durante il medesimo giorno, e la stessa operazione è stata eseguita due giorni dopo. I risultati del coefficiente di variazione ottenuti sono mostrati in Tabella 18 da questi si deduce che vi è una buona variabilità intra-giorno che è più bassa o uguale 1% per gli alcoli fenolici, lignani e per il 3,4-DHPEA-EA, mentre per il 3,4-DHPEA-EDA e il *p*-HPEA-EDA rimane al disotto del 3%. La ripetibilità inter-giorno è altrettanto favorevole rimanendo al disotto del 2,9% per tutti i composti esaminati eccetto il *p*-HPEA-EDA. Dalla Tabella 18 si può vedere che la variabilità intra-giorno e inter-giorno rimane simile sia per l'estrazione liquido-liquido che per l'iniezione diretta, dimostrando che in questa ultima la matrice oleosa non interferisce in alcun modo sui risultati delle analisi. Le analisi dell'olio vergine di oliva per iniezione diretta fatte con la colonna ODS-3 non hanno messo in evidenza differenze qualitative con l'estrazione liquido-liquido.

Confronto tra estrazione liquido-liquido e iniezione diretta.

La figura 12 mostra il confronto tra il cromatogramma HPLC dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva proveniente dalla cv. *Frantoio* ottenuto utilizzando la colonna ODS-1, e il detector a fluorescenza, relativi al metodo dell'iniezione diretta e dell'estrazione liquido-liquido. Dall'esame dei due cromatogrammi risulta evidente che l'efficienza di separazione e la distribuzione dei picchi è molto simile tra il metodo dell'iniezione diretta e dell'estrazione liquido-liquido, inoltre questo ci dimostra che l'introduzione diretta in colonna dell'olio vergine di oliva, non ne modifica, nel tempo l'efficienza di separazione. Tuttavia si è notato, dopo aver effettuato diverse prove, che quando l'olio viene introdotto direttamente in colonna è necessario effettuare un corsa in bianco con metanolo ogni sei analisi, per pulire la colonna al fine di mantenere invariate le sue prestazioni e avere picchi ben definiti. Al fine di stimare con precisione la ripetibilità del nuovo metodo è stata determinata la variabilità intra-giorno e inter-giorno riguardanti l'iniezione diretta e all'estrazione liquido-liquido. La variabilità è stata espressa come coefficiente di variazione (CV) per tutti i composti fenolici valutati con detector fluorimetrico. Il coefficiente di variazione è stato determinato su sei analisi (utilizzando ambedue i metodi) dello stesso olio durante il medesimo giorno, e la stessa operazione è stata eseguita due giorni dopo. I risultati del coefficiente di variazione ottenuti sono mostrati in Tabella 18 da questi si deduce che vi è una buona variabilità intra-giorno che è più bassa o uguale 1% per gli alcoli fenolici, lignani e per il 3,4-DHPEA-EA, mentre per il 3,4-DHPEA-EDA e il *p*-HPEA-EDA rimane al disotto del 3%. La ripetibilità inter-giorno è altrettanto favorevole rimanendo al disotto del 2,9% per tutti i composti esaminati eccetto il *p*-HPEA-EDA. Dalla Tabella 18 si può vedere che la variabilità intra-giorno e inter-giorno rimane simile sia per l'estrazione liquido-liquido che per l'iniezione diretta, dimostrando che in questa ultima la matrice oleosa non interferisce in alcun modo sui risultati delle analisi. Le analisi dell'olio vergine di oliva per iniezione diretta fatte con la colonna ODS-3 non hanno messo in evidenza differenze qualitative con l'estrazione liquido-liquido.

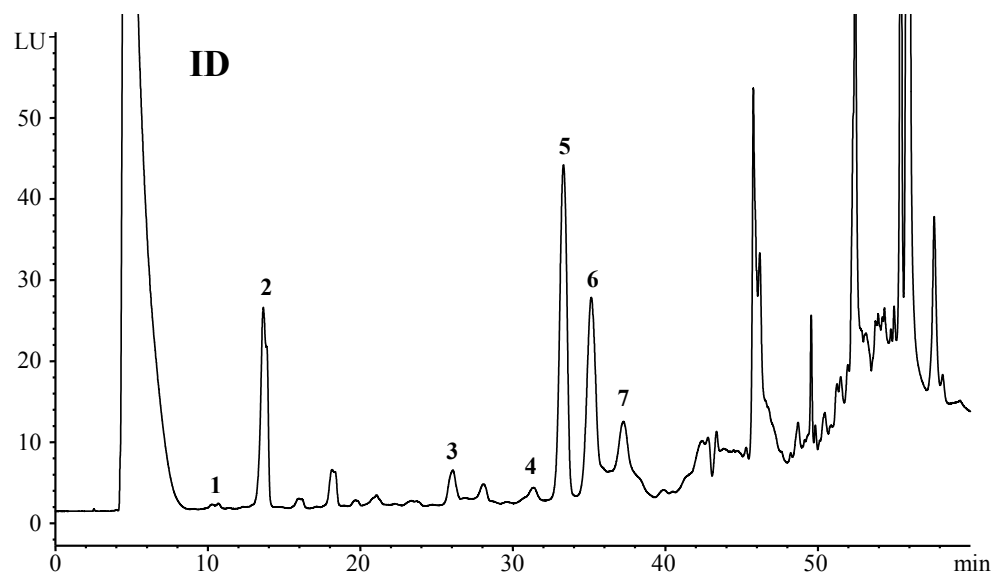
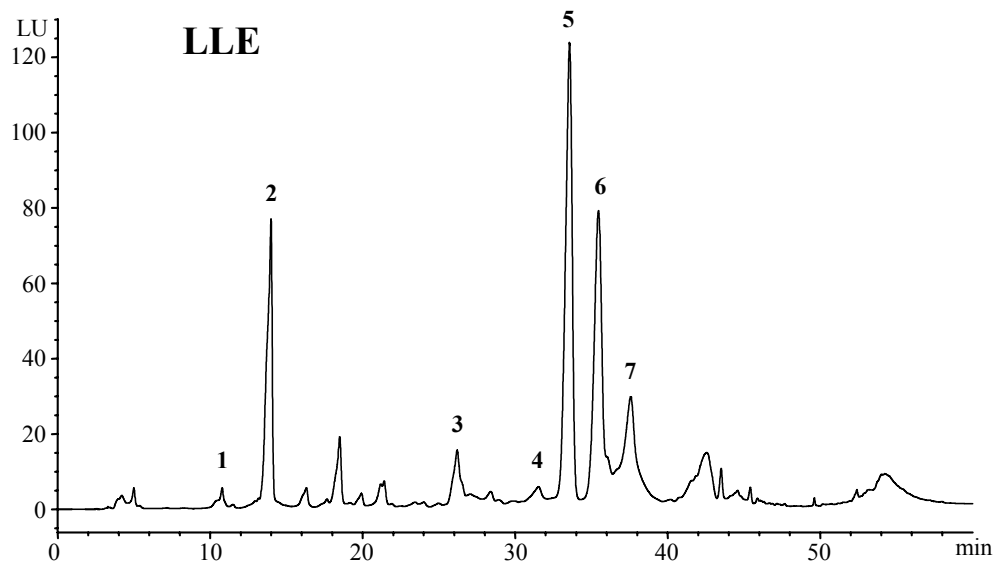


Figura 12. Cromatogrammi HPLC del VOO ottenuto dalla *cv Frantoio(B)*, ottenuto mediante estrazione liquido-liquido(LLE) e iniezione diretta (DI), utilizzando il detector fluorimetrico settato a 278 nm E_c = e E_m = 339 nm. Per la corrispondenza picchi fare riferimento alla Figura 9.

Tabella 18. Variabilità intra-giorno e inter-giorno espressa come coefficiente di variazione ottenuta analizzando i composti fenolici presenti nel VOO determinati mediante ID e LLE con detector a fluorescenza^a.

Compound	LLE		ID	
	Intra-giorno CV	Inter-giorno CV	Intra-giorno CV	Inter-giorno CV
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	0,7	0,9	0,7	1,0
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	0,8	2,9	0,8	2,8
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	1,4	1,6	1,4	1,8
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	2,7	3,3	2,3	5,0
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	0,8	1,7	0,6	1,9
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	0,6	0,5	0,5	0,5
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	1,0	2,4	0,9	2,3

^a Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

I risultati delle analisi quantitative ottenute comparando il metodo dell'iniezione diretta con quello dell'estrazione liquido-liquido usando il detector a fluorescenza e la fase stazionaria ODS-1 (Tabella 19 e 20) mostra che la concentrazione dei composti fenolici utilizzando l'iniezione diretta sono più alte rispetto alle quantità ottenute utilizzando l'estrazione liquido-liquido. Le maggiori differenze in termini di concentrazione si sono osservate a carico dei derivati dei secoiridoidi e dei lignani, in particolare a carico degli oli ottenuti dalle cv Cornicabra e Leccino. L'analisi di correlazione (Figura 13 e Tabella 21) condotta valutando la composizione fenolica di trenta campioni di olio vergine di oliva, determinati per HLC con detector a fluorescenza usando il metodo dell'iniezione diretta e dell'estrazione liquido-liquido, ha mostrato una buona linearità che oscilla tra 1,19 e 1,33 ad eccezione dei lignani, dimostrando pertanto che l'estrazione liquido-liquido non riesce a recuperare completamente le sostanze fenoliche presenti nel VOO.

Tabella 19. Valutazione dei composti fenolici presenti nel VOO mediante FLD: confronto tra ID e LLE*.

Composti	Cultivar											
	Moraiolo				Nocellara				Canino			
	LLE		ID		LLE		ID		LLE		ID	
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	8,2	(0,02) ^a	8,9	(0,07) ^b	3,7	(0,01) ^a	4,8	(0,02) ^b	2,5	(0,02) ^a	3,1	(0,07) ^b
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	4,4	(0,2) ^a	5,1	(0,4) ^b	3,6	(0,02) ^a	4,2	(0,03) ^b	6,7	(0,03) ^a	7,0	(0,05) ^b
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	229,7	(2,4) ^a	265,0	(2,2) ^b	192,5	(1,8) ^a	257,6	(3,1) ^b	280,5	(1,1) ^a	338,7	(3,6) ^b
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	134,1	(1,2) ^a	169,5	(1,3) ^b	37,2	(1,5) ^a	62,2	(1,1) ^b	145,9	(0,6) ^a	171,1	(0,9) ^b
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	8,8	(0,7) ^a	20,5	(0,5) ^b	11,8	(0,2) ^a	19,0	(0,6) ^b	12,8	(0,5) ^a	22,7	(0,3) ^b
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	23,9	(0,8) ^a	44,3	(1,8) ^b	31,9	(0,9) ^a	68,5	(1,0) ^b	49,6	(0,7) ^a	102,4	(0,65) ^b
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	75,9	(1,4) ^a	138,3	(1,5) ^b	58,2	(0,5) ^a	80,2	(0,7) ^b	158,9	(0,9) ^a	189,5	(1,1) ^b

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$).

Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Tabella 20. Valutazione dei composti fenolici presenti nel VOO mediante FLD: confronto tra ID e LLE*.

Composti	Cultivar					
	Cornicabra		Leccino		Frantoio	
	LLE	ID	LLE	ID	LLE	ID
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	11,9 (0.01) ^a	19,0 (0.3) ^b	1,9 (0.9) ^a	2,8 (0.1) ^a	0,3 (0.02) ^a	0,4 (0.05) ^a
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	8,8 (0.02) ^a	18,1 (0.1) ^b	6,9 (0.02) ^a	7,2 (0.02) ^b	10,1 (0.2) ^a	11,7 (0.03) ^b
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	86,2 (0.3) ^a	114,2 (2.1) ^b	184,3 (4.8) ^a	196,1 (0.03) ^b	136,5 (2.1) ^a	158,1 (3.7) ^b
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	50,8 (0.2) ^a	79,6 (1.2) ^b	58,2 (1.5) ^a	94,0 (0.2) ^b	78,2 (0.6) ^a	82,8 (0.3) ^b
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	2,6 (0.3) ^a	4,9 (0.2) ^b	34,2 (0.2) ^a	72,8 (1.7) ^b	56,3 (0.4) ^a	58,1 (0.1) ^b
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	33,9 (0.5) ^a	74,5 (0.4) ^b	36,1 (0.3) ^a	53,2 (0.4) ^b	54,4 (0.4) ^a	55,1 (0.1) ^b
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	117,7 (0.4) ^a	215,8 (0.8) ^b	185,8 (0.8) ^a	204,2 (0.9) ^b	98,3 (0.3) ^a	121,3 (1.6) ^b

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$).

Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Tabella 21. Analisi di correlazione dei composti fenolici presenti nel VOO determinata per HPLC-FLD ottenuta mediante l'utilizzo dei metodi ID e LLE*.

Composti	Range di concentrazine (mg/Kg)	R² (FLD)	y = ax
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	0,3-13,4	0,990	y = 1,191 x
<i>p</i> -HPEA ⁽¹⁾	0,4-17,7	0,992	y = 1,3293 x
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	41,8-429,2	0,990	y = 1,3303 x
<i>p</i> -HPEA-EDA ⁽²⁾	15,81-156,8	0,983	y = 1,3045 x
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	3,3-23,4	0,946	y = 1,9863 x
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	23,3-123,2	0,958	y = 2,0859 x
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	5,4-179,5	0,987	y = 1,2784 x

*Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

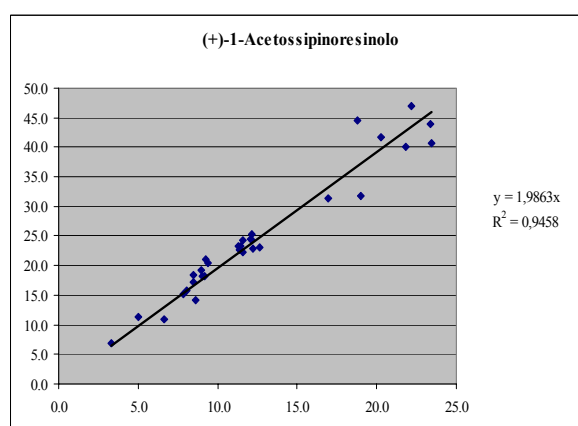
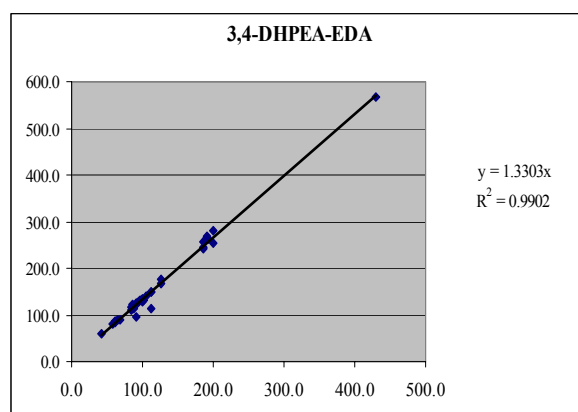
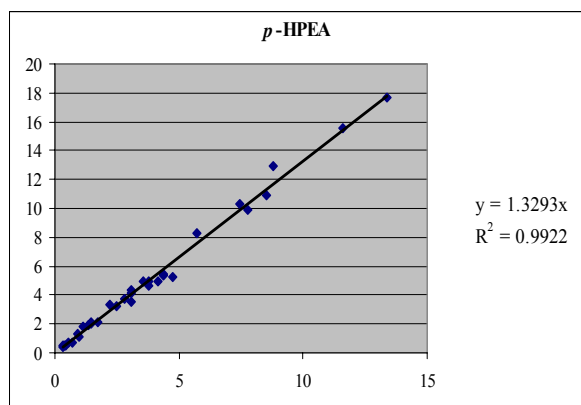


Figura 13. Analisi di correlazione del p-HPEA, 3,4-DHPEA-EDA e dell' (+)-1-Acetossipinoresinolo presenti nel VOO determinata per HPLC- FLD ottenuti mediante l'utilizzo dei metodi ID e LLE*.

Risulta evidente che l'estrazione liquido-liquido (*Montedoro et al., 1992*), fatta con metanolo ed acqua (80/20% v/v), produce solo un parziale recupero delle sostanze fenoliche presenti nell'olio vergine di oliva. Il parziale recupero delle sostanze fenoliche presenti nel VOO; che si verifica con l'estrazione liquido-liquido probabilmente è da imputare alla differente polarità e al diverso peso molecolare delle frazioni fenoliche contenute nell'olio vergine di oliva. Il limite di rivelabilità calcolato secondo quanto stabilito dalla convezione ACS, per i composti fenolici ottenuti tramite iniezione diretta e estrazione liquido-liquido mostra che tutti e due i metodi posseggono (Tabella 22) un basso limite di rivelabilità per i composti quali 3,4-DHPEA e p-HPEA., al contrario si verifica un aumento del limite di rivelabilità nei confronti dei derivatiti dei secoiridoidi, in ogni caso questo rimane ben al disotto delle concentrazioni che si ritrovano nell'olio vergine di oliva. sia che siano stati separati con il metodo dell'iniezione diretta che per l'estrazione liquido-liquido. Questo non fa altro che confermare il dell'iniezione diretta è un valido metodo per la determinazione dei composti fenolici presenti nell'olio vergine di oliva.

Tabella 22. Limite di dosabilità dei composti fenolici presenti nel VOO valutati tramite DI e LLE con detector a fluorescenza*.

Composti	LLE QL	ID QL
3,4-DHPEA ⁽¹⁾	9	100
p-HPEA ⁽¹⁾	12	150
3,4-DHPEA-EDA ⁽¹⁾	550	4000
p-HPEA-EDA ⁽²⁾	300	2500
(+)-1-Acetossipinoresinolo ⁽³⁾	5	50
(+)-Pinoresinolo ⁽³⁾	16	200
3,4-DHPEA-EA ⁽¹⁾	300	2900

* Per i riferimenti delle lunghezze d'onda utilizzate per la valutazione dei singoli composti fenolici fare riferimento alla Tabella 15.

Analisi Spettrofluorimetrica.

Dall'esame degli spettri ottenuti lavorando nelle condizioni riportate nella sezione "Materiali e Metodi" (Figura 14) si osservano bande di emissioni tridimensionali che per essere studiati al fine di ottenere informazioni sulla differenziazione degli oli vergini di oliva è necessario l'utilizzo di elaborazioni di tipo matematico statistico organizzati in matrici in cui i dati vengono organizzati secondo energia di emissione e eccitazione (Guimet et al., 2004).

La spettroscopia di luminescenza sincrona semplifica di molto lo spettro, in quanto il dato che si ottiene viene rappresentato su di un piano e non su uno spazio, in cui all'asse delle ascisse corrisponde la lunghezza d'onda e all'asse delle ordinate l'intensità di fluorescenza. Inoltre la forma dello spettro risulta essere molto più semplificata in quanto ha un andamento gaussiano (simile ad un picco cromatografico).

Le condizioni strumentali ottimali per le analisi dei composti fenolici e dell' α -tocoferolo erano le seguenti: la diluizione adatta del campione era di 1:20, infatti una diluizione al di sotto di questa non conservava un incremento dell'intensità di fluorescenza, indicando che in queste condizioni non c'è più l'effetto di filtro interno (autoassorbimento); il $\Delta\lambda$ migliore è quello con passo di 10 nm in questo modo si ottiene una buona separazione degli spettri.

In questa condizione analizzando l'olio vergine di oliva abbiamo ottenuto un spettro dove erano visibili due bande (Figura 15), dove la prima banda era da attribuire alle sostanze fenoliche mentre la seconda all' α -tocoferolo. Per confermare l'identità delle sostanze rappresentate dalle bande sono stati analizzati i composti standard quali idrossitirosole, tirosole, 3,4-DHPEA-EDA, oleuropeina e α -tocoferolo, in modo da verificare che le bande dei composti incogniti avessero le stesse lunghezze d'onda degli standard (Figura 15). Queste analisi hanno evidenziato che la lunghezza d'onda è per tutti quasi identica, e la zona in cui questi picchi presentano il massimo di emissione, è pressoché uguale, impedendo così la valutazione delle varie frazioni fenoliche ma rendendo plausibile la loro stima totale.

A questo punto abbiamo proceduto alla costruzione di una curva di calibrazione con l' α -tocoferolo e con l'idrossitirosole, (Figura 16), al fine di poter calcolare le

concentrazione dell' α -tocoferolo e dei polifenoli totali (espressi in funzione dell'idrossitirosole) contenuti nell'olio vergine di oliva.

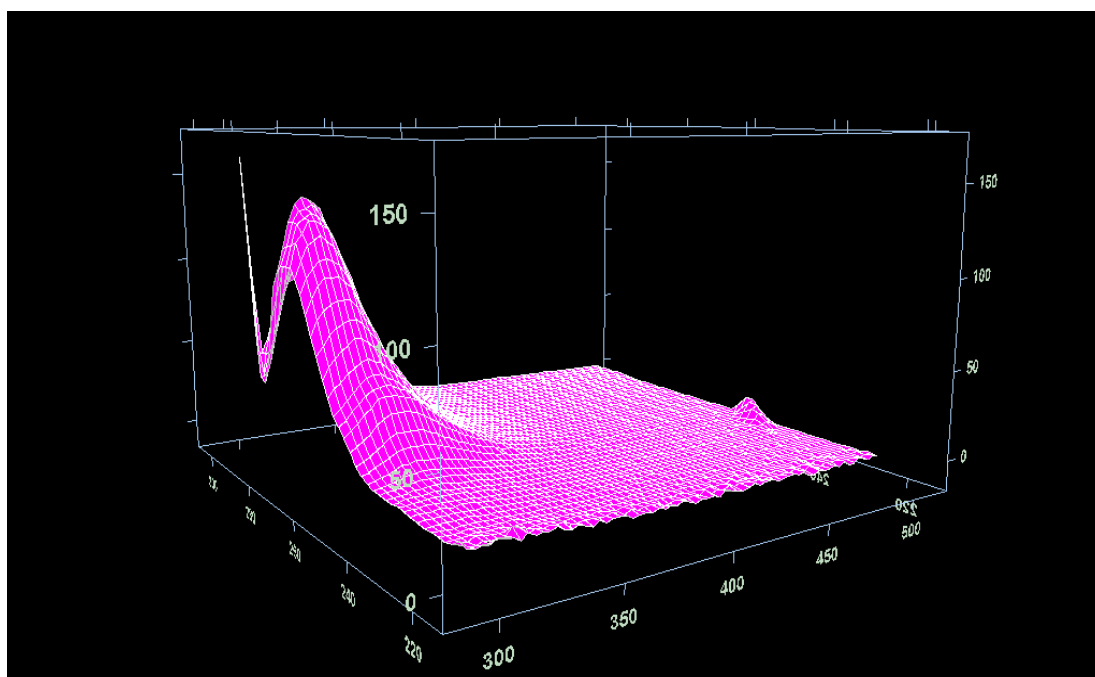


Figura 14. Spettro di Emissione ed eccitazione dei composti fenolici presenti nel VOO, ottenuto mediante spettrofluorimetro settato alle lunghezze d'onda di Em 220-300 nm Em 300-500 nm.

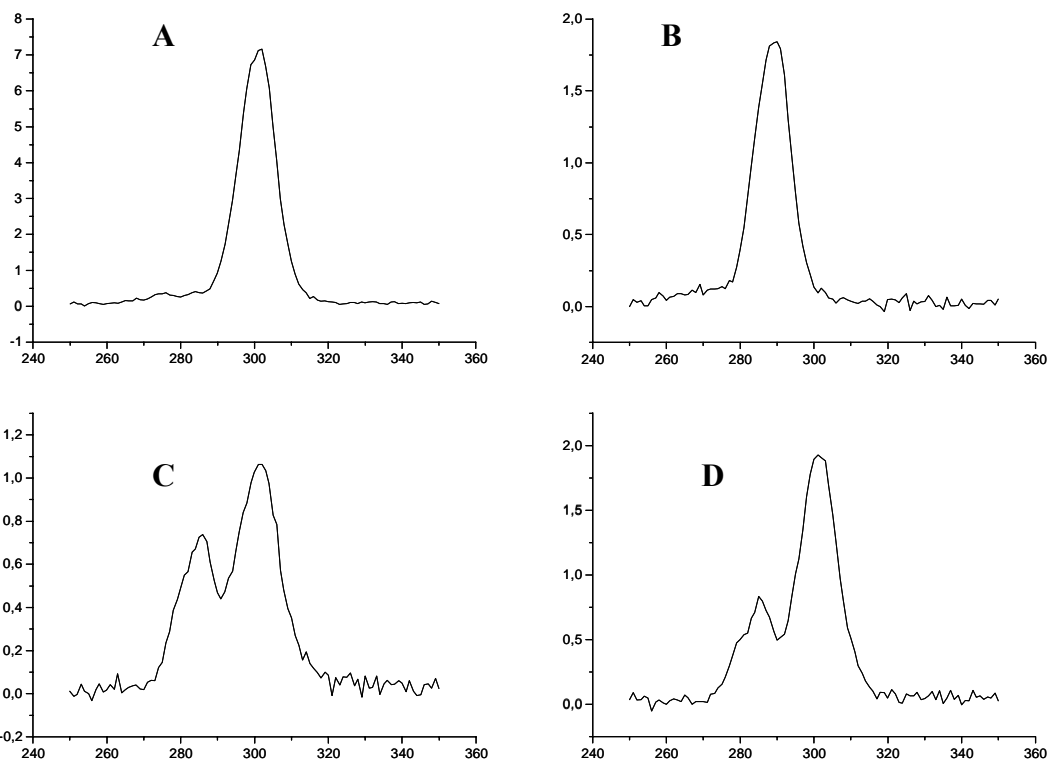


Figura 15. Plots ottenuti mediante spettroscopia di luminescenza sincrona analizzando i composti standards: (A) α -tocoferolo, (B) Idrossitirosole e l'olio vergine di oliva: cv. (C) Nocellara, (D).Coratina con il seguente range d'acquisizione 250-350 nm con ($\Delta\lambda$) di 10 nm.

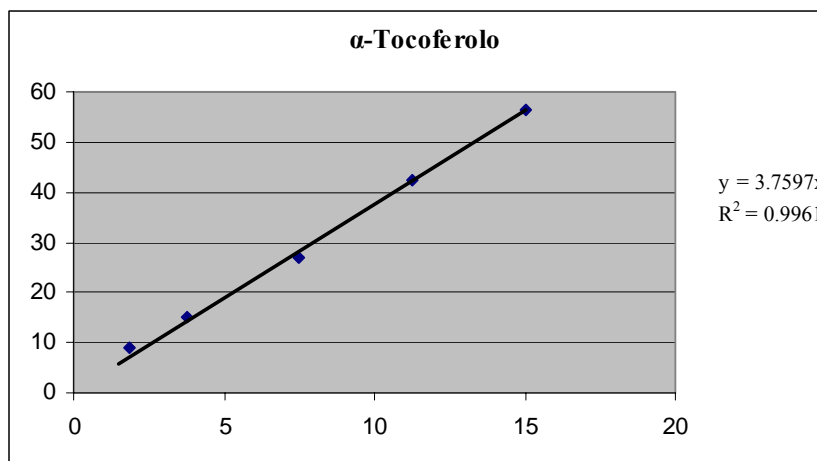
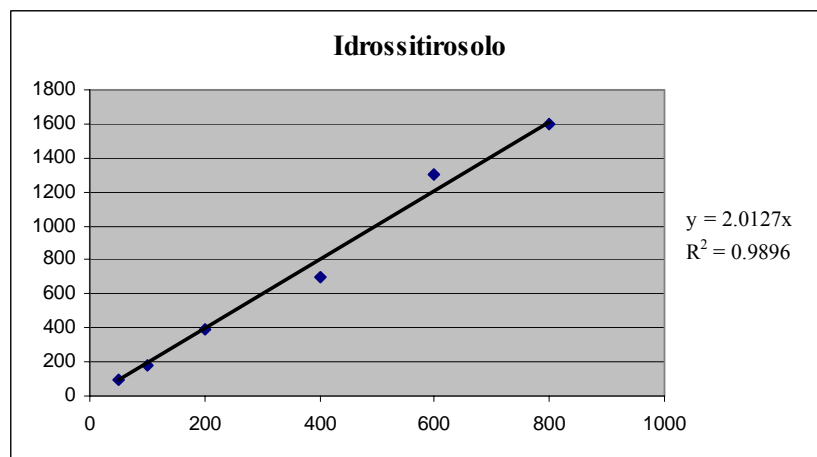


Figura 16. Retta di calibrazione del Idrossitiroso e dell' α -tocoferolo ottenute mediante scansione.

Valutazione dell' α -tocoferolo mediante HPLC con detector Fluorimetrico.

Dall'analisi qualitativa del cromatogramma ottenuto analizzando gli standards dei quattro si può notare come essi sono perfettamente separati (Figura 17) e quindi dosabili singolarmente. Siccome però la forma altamente predominante è quella 98% si è dosata solo questa.

Per valutare l' α -tocoferolo contenuto nell'olio vergine di oliva è stata costruita una retta di calibrazione con il detector a fluorescenza nel range di concentrazione che andava da 18,8 mg/kg a 302,0 mg/kg, ottenendo degli ottimi risultati, infatti il fattore di correlazione al quadrato è risultato essere uguale a 0,999 (come mostrato da Figura 18). Sono stati analizzati diversi oli (Tabella 23) e come si può vedere le concentrazioni ottenute oscillano tra 300,1 e 78.2 mg/kg compresi nel range usato per la costruzione della retta di calibrazione. Questa variabilità osservata insieme alla composizione fenolica ed a quella volatile aromatica potrebbe essere utilizzato per discriminare gli oli appartenenti a diverse cultivars e provenienza geografica.

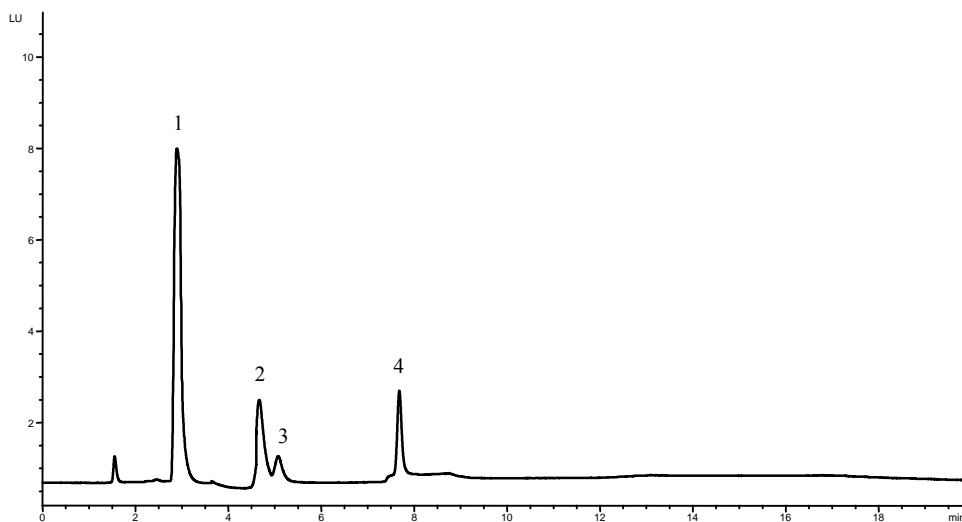


Figura 17. Cromatogramma HPLC dei composti standard ottenuto mediante HPLC con detector a fluorescenza. Corrispondenza picchi(1) α -tocoferolo ; (2) β - tocoferolo; (3) γ -tocoferolo (4) δ -tocoferolo.

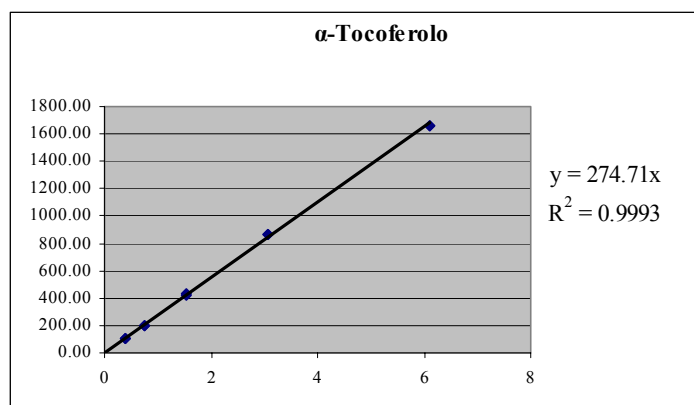


Figura 18. Retta di calibrazione dell'α-tocoferolo ottenuta mediante HPLC con detector a fluorescenza.

Tabella 23. Valutazione dell'α-tocoferolo contenuto degli oli vergini di oliva appartenenti a diverse cultivars ottenuta mediante HPLC con detector a fluorescenza.

Cultivars	α-Tocoferolo	
Tondina	175.8	1.0
Ogliarola	294.5	0.1
Arbequina	210.4	0.8
Leccino	78.2	0.1
Cassanese	125.3	0.4
Ottobratica	235.3	5.5
Carolea	300.1	1.0

Spettroscopia di luminescenza in scansione sincrona e valutazione dei composti fenolici presenti nel VOO.

La valutazione dei polifenoli totali contenuti nell'olio vergine di oliva attraverso la scansione sincrona ed espressi in funzione dell'idrossitirosole non ci ha permesso di ottenere risultati soddisfacenti. Infatti, le concentrazioni dei polifenoli totali contenuti nel VOO ricavati mediante scansione sincrona non erano confrontabili con i risultati ottenuti sui medesimi campioni valutati con metodo colorimetrico o HPLC. L'analisi dei minimi quadrati effettuata confrontando le are ottenute mediante scansione sincrona dei composti fenolici con le concentrazioni ottenute mediante iniezione diretta per HPLC ha dimostrato che non esiste nessun legame di correlazione; quindi non è possibile un'analisi quantitativa dei composti fenolici. Questo probabilmente è dovuto al fatto che questi composti presentano una differente intensità di fluorescenza, e inoltre le loro concentrazioni variano notevolmente da un olio.

Spettroscopia di luminescenza sincrona e valutazione dell' α -tocoferolo.

I risultati ottenuti, in questo caso, per la valutazione dell' α -tocoferolo sono molto soddisfacenti. Il confronto tra i dati conseguiti mediante scansione sincrona e quelli ottenuti per HPLC con detector fluorimetrico sono pressoché identici (Tabella 24). L'analisi dei minimi quadrati ottenuta analizzando trenta campioni di VOO effettuata con questi due metodi di valutazione è perfettamente lineare con un fattore di correlazione al quadrato pari a 0,997.

La scansione sincrona risulta essere un metodo molto efficace per la determinazione quantitativa dell' α -tocoferolo presente nel VOO (al contrario del contenuto fenolico), questo è da attribuire al fatto che nel range di lunghezze d'onda investigato per la sua determinazione non cadono altre sostanze che potrebbero inficiare i risultati dell'analisi. In realtà con queste condizioni strumentali utilizzate assorbono ed emettono nella stessa zona spettrale anche il β -tocoferolo, γ -tocoferolo e δ -tocoferolo, però questi nell'olio di oliva sono presenti in quantità dell'ordine dell'1-2 % in totale mentre l' α -tocoferolo al contempo è presente in una concentrazione superiore al 98 % e

cosa molto importante è che l'intensità di fluorescenza per tutti e quattro questi tocoferoli risulta essere molto simile (dati non riportati). Questi risultati sono stati confermati anche raffrontandoli con quelli ottenuti tramite HPLC.

Tabella 24. Valutazione dell' α -tocoferolo (mg/kg) contenuto degli oli vergini di oliva appartenenti a diverse cultivars : confronto tra HPLC-FLD e scansione sincrona.*

Cultivars	α -Tocoferolo			
	FLD		Scansione sincrona	
Nocellara	89.6	(0.3) ^a	88.3	(0.3) ^b
Cerasuola	89.2	(0.3) ^a	91.8	(0.5) ^b
Biancolilla	101.7	(0.2) ^a	104.6	(0.9) ^b
Moraiolo	93.8	(0.1) ^a	94.2	(0.2) ^b
Frantoio	102.0	(0.6) ^a	117.8	(0.1) ^b
Coratina	149.4	(0.1) ^a	150.9	(0.6) ^b
Canino	294.5	(0.3) ^a	292.6	(0.2) ^b
Dolce Rossana	298.6	(0.3) ^a	297.2	(0.3) ^b
Chetovi	224.0	(2.2) ^a	222.2	(0.5) ^a
Picholine	196.7	(0.99) ^a	195.9	(0.2) ^a
Chemlali	332.1	(0.3) ^a	333.1	(0.4) ^b
Ascolana Tenera	207.7	(0.1) ^a	206.9	(0.1) ^b

* I risultati rappresentano le medie di tre repliche; i numeri in parentesi rappresentano la deviazione standard. Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali per ciascuna cultivar e per due detectors rappresentano differenze non statisticamente significative ($P < 0.01$).

5. CONCLUSIONI

Al termine di una ricerca triennale volta allo sviluppo di nuovi metodi per la valutazione dei composti antiossidanti (composti fenolici ed α -tocoferolo) presenti nell'olio vergine di oliva, i risultati ottenuti possono essere riassunti nei seguenti punti.

1. Per quanto riguarda lo studio della valutazione del contenuto fenolico presente nell'olio vergine di oliva è la prima volta che viene effettuata un'analisi HPLC che prevede l'iniezione diretta in colonna del VOO. L'uso di tale tecnica è molto semplice, veloce e riduce il rischio di produrre artefatti ed inoltre evita il problema del parziale recupero delle sostanze fenoliche dalla matrice oleosa che si verifica durante la fase di estrazione liquido-liquido.
2. Gli studi effettuati sulle due fasi stazionarie C18, ODS-1 ed ODS-3, utilizzati per la separazione delle frazioni fenoliche presenti nel VOO, hanno evidenziato che la ODS-3 mostra una più alta selettività nella regione in cui eluiscono i picchi corrispondenti al 3,4-DHPEA-EDA e al *p*-HPEA-EDA, quindi questo permette una migliore risoluzione per quanto riguarda i differenti derivati dell'oleuropeina e del ligustroside aglicone. La colonna ODS-3 però mostra al contempo un comportamento peggiore nei confronti della separazione del *p*-HPEA-EDA e del (+)-pinoresinolo in quanto questi risultano quasi completamente sovrapposti. La colonna ODS-1 d'altro canto effettua una migliore separazione dei picchi corrispondenti al *p*-HPEA-EDA, (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo, ciò che la rende più idonea alla valutazione di tutte le frazioni fenoliche presenti nel VOO.
3. Per quanto concerne il detector a fluorescenza utilizzato per l'analisi dei composti fenolici mediante iniezione diretta, questo mostra una buona linearità in termini di risposta nei range di concentrazione riscontrabili negli oli di oliva, rendendolo così idoneo alla valutazione di tali sostanze.

4. La comparazione tra il detector a serie di diodi e quello a fluorescenza ha dimostrato che le valutazioni delle concentrazioni ottenute mediante questi due strumenti forniscono valori tra di loro molto simili, la cui differenza potrebbe rientrare nell'errore sperimentale. Tuttavia sono state riscontrate delle differenze a carico della valutazione dei lignani: in particolar modo per il (+)-pinoresinolo, che risulta avere una concentrazione molto più elevata nel caso della determinazione mediante il detector a fluorescenza. Tali differenze possono essere dovute o a sostanze coeluenti presenti nei diversi oli vergini di oliva ed aventi una elevata intensità di fluorescenza o al fatto di aver utilizzato dei composti standards separati dall'olio non perfettamente puri. In tal senso studi sono in corso per investigare più a fondo su questo aspetto, ed in particolare è in previsione uno studio approfondito mediante l'impiego di altre strumentazioni come ad esempio la LC-MS.
5. Per la valutazione dei polifenoli totali e dell' α -tocoferolo presenti nell'olio vergine di oliva mediante spettrofluorimetria è stata scelta la modalità di scansione sincrona in quanto questa tecnica fornisce informazioni più facili da interpretare. Tale tecnica comunque a dato degli ottimi risultati per quanto riguarda la valutazione dell' α -tocoferolo; al contrario nel caso dei polifenoli non è stato possibile ottenere una buona correlazione tra questi dati e quelli ottenuti mediante colorimetria (polifenoli totali) e HPLC (contributi singoli di ciascun composto e complessivi intesi come somme totali). Ciò è dovuto al fatto che queste sostanze fenoliche hanno intensità di fluorescenza molto diverse tra di loro e la zona dello spettro in cui questi cadono è uguale e quindi risulta impossibile separare i singoli contributi ed inoltre sono presenti in concentrazioni assai variabili nei diversi oli.

6. BIBLIOGRAFIA.

- Montedoro GF., Esposto S. *La situazione attuale e le prospettive del comparto oleario. Atti del convegno: "Il futuro dell'olio extravergine di oliva tra controllo dei costi ed eccellenza della qualità"*. Abazia di Spineto 3-6 dicembre 2004. In stampa.
- Gurr M. *Dietary lipids and coronary heart disease: old evidence, new perspective*. *Progr. Lipid Res.* 31(3): 195-243 (1992).
- Visioli, F., Bellomo G., Montedoro G.F., Galli C. *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. *Atherosclerosis*. 117: 25-32 (1995).
- Petroni A., Blasevich M, Salami M., Servili M., Montedoro GF., Galli C. *A phenolic antioxidant extracted from olive oil inhibits platelet aggregation and arachidonic acid metabolism in vitro*. *World-Rev. Nutrition Diet.*; 75: 169-172 (1994).
- Manna C., Galletti P., Cucciolla V., Montedoro GF., Zappia V. *Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages*. *J. Nutr. Biochem.*; 10(3): 159-165 (1999).
- Montedoro GF., Baldioli M., Servili M. *I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*. *Giornale Ital. Nutr. Clinica e Preventiva*. 1(1): 19-32 (1992).
- Morales M. T., Alonso M. V., Rios J. J., Aparicio R. *Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics*. *J. Agric. Food Chem.*; 43(11): 2925-2931 (1995).
- Angerosa F., Di Giacinto L., d'Alessandro N. *Quantitation of some flavor components responsible for the 'green' attributes in virgin olive oils*. *J. High. Resol. Chromatogr.* 20(9): 507-510 (1997).
- Aparicio R., Morales M.T., Alonso M.V. *Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory wheel*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(10): 1253-1264 (1996).
- Angerosa F., Di Giovacchino L. *Natural antioxidants of virgin olive oil obtained by two and three-phase centrifugal decanters*. *Grasas Aceites*. 47(4): 247-254 (1996).
- Regolamento UE 1989 del novembre 2003 modificante il Regolamento (CEE) n. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti. *Gazzetta Ufficiale L.* 295/57 13/11/2003.

- Whitehead MC., Beeman CS., Kinsella BA. *Distribution of taste and general sensor nerve endings*. Am J Anat 173:185-201 (1985).
- Morales M. T., Tsimidou M. *The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality*. In: Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties. Eds. J. Harwood, R. Aparicio, Aspen Publication, Gaithersburg, MD (USA), pp. 393-458 (2000).
- Boskou D. Olive Oil Chemistry and Technology, AOCS Press, Champaign, IL, USA, 1996, pp. 52–83.
- Shahidi F. *Natural antioxidants Chemistry, health effect and applications*. AOCS Press, Champaign, IL (USA) 1996, pp.97-149.
- Rovellini P., Azzolini M., Cortesi N. *Tocoferoli e tocotrienoli in oli e grassi vegetali*. Riv. Ital. Sostanze 1997, pp 1-5
- Cantarelli C. *Sui polifenoli presenti nella drupa e nell'olio di oliva*. Riv. Ital. Sostanze Grasse 38 (1961) 69-72.
- Montedoro GF., Cantarelli C. *Indagine sulle sostanze fenoliche presenti nell'olio di oliva*. Riv. Ital. Sost. Grasse 46 (1969) 115-124.
- Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro GF. *Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mechanical extraction process*. Acta Horticulturae 474 (1999) 609-619.
- Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Begliomini A.L., Taticchi A. *Relationships between phenolic composition of olive fruit and olive oil: the importance of the endogenous enzymes*. Acta Horticulturae (2001).
- Garrido Fernández Díez M. J., Adamos M. R. *Table olives*. Chapman & Hall, London (UK) 1997, pp. 67-109.
- Vasquez Roncero A., Graciani Costante E., MaestroDurán R. *Componentes fenólicos de la aceituna. Polifenoles de la pulpa*. Gracias y Aceites 25 (1974) 269-279.
- Maestro Durán R., Vasquez Roncero A. *Colorantes antocianicos de las aceitunas manzanillas maduras*. Gracias y Aceites 27 (1976) 237-245.
- Mazza, E. Miniati: *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. CRC Press, Boca Raton, Florida (USA) 1993, pp.64-67.
- Marekow N.L. *Polyphenols Research in Bulgaria*. Bull Liaison Groupe Polyphenols, 1984, pp. 12-31.

- Gariboldi P., Jommi G., Verotta L. *Secoiridoids from Olea europaea*. *Phytochemistry* 25 (1986) 865-869.
- Bourquelot E., Vintilesco J. C. R. *Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retré de l'olivier (Olea europaea L.)*. *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci., Paris (France)* 147 (1908) 533-535.
- Panizzi L., Scarpati M.L., Oriente G. *Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity*. *Gazz. Chim. Ital.* 90 (1960) 1449-1485.
- Ragazzi E., Veronese G., Guitto A. *The demethyloleuropein, a new glucoside extracted from ripe olives*. *Ann.Chim.* 63 (1973) 13-20.
- Kubo I., Matsumoto A. *Molluscicides from olives Olea europaea and their efficient isolation by countercurrent chromatography*. *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 687-688.
- Andary C., Wylde R., Laffite C., Privat G., Winternitz F. *Structure of verbascoside and orobancoside, caffeic acid sugar esters from Orobanche rapum-genistae*. *Phytochemistry* 21 (1982) 1123-1127.
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro GF. *HPLC Evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters and pomace and 1D and 2D-NMR characterization*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 873-882.
- M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, A. Macchioni, GF. Montedoro: *Phenolic compounds of olive fruit: one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit*. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 12-18.
- Montedoro GF. *I costituenti fenolici presenti negli oli vergini di oliva. Nota 1: identificazione di alcuni acidi fenolici e loro potere antiossidante*. *S.T.A.* 3 (1972) 177-186.
- Vasquez Roncero A. *Les polyphenols de l'huile d'olive et leur influence sur les caracteristiques de l'huile*. *Rev. Fr. Corps Gras* 25 (1978) 21-26.
- Solinas M., Cichelli A. *Sulla deteminazione delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva*. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 58 (1981) 159-164.
- Cortesi N., Fedeli E. *Polar components of virgin olive oil. Note 1*. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 60 (1983) 341-351.

- Solinas M. *Analisi HRGC delle sostanze fenoliche di oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione ed alla varietà delle olive*. Riv. Ital. Sostanze Grasse 64 (1987) 255-262.
- Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Miniati E. *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC*. J Agric. Food Chem. 40 (1992) 1571-1576.
- Tsimidou M., Lytridou M., Boskou D., Paooa-Lousi A., Kotsifaki F., Petrakis C. *On the determination of minor phenolic acids of virgin olive by RP-HPLC*. Grasas y Aceites 47 (1996) 151-157.
- Mannino S., Cosio M.S., Bertuccioli M. *High performance liquid chromatography of phenolic compounds in virgin olive oil using amperometric detector*. Ital. J. Food Sci. 4 (1993) 363-370.
- Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Miniati E. *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. Note 2: Initial characterization of the hydrolyzable fraction*. J Agric. Food Chem. 40 (1992) 1577-1580.
- Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati, E. Macchioni A. *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. Note 3: Spectroscopic characterization of the secoiridoids derivatives*. J. Agric. Food Chem. 41 (1993) 2228-2234.
- Angerosa F., D'Alessandro N., Corana F., Mellerio G. *Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 1802-1807.
- Angerosa F., D'Alessandro N., Konstantinou P., Di Giacinto L. *GC-MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil*. J. Chromatogr. A 736 (1996) 195-203.
- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H. *Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene*. Food Chem. Toxicol. 38 (2000) 647-659.

- Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalter B., Bartsch H. *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil.* Clin. Chem. 46 (2000) 976-988.
- Montedoro GF., Garofolo L., Bertuccioli M., Pannelli G. *Influence of the cultivars and pedoclimatic conditions on the virgin olive oil quality.* Proceedings of 6th International Flavor Conference, Rethymnon, Crete, Greece, 5-7 July 1989, Ed. G. Charalambous, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (The Netherlands) 1989, pp. 881-891.
- Pannelli G., Servili M., Famiani F., Montedoro GF. *Agro-climatic factors and characteristics of the composition of virgin olive oils.* Acta Horticulturae 286 (1990) 477-480.
- Uceda M., Hermoso M., García-Ortiz A., Jmenez A., Beltrán G. *Intraspecific variation of oil contents and the characteristics of oils in olive cultivars.* Acta Horticulturae 474 (1999) 659-652.
- Brenes M., García A., García P., Rios J. J., Garrido A.: *Phenolic compounds in Spanish oils.* J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3535-3540.
- Amiot M.J., Fleuriet A., Macheix J.J. *Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation.* J. Agric. Food Chem. 34 (1986) 823-826.
- Amiot M.J., Fleuriet A., Macheix J. J. *Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation.* Phytochemistry 28 (1989) 67-69.
- Pannelli G., Servili M., Selvaggini R., Baldioli M., Montedoro GF. *Effect of agronomic and seasonal factors olive (Olea europaea L.) production and on the qualitative characteristics of the oil.* Acta Horticulturae 356 (1994) 239-244.
- Motilva M.J., Romero M.P., Alegre S., Girona J. *Effect of regulated deficit irrigation in olive oil production and quality.* Acta Horticulturae 474 (1999) 377-380.
- Ismail A.S., Stavroulakis G., Metzidakis J. *Effect of irrigation on the quality characteristics of organic olive oil.* Acta Horticulturae 474 (1999) 687-690.
- Di Giovacchino L. *Olive harvesting and olive oil extraction.* In: Olive Oil Chemistry and Technology. Ed. D. Boskou, Am. Oil Chem. Soc. Press, Champaign, IL (USA), pp. 12-51 (1996).

- Capella P., Fedeli E., Bonaga G., Lerker G. *Manuale degli oli e dei grassi*. Tecniche Nuove, Milano (Italy) 1997.
- Servili M., Baldioli M., Montedoro GF. *Phenolic composition of virgin olive oil in relationship to some chemical and physical aspects of malaxation*. *Acta Horticulturae*. 356 (1994) 331-336.
- Lo Scalzo R., Scarpati M. L. *A new secoiridoid from olive waste waters*. *J. Nat. Prod.* 56 (1993) 621-623.
- Bianco A. D., Piperno A., Romeo G., Uccella N. *NMR experiments of oleuropein biomimetic hydrolysis*. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 3665-3668.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. *Phenolic Compounds in Different Olive Varieties*. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46(1); 32-35.
- Montedoro GF., Servili M. *Tradizione ed innovazioni tecnologiche nell'estrazione degli oli extravergini di oliva*. *Proceeding of the International Congress "Olive Oil Quality"*, Firenze (Italy) 1-3 December 1992, pp. 97-108.
- Amirante P., Catalano, P., Amirante R., Montel G., Dugo G., LoTurco, V. Baccioni L. Fazio D., Mattei A., Marotta F. *Estrazione da paste denocciolate*. *Olivo Olio* 4, 3 (2001) 48-55.
- Montedoro GF., Baldioli M., Servili M. *Estrazione dell'olio vergine da paste denocciolate*. *Olivo & Olio*. 4, 11 (2001), 28-32. C.
- Spencer M., Cai Y., Russel M., Gaffney S. H., Goulding P., Magnolato D., Lilley T.H. *Polyphenol complexation: some thoughts and observation*. *Phytochemistry* 27 (1988) 2397-2409.
- Sciancalepore V. *Enzymatic browning in five olive varieties*. *J. Food Sci.* 50 (1985) 1194-1195.
- Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Mariotti F., Federici E., Montedoro GF. *Effect of malaxation under N₂ flush on phenolic and volatile compounds of virgin olive oil*. 13th International Symposium on Plant Lipids, Siviglia (Spain) 1998, pp. 307-310.
- Ranalli A., De Mattia G. *Characterization of olive oil production with a new enzyme processing aid*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1105-1113.
- Siniscalco V., Montedoro GF. *Estrazione meccanica dell'olio di oliva mediante l'impiego di coadiuvanti tecnologici*. Nota 1: drenanti ed enzimi. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 11

(1988) 675-678

Vierhuis E., Servili M., Baldioli M., Schols H. A., Voragen A. G. J., Montedoro GF. *Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds*

and polysaccharides. J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 1218-1223.

Servili M., Baldioli M., Begliomini A. L., Selvaggini R., Montedoro GF. *The phenolic and volatile compounds of virgin olive oil: relationships with the endogenous oxidoreductases during the mechanical oil extraction process.* Flavour and Fragrance Chemistry, Eds. V. Lanzotti and O.Tagliatalata-Scafati, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands) 2000, pp. 163-173.

Servili M, Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A., Montedoro G.F. *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. 76 (1999) 873.

Di Giovacchino L., Solinas M., Miccoli M. *Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil.* J. Am. Oil Chem. Soc. 71 (1994) 1189-1194.

L. Di Giovacchino, N. Costantini, A. Serraiocco, G. Surricchio, C. Basti: *Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 103 (2001) 279-285.

Garcia A., Brenes M., Martinez F., Alba J., Garcia P., Garrido A. *High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale.* J. Am. Oil Chem. Soc. 78 (2001) 625-629.

Ranalli A., Angerosa F. *Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products.* J. Am. Oil Chem. Soc. 73 (1996) 417-421

Stefanoudakis E., Koutsafakis A., Kotsifaki F., Angerosa F., DiGirolamo M. *Quality characteristics of olive oils dualphases, three-phases decanters and laboratory mill.* Acta Horticulturae 474 (1999) 705-708.

De Stefano G., Piacquadio P., Servili M., Di Giovacchino L., Sciancalepore V. *Effect of the extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils.* Fett/Lipid 101 (1999) 328-332.

Frankel EN, Review. *Recent advances in lipid oxidation.* J. Sci. Food Agric. 54:495-511 (1991).

- Sanchez J and Salas JJ, *Biogenesis del aroma del aceite de oliva*. Manual del aceite de oliva. 4:89-107 (2003).
- Gordon M. H. *The mechanism of antioxidant action in vitro*. In: *Food antioxidants*. Ed. B. J. F. Hudson, Elsevier Applied Science, London (UK) 1990, pp. 1-18.
- Chimi H., Cillard J., Cillard P., Rahmani M. *Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants*. *Ibid* 68 (1991) 307-311.
- Gutierrez R., Gonzales-Quijano, Janer del Valle C., Janer del Valle M. L., Gutierrez Rosales F., Vasquez Roncero A. *Relationships between polyphenols content and the quality and stability of virgin olive oil*. *Grasas y Aceites* 28 (1977)101-106.
- Chimi H., Sadik A., Le Tutour B., Rahmani M. *Contribution à l'étude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive de tyrosol e de l'hydroxytyrosol, de l'acide caffeique, de l'oleuropéine. et du BHT*. *Rev. Fr. Corps Gras* 35 (1988) 339-344.
- Papadopoulos G., Boskou D. *Antioxidant effect of natural phenols of olive oil*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68 (1991) 669-671.
- Baldioli M., Servili M., Perretti G., Montedoro GF.: *Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73 (1996) 1589-1593.
- Ninfali P., Aluigi G., Bacchiocca M., Magnani M. *Antioxidant capacity of extra-virgin olive oil*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 243-247.
- Bacchiocca M, Aluigi G., Servili M., Begliomini A. L., Montedoro GF., Ninfali P. *Validation of the Orac method in the prevision of the stability of extravirgin olive oil*. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* 78 (2001) 151-156.
- Servili M., Montedoro GF. *Recupero dei polifenoli delle acque di vegetazione delle olive e valutazione del loro potere antiossidante*. *Industrie Alimentari* 28 (1989) 14-19.
- Evangelisti F., Zunin P., Tiscornia E., Petacchi R., Drava G., Lanteri S. *Stability to oxidation of virgin olive oils as related to olive conditions: study of polar compounds by chemometric methods*. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 1017-1023.
- Briante R., La Cara F., Tunziello P., Febraio F., Nucci R. *Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropeina hydrolysis by hyperthermophylic β -glucosidase*. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3198-3203.

- Tovar M.J., Motilva M.J., Romero M.P. *Changes in the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil from Young Trees (Olea europaea L. cv. Arbequina) Grown under Linear Irrigation Strategies* J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5502.
- Ames, B.N. and Gold, L.S. *Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction*. Mutat. Res., 2000, 447 (1), 3-13.
- Block, G., Patterson, B. and Subar, A. *Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence*. Nutr. Cancer, 1992, 18, 1-29.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1993, 90 (17), 7915-7922.
- Hensley, K., Carney, J.M., Mattson, M.P., Aksenova, M., Harris, M., Wu, J.F., Floyd, R.A. and Butterfield, D.A. *A model for amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease*. P. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1994, 91, 3270-3274.
- Brézillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Durao, J., Chèze, C. and Vercauteren, J. *Metabolism of catechin and epicatechin by the human colonic microflora*. In "XIXth International Conference on Polyphenols", Lille: Groupe Polyphenols, 1998.
- Montedoro GF., Baldioli, M. e Servili M. *I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*. Giornale italiano di nutrizione clinica e preventiva, 1992, 1, 19-32.
- Berliner J.A., Navab M., Fogelman A.M, Frank J.S., Demer L.L., Edwards P.A., Watson A.D., Luiss Aj. *The clinical events resulting from atherosclerosis are directly related to the oxidation of lipids in LDLs that become trapped in the extracellular matrix of the subendothelial space. These oxidized lipids activate an NF kappa B-like transcription factor* Circ. 91 (1995) 2488.
- Nakae D., Kobayashi Y., Akai H., Andoh N., Satoh H., Ohashi K., Tsutsumi M., Konishi Y. *The question of whether 8-hydroxyguanine (8-OHG) formation is involved in initiation by low dose levels of N-nitrosodiethylamine (DEN) was addressed using a rat liver model. Male Fischer 344 rats, 6 weeks of age, were administered single i.p. doses of DEN* Cancer Res. 57 (1997) 1281.
- Orlando R.C. *Mechanisms of epithelial injury and inflammation in gastrointestinal diseases* Rev. Gastroenterol. Disord. 2 (2002) S2.

- Rocca B., Fitzgerald G.A. *The relevance of cyclooxygenases (COX)-1 and -2 and their products to inflammation, thrombosis and gastroprotection are well known. Their importance in the immune response was first recognized more than 25 years ago, but has only gained.* Int. Immunopharmacol. 2 (2002) 202.
- O'Donnell E., Lynch M.A. *Dietary antioxidant supplementation reverses age-related neuronal changes.* Neurobiol. Aging 19 (1998) 461.
- Benkovic S.A., Condor J.R. *Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain.* J. Comp. Neurol. 338 (1993) 97.
- Floor E., *Recent findings strengthen the connection between iron accumulation in the basal ganglia, oxidative stress and nigrostriatal degeneration. Oxidative stress appears to be elevated in the normal human substantia nigra in comparison with other brain regions* Cell. Mol. Biol. 46 (2000) 709.
- Giovannelli L., Cozzi A., Guarnirei I., Dolora P., Moroni F. *The single-cell gel electrophoresis (comet assay) was used to evaluate the possibility of detecting single-strand breaks of brain DNA in the early phase of ischemia. Four hours after occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) in rats, the percentage* Cereb J. Blood Flow Metab. 22 (2002) 697.
- Giovannelli L., Decorosi F., Dolora P., Pulvirenti L., *vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay* Brain Res. 969 (2003) 244.
- Martin-Moreno J.M., Willet W.C., Gorgoio L., Banegas J.R., Rodriguez-Artalejo F., Fernandez-Rodriguez J.C., Maisonneuve P., Boyle P. *Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk.* Int. J. Cancer 58 (1994) 774-800
- Trichopoulou A., Katsouyanni K., Stuver S., Tzala L., Gnardellis C., Rimm E., Trichopoulou D. *Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece* J. Natl. Cancer Inst. 87 (1995) 110.
- La Vecchia C., Negri E., Franceschi S., de Carli A., Giocosa A., Lipworth L. *Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy).* Cancer Causes Control 6 (1995) 545.
- Lipworth L., Martinez M.L., Angell J., Hsieh C.C., Trichopoulou D., *Background. We have attempted to summarize the evidence concerning the association of olive oil*

- intake with cancer risk in humans. Methods. We reviewed all the studies that met the following criteria: (1) they have directly examined olive* Prev. Med. 26 (1997) 181.
- Kushi L., Giovannucci E. *Based on current epidemiologic knowledge, public health recommendations to decrease total fat intake for the prevention of cancer appear largely unwarranted. Recommendations to decrease red meat intake, particularly processed meat* Am. J. Med. 113 (2002) 63S.
- Soler M., Chatenaud L., La Vecchia C., Franceschi S., Negri S., *Diet, alcohol, coffee and pancreatic cancer: final results from an Italian study.* Eur. J. Cancer Prev. (1998) 7.
- Bosetti C., Gallus S., Trichopoulou A., Talamini R., Franceschi S., Negri E. *Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract* Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 12 (2003) 1091.
- Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V., Gill L. *Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis.* J. Epidemiol. Community Health 54 (2000) 756.
- Tzonou A., Signorello L.B., Lagiou P., Wu J., Trichopoulou D., Trichopoulou A. *Diet and cancer of the prostate: a case-control study in Greece* Int. J. Cancer 80 (1999) 704.
- Hodge E., English D.R., McCredie M.R.E, Severi G., Boyle P., Hopper J.L., Giles G.G. *Foods, nutrients and prostate cancer* Cancer Causes Control 15 (2004).
- Fortes C., Forestiere F., Farchi S., Mallone S., Trequattrini T., Anatra F., Schmid G., Peducci C.A. *The protective effect of the Mediterranean diet on lung cancer.* Nutr. Cancer 46 (2003) 30.
- Ichihashi M., Ueda M., Budiyo A., Bito T., Oka M., Fukunaga M., Tsuru K., Horikawa T. *Solar radiation induces acute and chronic reactions in human and animal skin. Chronic repeated exposures are the primary cause of benign and malignant skin tumors, including malignant melanoma. Among types of solar radiation, ultraviolet B* Toxicology 189 (2003) 21.
- Bartoli R., Fernandez-Banares F., Navarro E., *Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis.* Gut 46 (2000) 191.

- Aeschbach R., Loliger J., Scott B.C, Murcia A., Butler J., Halliwell B.,Trauma O.I. *Antioxidants minimize oxidation of the lipid components in foods. There is an increasing interest in the use of natural and/or synthetic antioxidants in food preservation, but it is important to evaluate such compounds fully for both antioxidant.* Food. Chem. Toxicol. 32 (1994) 31.
- Grignaffini P., Roma P., Galli C., Catalano A.L. *Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol* Lancet 343 (1994) 1296.
- Visioli F., Bellomo G., Montedoro G.F, Galli C. *Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: the potential role of olive oil and its minor constituents.* Atherosclerosis 117 (1995) 25.
- Manna C., Galletti V., Cucciolla P., Montedoro G.F., Zappia V., J. *Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages.* J. Nutr. Biochem. 10 (1999) 159-165.
- Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G.F., C. Galli. *Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic component of olive oil.* Thromb. Res. 78 (1995) 151.
- Dejana M., Trauma O.I., Bianchi M.P., Spencer J.P.E., Harparkash K., Halliwell B., Haeschbach R., Banni S., Dessi M.A., Corongiu F. *Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol* Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 762.
- Owen R.W., Giocosa A., Hull W.E., Haubner R., Spiegelhalder B., Bartsch H. *The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil.* Eur. J. Cancer 36 (2000) 1235.
- Martinez-Dominguez E., De La Puerta R., Ruiz-Gutierrez V. *Protective effects upon experimental inflammation models of a polyphenol-supplemented virgin olive oil diet.* Inflamm. Res. 50 (2001) 102.
- Fabiani R., De Bartolomeo A., Rosignoli P., Servili M., Montedoro G.F., Morozzi G. *Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis.* Eur. J. Cancer Prev. 11 (2002) 351.
- Gutiérrez Rosales F., Perdiguero S., Gutiérrez R., Olias J.M. *Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil.* J. Am. Oil Chem. Soc. 69 (1992) 394.

- G.F. Montedoro, M. Baldioli, M. Servili, *I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*. Giornale Ital. di Nutriz. Clin. e Prev. 1 (1992) 19-3
- Jha P. Flather M., Lonn E., Farkouh M., Yusuf S. *The antioxidant vitamins and cardiovascular disease: a critical review of epidemiologic and clinical trial data*. Ann. Intern. Med., 1996, 124, 934.
- Stampfer MJ., Rimm EB. *Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease*. Am. J. Clin Nutr., 1995, 62, 365-369.
- GISSI. *Prevenzione Investigators. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and Vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial*. Lancet, 1999, 354, 447-455.
- Yusuf S., Dagenais G., Pogue J., Bosch J., Sleight P. *Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention study investigators*. N. Eng. J. Med., 2000, 342, 154-160.
- Gutiérrez Rosales F., Perdiguero S., Gutiérrez R., J. M. Olias: *Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil*. J. Am. Oil Chem. Soc. 69 (1992) 394-395.
- Montedoro GF., Baldioli M., Servili M. *I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*. Giornale Ital. di Nutriz. Clin. e Prev. 1 (1992) 19-32.
- Graciani Costante E., Vasquez Roncero A. *Estudio de los componentes polares del aceite de oliva por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). III Aplicación a diversos tipos de aceites virgenes*. Grasas y Aceites 32 (1981) 365-370.
- García A., Brenes M., Martínez F., Alba J., García P., Garrido A. *High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale*. J. Am. Oil Chem. Soc. 78 (2001) 625-629
- Gutiérrez-Rosales F., Ríos J.J., Gómez-Rey M.L., J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6021.
- Andrewes P., Busch J.L.H.C, De Joode T., Groenewegen A., Alexandre H., J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1415.
- Vasquez Roncero, A. *Les polyphénols de l'huile d'olive et leur influence sur les caractéristiques de l'huile*. ReV. Fr. Corps Gras 1978, 25, 21-26.

- Solinas, M.; Cichelli, A. *Sulla determinazione delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva*. RiV. Ital. Sostanze Grasse 1981, 58,159-164.
- Cortesi, N.; Fedeli, E. *Polar components of virgin olive oil*. Note 1. RiV. Ital. Sostanze Grasse 1983, 60, 341-351.
- Solinas, M. *Analisi HRGC delle sostanze fenoliche di oli vergini di oliva in relazione al grado di maturazione ed alla varietà delle olive*. RiV. Ital. Sostanze Grasse 1987, 64, 255-262.
- Tsimidou, M.; Lytridou, M.; Boskou, D.; Pappa-Louisi, A.;Kotsifaki, F.; Petrakis, C. *On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC*. Grasas Aceites 1996, 47,151-157.
- Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Corana, F.; Mellerio, G. *GCMS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil*. J.Agric. Food Chem. 1995, 43, 1802-1807.
- Angerosa, F.; D'Alessandro, N.; Konstantinou, P.; Di Giacinto, L. *Characterization of phenolic and secoridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1996, 736, 195-203.
- Rovellini, P.; Cortesi, N. *Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropein and ligstroside aglycons in virgin olive oil: Aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products*. RiV. Ital. Sostanze Grasse 2002, 79, 1-14.
- Romero, C.; Brenes, M.; Garcí'a, P.; Garrido, A. *Hydroxytyrosol 4-β-D-Glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products*. J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 3835-
- Brenes, M.; Garcí'a, A.; Rios, J. J.; Garcí'a, P.; Garrido, A. *Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils*. Int. J.Food Sci. Technol. 2002, 37, 615-625.
- Pirisi, F. M.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V. L. *Phenolic compounds in virgin olive oils I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution*. J. Chromatogr. A 1997, 768, 207-213.
- Brenes, M.; Garcí'a, A.; Garcí'a, P.; Aarrido, G. *Rapid and complete extraction of phenols from olive oil and determination by means of a coulometric electrode array system*. J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 5178-5183.

- Pirisi, F. M.; Cabras, P.; Cao, C. F.; Magliorini, M.; Suggelli, M. *Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures.* J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1191-1196.
- Rovellini, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E. *Analysis of flavonoids from Olea Europaea by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS.* RiV.Ital. Sostanze Grasse 1997, 74, 273-279.
- Brenes, M.; Garcí'a, A.; Rios, J. J.; Garcí'a, P.; Garrido, A. *Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils.* Int. J. Food Sci. Technol. 2002, 37, 615-625.
- Brenes, M.; Garcí'a, A.; Garcí'a, P.; Rios, J. J.; Garrido, A. *Phenolic compounds in spanish olive oils.* J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 3535-3540.
- Cartoni, G. P.; Coccioli, F.; Jasionowska, R.; Ramires, D. *HPLC analysis of the benzoic and cinnamic acids in edible vegetable oils.* Ital. J. Food Sci. 2000, 12, 163-173.
- Tsimidou M.: *Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect.* Ital. J. Food Sci. 10 (1998) 99-116.
- Psomiadou E., e Tsimidou M. *Simultaneous HPLC Determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation.* J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 5132-5138.
- Psomiadou El., Tsimidou M., Boskou D. *α -Tocopherol content of greek virgin olive oil.* J. Agric. Food Chem. 2000, 48, 1770-1775.
- Guimet F., Boqué R., Ferré J. *Cluster analysis applied to the exploratory analysis of commercial spanish olive oils by means of excitation-emission fluorescence spectroscopy.* Agric. J. Food Chem. 2004, 52, 6673-6679.

RINGRAZIAMENTI

Colgo l'occasione della stesura di questa tesi per ringraziare tutti coloro che ne hanno permesso la realizzazione.

Un primo sentito grazie va al mio maestro e tutore, Al Prof. Maurizio Servili per avermi offerto l'opportunità di svolgere questa ricerca, seguendola in prima persona passo dopo passo e mettendomi a disposizione le sue profonde conoscenze scientifiche.

Prof. GianFrancesco Montedorodico grazie perchè oltre ad essere sempre presente in ogni fase di questo lavoro, mi ha saputo infondere la sua grande passione per la ricerca.

Al caro amico Dott. Roberto Selvaggini va il mio grazie di cuore perché ho potuto contare sempre sulle sue infinite conoscenze in campo strumentale.

Grazie infinite Al prof. Giuseppe Losi coordinatore del corso per la sua grande disponibilità, sempre pronto ad accogliere ogni richiesta.

Grazie alle Dott.sse Sonia Esposto e Agnese Taticchi mie "compagne di viaggio" che con il loro supporto scientifico e morale hanno alleggerito il "peso" della ricerca.

Sento inoltre di dover ringraziare tutto il personale tecnico ed amministrativo della sezione di Biotecnologie degli Alimenti dell'Università di Perugia, diretta dal Prof. Paolo Fantozzi, in particolare il Sig. Sergio Falaluna che con grande disponibilità, mi ha fornito preziosi consigli durante le diverse fasi della ricerca e la Sig.ra Rosanna Galardini sempre pronta a soddisfare ogni mia necessità in laboratorio.