

Università della Calabria

Dipartimento di Farmacia
e Scienze della Salute e della Nutrizione



Corso di Laurea Magistrale in
Scienza della Nutrizione

Tesi di Laurea Sperimentale

“Monitoraggio del tirosil oleato in oli d’oliva”

Relatore

Dott. Pierluigi Plastina

Candidato

Raffaella Mazziotti

Matr. 188990

Correlatore

Dott.ssa Cinzia Benincasa

Anno Accademico 2017 / 2018

Ai miei genitori

Indice

Introduzione	1
Capitolo I	3
La pianta e i suoi prodotti.....	3
<u>1.1</u> <i>L'olivo: caratteristiche botaniche</i>	3
1.2 <i>Struttura e composizione chimica della drupa</i>	5
1.3 <i>Composizione chimica dell'olio di oliva</i>	6
1.4 <i>Classificazione merceologica degli oli</i>	7
1.5 <i>Ciclo produttivo</i>	8
1.6 <i>Parametri di qualità</i>	11
Capitolo II	15
Fenoli	15
<u>2.1</u> <i>Definizione e funzioni delle sostanze fenoliche</i>	15
2.2 <i>I composti fenolici nella drupa e nell'olio</i>	16
2.3 <i>Fattori che influiscono sul contenuto fenolico</i>	19
2.4 <i>Tirosolo e i suoi derivati</i>	21
Capitolo III	25
Parte sperimentale: Materiali e Metodi.....	25
<u>3.1</u> <i>Campionamento oli</i>	25
3.2 <i>Sintesi del tirosil oleato</i>	25
3.3 <i>Trattamento termico dei campioni di olio</i>	26
3.4 <i>Estrazione dei composti fenolici dall'olio</i>	26
3.5 <i>Analisi HPLC-MS/MS</i>	27
3.6 <i>Determinazione del valore di acidità libera (AV)</i>	28
3.7 <i>Determinazione del valore di perossidi (PV)</i>	29
3.8 <i>Determinazione di specifici valori di estinzione molare (analisi spettrofotometrica)</i>	29
3.9 <i>Analisi sensoriale: metodo Panel Test</i>	30
Capitolo IV	36
Risultati e discussione.....	36
<u>4.1</u> <i>Analisi quantitativa del tirosil oleato</i>	36
4.2 <i>Numero di perossidi</i>	37
4.3 <i>Acidità libera</i>	37

<i>4.4 Misura di ΔK</i>	37
<i>4.5 Analisi sensoriale</i>	38
<u>4.5.1 Cv. Carolea (2017/2018)</u>	38
<u>4.5.2 Cv. Dolce di Rossano (2017/2018)</u>	39
<u>4.5.3 Cv. Nocellara del Belice (2017/2018)</u>	39
<u>4.5.4 Cv. Carolea (2018/2019)</u>	40
<u>4.5.5 Cv. Dolce di Rossano (2018/2019)</u>	40
<u>4.5.6 Cv. Pennulara (2018/2019)</u>	41
Conclusioni	42
Bibliografia	43
Ringraziamenti	Errore. Il segnalibro non è definito.

Introduzione

Conosciuto in tempi antichi come “oro liquido” per diversi effetti terapeutici, l’olio extravergine d’oliva è uno dei prodotti rappresentativi della tradizione e della cultura dei paesi mediterranei tanto che è tra i componenti base della “dieta mediterranea” anche se, ormai, il settore oleario si sta sviluppando anche in altre aree geografiche. Studi epidemiologici e clinici evidenziano le qualità nutrizionali di questo alimento, considerato il migliore tra tutti i grassi alimentari, sottolineando l’importanza di un consumo regolare di olio d’oliva grazie alle sue proprietà benefiche, tra cui: prevenzione nelle malattie dell’invecchiamento, inibizione della secrezione acida dello stomaco, stimolazione della secrezione pancreatica e regolazione della motilità intestinale. In particolare, alcune delle attività benefiche per la salute sembrano correlate alla componente fenolica avente capacità antiossidante e antiinfiammatoria, in grado di salvaguardare l’equilibrio fisiologico dell’organismo dallo stress ossidativo e dunque dall’attacco di radicali liberi. Importante è la presenza, nell’olio d’oliva, di composti fenolici semplici, tirosolo e idrossitirosolo, che si ritrovano in forma libera o sotto forma di composti più complessi, quali i derivati secoiridoidi, ligstrosidi e oleuropeina, rispettivamente; a differenza di molti composti fenolici che sono ubiquitari nel mondo vegetale, questi ultimi, sono esclusivamente presenti nella pianta di olivo. È proprio alla componente fenolica, spesso presente in forma glicosidica e alla composizione in acidi grassi, caratterizzata da un alto rapporto di acidi grassi monoinsaturi-polinsaturi, che si deve attribuire la stabilità dell’olio d’oliva e dunque il mantenimento nel tempo delle caratteristiche qualitative.

La composizione dei derivati fenolici in un olio fresco è influenzata dalla varietà, dalle condizioni climatiche, maturazione della frutta e dal processo di estrazione dell’olio. Temperatura, luce, disponibilità di ossigeno, imballaggio e tempo di conservazione (*shelf-life*) sono i fattori principali che influenzano la composizione fenolica degli oli invecchiati.

Una domanda critica sollevata dalla maggior parte dei produttori di olio d’oliva è ciò che succede ai principali composti fenolici durante lo stoccaggio e quali parametri svolgono il ruolo più importante. L’olio, durante la conservazione, dovrebbe mantenere le caratteristiche compositive e sensoriali della categoria commerciale riportata in

etichetta, quindi è importante studiare il comportamento dell'olio di ogni cultivar sotto diverse condizioni.

Recentemente, è stata osservata la presenza di alcuni composti fenolici di tipo lipofilo sia nell'olio d'oliva che negli scarti di lavorazione (sansa e acque di vegetazione). Fra questi, il tirosil oleato (estere formato da un residuo di acido oleico e uno di tirosolo) è stato identificato e quantificato sia in oli extravergine che in oli difettati. In particolare, il tirosil oleato è risultato più abbondante negli oli difettati che in quelli extravergine. Pertanto, nel seguente lavoro di tesi, oli extravergine di oliva monovarietali di diverse cultivar (Carolea, Nocellara del Belice, Dolce di Rossano e Pennulara) e provenienti da diverse campagne olearie oltre ad alcuni oli difettati sono stati sottoposti ad estrazione della componente fenolica per valutare se la diversa annata e/o l'invecchiamento dell'olio potessero influenzare il contenuto di tirosil oleato.

Parallelamente, sono stati valutati anche alcuni dei principali parametri di qualità dell'olio (acidità, numero di perossidi, ΔK , analisi sensoriale), in modo da mettere in relazione il contenuto di tirosil oleato con la qualità dell'olio.

Capitolo I

La pianta e i suoi prodotti

1.1 L'olivo: caratteristiche botaniche

L'olivo, pianta millenaria del paesaggio agricolo del Mediterraneo, è stato da sempre apprezzato per i suoi frutti e per l'olio che da essi si ricava. La sua storia s'intreccia con quella dei popoli mediterranei non solo nell'ambito agronomico, ma anche nelle scienze naturali, nell'economia, nella letteratura, nella religione e nelle arti. La zona di origine si ritiene sia quella sud caucasica intorno al 1500-3000 a.C.

L'olivo (*Olea europaea* L.) appartiene alla famiglia delle *Oleaceae* ed è possibile distinguere due varietà botaniche: *Olea europaea sativa* e *Olea europaea oleaster*. *Olea europaea oleaster*, detta anche Olivastro o Oleastro, è di tipo selvatico. *Olea europaea sativa*, invece, è conosciuta con il nome volgare di olivo ed è l'unica specie della famiglia delle *Oleaceae* con frutto commestibile e si pensa che la specie coltivata derivi per selezione e successiva propagazione vegetativa dall'olivo selvatico.

È una pianta sempreverde, ovvero la sua fase vegetativa è pressoché continua durante tutto l'anno, con solo un leggero calo nel periodo invernale, con massima produttività al decimo anno e maturità dopo i cinquanta anni. È una specie tipicamente basitone, cioè che assume senza intervento antropico la forma tipicamente conica. L'altezza può variare da 3 a 15 metri a seconda della cultivar, delle condizioni pedo-climatiche e dell'ambiente. Le radici sono prevalentemente di tipo fittonante nei primi 3 anni di età, poi si trasformano quasi completamente in radici di tipo avventizio, garantendo alla pianta vigoria anche su terreni rocciosi; non si spingono oltre i 60–100 cm di profondità. Il sistema radicale, molto esteso, consente all'albero di sfruttare l'umidità contenuta in un grande volume di terreno e l'elevata pressione osmotica interna lo mette in grado di assorbire acqua anche quando il contenuto idrico del suolo si porta su valori inferiori al punto di appassimento.

Il tronco inizialmente è cilindrico ed eretto, diviene con l'età largamente espanso alla base, irregolare, sinuoso e nodoso, spesso cavo; con rami nodulosi (ovoli) e ramuli teneri (polloni basali) e con chioma densa (*Figura 1*).

Le foglie sono semplici, mucronate cioè terminanti a punta, ellittiche, con la parte superiore verde scuro e l'inferiore bianco-argento per la presenza di minuscoli peli stellati che servono a limitare la traspirazione e quindi a resistere meglio durante la siccità estiva.

I fiori ermafroditi sono raccolti in gruppi di 10-15, in brevi e rade pannocchie ascellari, dette mignole; la mignolatura, ovvero la comparsa dei boccioli, avviene a primavera da febbraio ad aprile (in funzione delle condizioni climatiche) e la fioritura 4-5 settimane dopo (da maggio alla prima metà di giugno). Inizia poi la maturazione dei frutti, ma solo il 3-4% dei fiori diventerà frutto perché tutti gli altri cadono precocemente; inoltre tra i fiori della stessa pianta non si può avere autoimpollinazione, per cui gli uliveti devono sempre essere formati da più varietà affiancate per assicurare l'interfecondità.

I frutti sono drupe ovoidali (olive), hanno colore che varia dal verde al giallo al viola al nero violaceo, con mesocarpo oleoso e nocciolo legnoso e rugoso. I primi frutti sono prodotti dal terzo anno di vegetazione della pianta. Una prima fase di accrescimento dei frutti, si arresta quando inizia l'indurimento del nocciolo, nel mese di luglio e si protrae fino agli inizi di agosto, per poi riprendere quando il nocciolo è completamente lignificato. La maturazione dell'oliva avviene in tre fasi: nella prima, che inizia ad agosto, la drupa è ancora verde perché ricca di clorofilla e con poca polpa e poco olio. Nella seconda fase, detta invaiatura (da ottobre a dicembre, secondo la varietà), l'oliva comincia a diventare prima rosso-viola e poi sempre più scura, la buccia si copre di pruina e all'interno della polpa inizia la litogenesi, la sintesi dell'olio, nel corso della quale la drupa perde acqua, proteine e zuccheri e questo cambiamento di colore indica la completa maturazione. Nell'ultima fase, quella di maturazione a fine autunno, il frutto è color viola scuro e i piccioli che lo tengono attaccato al ramo si indeboliscono, tendendo al distacco dal frutto.

L'*Olea europaea* L. è una specie tipicamente termofila ed eliofila, sensibile alle basse temperature. Predilige ambienti e climi non eccessivamente secchi, aridi e asciutti grazie alla capacità di utilizzare efficacemente l'acqua del terreno e di valorizzare le precipitazioni con un apparato radicale dalla notevole espansione. In caso di stagione secca, le olive restano di piccole dimensioni e daranno una bassissima resa in olio. Le olive raggiungono invece il completo sviluppo a settembre. Eventuali piogge tardive

(da fine settembre a ottobre) dopo una forte siccità estiva possono in pochi giorni far aumentare le dimensioni delle olive in modo considerevole, compromettendo la resa in olio per l'accumulo di acqua. Vegeta nei terreni sciolti, grossolani o poco profondi, con rocciosità affiorante e fra gli alberi da frutto è inoltre una delle specie più tolleranti alla salinità e può essere coltivato anche in prossimità dei litorali, dal piano sino a 900 metri sopra il livello del mare (Pignatti, 1982; Riley, 2002; Bown, 1995).



Figura 1. Olea europaea L.

1.2 Struttura e composizione chimica della drupa

Il frutto è formato dalla parte esterna o buccia (epicarpo) che costituisce l'1.5-3.5% del peso della drupa, dalla polpa (mesocarpo) che costituisce il 70-80%, dal nocciolo (endocarpo) il 15-25% e dalla mandorla (seme) pari al 2.5-4% (*Figura 2*). La buccia è costituita da cellule rivestite da una spessa cuticola di pruina, una sostanza cerosa, mentre la polpa è la parte contenente l'olio che, col procedere della maturazione, si raccoglie o negli spazi intercellulari oppure dentro particolari cellule a otricello, dalla parete sottile ed elastica. Il nocciolo legnoso contiene invece pochissimo olio. I componenti dell'oliva, nel suo insieme, sono:

- proteine: sono costituite dagli aminoacidi in ordine decrescente arginina, alanina, glicina, leucina, prolina, acido aspartico e acido glutammico;

- carboidrati: sono cellulosa ed emicellulosa pari a circa il 3-6% del peso della polpa, pectine 1.5% (idrolizzate durante il processo di maturazione) e zuccheri riducenti solubili (glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio);
- lipidi: i trigliceridi sintetizzati nel reticolo endoplasmatico, contrariamente a quanto accade nei semi, non vengono incorporati negli oleosomi, che non sono presenti nel frutto di olivo (Lercker & Gallina Toschi, 2005; Murphy, 1993).

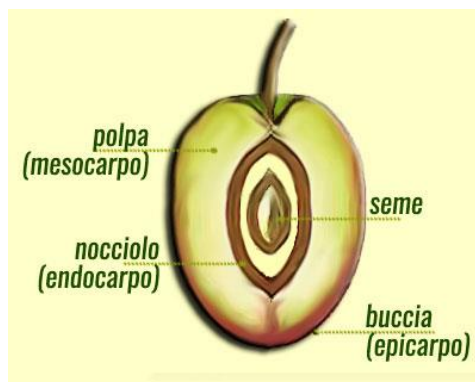


Figura 2. Morfologia della drupa

1.3 Composizione chimica dell'olio di oliva

La composizione chimica dell'olio, così come quella dell'oliva, è influenzata dalla cultivar di olivo, dal grado di maturazione della drupa, dal clima, dal periodo, dal metodo di raccolta e dal metodo di estrazione.

I costituenti fondamentali dell'olio d'oliva sono i trigliceridi o triacilgliceroli (TG), 98-99 %, che rappresentano la frazione *saponificabile*; sono un gruppo eterogeneo di esteri di glicerolo con residui di diversi acidi grassi. L'acido grasso predominante è l'acido oleico, seguito da linoleico, palmitico e stearico. Il trigliceride predominante è la trioleina. Una prolungata permanenza dell'oliva sulla pianta determina la progressiva diminuzione dell'acido palmitico e oleico e l'aumento del linoleico, a scapito delle caratteristiche organolettiche e della stabilità del prodotto. Più precisamente, in un olio di oliva di buona qualità l'acido oleico non dovrebbe essere inferiore al 73% e l'acido linoleico non dovrebbe superare il 10%, con un rapporto oleico/linoleico ≥ 7 . Gli acidi oleico e linoleico sono esterificati prevalentemente in

posizione 2 del glicerolo; ciò è importante ai fini analitici, in quanto permette di distinguere un grasso naturale da uno sintetico (Cappelli & Vannucchi, 2009).

I triacilgliceroli tendono a fondersi per produrre piccole gocce di olio che si ingrandiscono durante la maturazione fino a raggiungere un diametro di circa 30 μm . Tali gocce di olio sono protette da membrane di polisaccaridi rappresentate in maggioranza da trigliceridi e piccole quantità di acidi grassi liberi, digliceridi (diacilgliceroli, DG), monogliceridi (monoacilgliceroli, MG), glicolipidi e fosfolipidi (Frega et al., 1993).

Nella frazione *insaponificabile* che costituisce l'1-1.5% e non deve essere sottovalutata, troviamo: idrocarburi (squalene), cere, fitosteroli, tocoferoli, vitamine liposolubili (provitamina A), pigmenti (clorofilla, caroteni), antociani, flavonoidi, alcoli di- e tri-triterpenici, polifenoli.

1.4 Classificazione merceologica degli oli

Nel corso degli anni, i parametri per differenziare le diverse tipologie di oli ottenuti da olive sono stati ampliati, rivisti e approfonditi. Il Reg. CEE n. 2568/91 e le successive modifiche (n. 1513/2001, n. 1234/2007, n. 640/2008 e n. 1348/2013) definiscono i vari tipi di olio e i metodi di analisi per la verifica della conformità di un campione di olio di oliva alla categoria dichiarata, inserendo il Panel test obbligatorio. Il parametro principale mediante il quale un olio viene classificato è l'acidità, espressa in grammi di acido oleico per 100 grammi di olio. Maggiore è il grado di idrolisi (e quindi di acidi grassi liberi), più l'olio è scadente e predisposto alle alterazioni.

Oli ottenuti per spremitura meccanica: oli vergini estratti dall'oliva soltanto mediante processi meccanici o fisici (pressione o centrifugazione). Si distinguono in:

- Olio di oliva vergine extra: olio ottenuto dalla prima spremitura di olive attraverso processi meccanici, quindi senza ricorso a processi o sostanze chimiche, in condizioni che non causino alterazioni dell'olio e la cui acidità libera non risulti superiore allo 0,8%;
- Olio di oliva vergine: olio ottenuto dalle olive meccanicamente o con altri processi fisici, in condizioni termiche da non alterarli e con acidità non superiore al 2%;

- Olio di oliva lampante: olio con caratteristiche non alimentari ma destinato alla raffinazione, dunque con acidità superiore al 2%.

Oli raffinati, ottenuti da oli vergini lampanti: oli contenenti oli di oliva che hanno subito un processo di raffinazione. Si dividono in:

- Olio di oliva raffinato: si ottiene per rettifica di oli lampanti (deacidificazione, decolorazione, deodorazione, demucillaginazione e winterizzazione); acidità libera $\leq 0,3\%$; è un olio incolore, inodore, insapore, non commercializzabile al dettaglio, ma viene miscelato con olio vergine per produrre olio di oliva (in tal caso l'acidità aumenta a 0,5-1%);
- Olio di oliva: ottenuto dal taglio di olio di oliva raffinato con olio di oliva vergine o extravergine diverso dall'olio lampante, con acidità $\leq 1\%$.

Infine, ci sono gli oli di sansa, ottenuti - tramite estrazione con solventi o per mezzo di processi fisici ed eventualmente raffinati - dai residui rimasti dopo la lavorazione delle olive come bucce, frammenti di nocciolino o di polpa. Si tratta di prodotti a uso alimentare ma dalla scarsa qualità, mentre sono indicati per impieghi diversi come fertilizzanti o combustibili (Cappelli & Vannucchi, 2009; Cognoli & Squadrilli, 2017).

1.5 Ciclo produttivo

I sistemi di coltivazione influenzano il risultato, rappresentato dalle caratteristiche qualitative dell'olio. L'ambiente (terreno, piovosità, temperatura, umidità) è molto importante ai fini della qualità finale delle drupe, così come i sistemi di coltivazione (potatura, concimazione, trattamenti fitosanitari, irrigazione). Il ciclo produttivo comprende diverse fasi:

- raccolta: le olive maturano con un incremento di olio e una progressiva diminuzione del contenuto in polifenoli; la resa in olio, la qualità organolettica e la sua stabilità nel tempo sono legate al momento ottimale di maturazione. I sistemi di raccolta sono una delle cause più importanti della produzione di oli scadenti. L'ammaccatura della drupa provoca rotture delle membrane dei vacuoli di olio con il contatto fra gli enzimi e olio, per cui il tempo che intercorre fra raccolta e lavorazione delle olive, diviene determinante per la qualità futura dell'olio prodotto. Sistemi di raccolta violenti, o affidati alla

cascola delle olive, saranno la causa di produzioni di oli scadenti e poco conservabili (Cerretani et al., 2004; Bendini et al., 2006). Esistono tecniche di raccolta manuale (brucatura, pettinatura, raccattatura) e meccaniche (scrollatura, bracci e pettini meccanici); dopo la raccolta le olive vengono trasportate all'oleificio e, innanzitutto, pesate;

- stoccaggio: tra la raccolta e la frangitura, esse possono essere conservate in magazzini ben aerati e asciutti, disposte su graticci sovrapposti. Le drupe di olivo, come tutti i frutti, “respirano” durante la conservazione con sviluppo di calore e consumo anche di polifenoli. Lo sviluppo di calore spesso localizzato nei punti di contatto e di pressione, frutto contro frutto, si può fronteggiare dissipando il calore con una buona aerazione dei contenitori, che devono avere lo strato di olive ridotto al minimo possibile (10-15 cm). Il consumo di polifenoli è progressivo, per cui l'unico modo per ridurre gli effetti negativi sugli oli, è lavorare il più presto possibile le olive e tanto più rapidamente quanto più esse sono “compromesse” (ammaccate, raggrinzite o ammuffite);
- cernita e lavaggio: consiste nel liberare da rametti e/o foglie singole la massa di olive da lavorare, allontanando quelle piccole, raggrinzite, marce o guaste. Tale attività si effettua con apposite macchine rotative sequenziali provviste di tamburo rotante forato che permette la caduta delle olive libere da impurità verso l'uscita. Durante lo spostamento delle stesse olive avviene anche lo strappaggio di ultime olive ancorate al ramoscello madre; le macchine lavatrici sono dotate di griglie che consentono di effettuare, contemporaneamente al lavaggio, la mondata (Cappelli & Vannucchi, 2009);
- molitura o frangitura: con questa operazione si rompe la struttura cellulare delle olive, in modo da fare uscire l'olio in esse contenuto, e si frantuma il nocciolo, ottenendo così, con la pasta di olive, un'emulsione costituita da olio e acqua; le piccole goccioline di olio, riducendosi ulteriormente di diametro, richiedono tempi più lunghi di gramolatura della pasta di olive per potersi unire fra di loro fino al raggiungimento delle dimensioni che ne permettano l'estrazione dalla pasta ($> 0,30 \mu\text{m}$). Questo può creare problemi nella lavorazione delle olive scarse in polifenoli, in relazione ad un loro maggiore consumo. Il sistema tradizionale a molazze è sicuramente poco violento (per circa 3 quintali di

olive, un tempo tra 15 e 20 minuti) ed è un mezzo di frangitura che già opera contemporaneamente una specie di gramolatura della pasta, infatti spesso tale fase viene evitata; si basa sullo scorrimento di 4 ruote cilindriche di granito capaci di effettuare la rottura non completa delle olive. I frangitori o molini, invece, adottati dagli impianti continui di lavorazione delle olive (25-30 °C), sono relativamente molto violenti e inducono tempi lunghi di gramolatura per ottenere una resa in olio sufficiente. Inoltre, lo sminuzzamento e il forte calore prodotto dal molino provocano un incremento delle velocità delle reazioni enzimatiche, tra l'altro attive per i tempi più lunghi di gramolatura;

- gramolatura: consiste nel mescolamento della pasta di olive e determina una maggiore lacerazione delle cellule e la formazione di gocce di olio più grosse, separate dall'acqua di vegetazione e dalle parti solide. Viene eseguita con un dispositivo in acciaio inossidabile costituito da una vasca semicilindrica con albero orizzontale, bracci rotanti e lame di diverse forme e dimensioni, con un meccanismo capace di sprigionare acqua calda; la temperatura di solito è compresa tra i 28 e i 30 °C per circa 40-45 minuti (Clodevo, 2012).

Con questa operazione si attua un'inversione di fase (fase di coalescenza), passando da un'emulsione olio in acqua a una acqua in olio. Attraverso una serie di reazioni enzimatiche ("ciclo della lipossigenasi") che partono dalla produzione di particolari idroperossidi, il contatto olio-pasta incrementa la formazione di diversi componenti volatili, in proporzioni quantitative particolari (Servili et al., 1994). Tuttavia, i meccanismi perossidativi iniziali sono in grado di promuovere anche una serie di trasformazioni chimiche collaterali di tipo ossidativo, tra cui la degradazione dei polifenoli più labili. Il contenuto in polifenoli di un olio consente di limitare l'ossidazione chimica durante la conservazione, consumando il poco o molto ossigeno presente, preservando gli acidi grassi insaturi e quindi le caratteristiche organolettiche dell'olio. Quando i polifenoli sono pochi, l'ossigeno presente nella confezione può intaccare anche gli acidi grassi insaturi e produrre degradazione organolettica fino ad arrivare alla rancidità (Servili et al., 2003);

- estrazione e filtrazione: la separazione dell'olio dalla pasta (mosto) viene attuata attraverso un sistema continuo (centrifugazione e percolazione) oppure

attraverso un sistema discontinuo (pressione). In particolare, nell'estrattore centrifugo (decanter orizzontale) a tre fasi, viene fatta passare la pasta di olive gramolata e addizionata di acqua, ottenendo un prodotto formato da tre fasi, olio-acqua-sansa. Nell'estrattore centrifugo a due fasi, la pasta non viene addizionata di acqua, ottenendo quindi due soli prodotti finali, olio e sansa; in entrambi i casi, le fasi vengono separate in funzione del loro peso specifico. Il metodo che si basa sulla percolazione sfrutta la differente tensione interfacciale olio/metallo e acqua/metallo, facendo aderire l'olio alle pareti metalliche dell'apparecchio, che poi sgocciola via. Nell'estrazione per pressione, vengono utilizzate delle presse idrauliche dotati di fiscoli (Salvador et al., 2008). La maggior parte degli impianti di lavorazione delle olive, produce oli "velati" o leggermente torbidi con sospensioni solide, che vengono successivamente filtrati per ottenere oli di oliva "brillanti" (Lercker et al., 1999).

Olive in ottime condizioni di maturazione e di raccolta daranno rese maggiori se si protrae l'attesa prima della lavorazione, a causa del parziale essiccamento che diminuisce il peso totale da lavorare; quindi non saranno dovute ad un reale aumento della quantità d'olio. Per motivazioni analoghe se si lasciano maturare eccessivamente le olive sull'albero, la resa in olio - ma non la quantità assoluta - aumenta. In entrambi i casi, però, la qualità dell'olio che si ottiene peggiora; la frangitura e la gramolatura consentono di aumentare la resa. Dunque, la resa in olio dipende da diversi fattori che possono riguardare l'intero ciclo produttivo.

1.6 Parametri di qualità

Il concetto di qualità, ampio e complesso, definisce l'insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare determinate esigenze, espresse o implicite del consumatore. In prima approssimazione, i principali aspetti sono la qualità igienica, merceologica, nutrizionale, sensoriale, edonistica e socio-culturale.

I parametri di qualità per l'attribuzione della categoria merceologica ad un olio extravergine di oliva sono dettati dal Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche (Reg. CE 1989/03).

La misura dell'acidità è utilizzata per la valutazione della qualità dell'olio e per la sua classificazione merceologica. Questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo stato di degrado dell'oliva prima dell'estrazione; i trigliceridi dell'olio si degradano a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto se questo ha subito lesioni cellulari. La lipasi, in presenza di acqua, idrolizza il legame esistente tra il residuo di acido grasso ed il residuo di glicerolo, producendo acidi grassi liberi (non esterificati) che determinano l'acidità libera dell'olio.

La determinazione del numero di perossidi misura lo stato di ossidazione primaria degli acidi grassi. Il grado di insaturazione favorisce l'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno dell'aria o per azione delle lipossigenasi con formazione di idroperossidi (mediante un meccanismo radicalico). In particolare, l'acido oleico subisce la rottura omolitica del legame C-H sul carbonio in posizione 8 o 11 con formazione di due radicali allilici: la reazione di questi con l'ossigeno e la successiva estrazione di un atomo di idrogeno da un altro lipide porta alla formazione degli idroperossidi. Questi ultimi sono molecole decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, quali aldeidi e chetoni, responsabili del forte impatto sensoriale. Possono, infatti, essere altobollenti, quindi non volatili, oppure bassobollenti, e quindi volatili e responsabili dell'odore di rancido. Nella fase di decomposizione degli idroperossidi si formano composti tossici e/o maleodoranti che danneggiano sia la qualità nutrizionale che organolettica dell'olio, definendo l'irrancidimento. Il numero di molecole che si originano nella fase di decomposizione degli idroperossidi è molto alto. In relazione al numero di doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi, si possono formare diverse specie di idroperossidi. A norma di legge il limite relativo al numero di perossidi in un olio extravergine d'oliva è 20, al di sopra del quale l'olio è considerato lampante quindi di bassa qualità.

Il doppio legame va incontro a modifiche anche quando l'olio è sottoposto a trattamenti di rettificazione, con formazione di doppi e tripli legami coniugati. Sia questi ultimi che i prodotti secondari di ossidazione comportano una variazione dell'intensità di assorbimento nella regione dell'UV. In tal caso, i processi ossidativi possono essere rivelati attraverso la misura delle costanti spettrofotometriche: K₂₃₂ il valore dell'estinzione specifica a 232 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il

massimo d'assorbimento dei dieni coniugati; K270, il valore dell'estinzione specifica 270 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo d'assorbimento dei trieni coniugati e il ΔK che corrisponde all'andamento della curva di assorbimento nell'intervallo 264-272 nm, mettendo in luce la presenza dei composti di ossidazione secondari. A norma di legge, i valori massimi per l'olio extravergine sono: $K_{232} < 2.50$; $K_{270} < 0.22$ e $\Delta K < 0.01$.

Molto importante risulta essere la valutazione del contenuto di alchil esteri che è stata adottata come parametro di qualità per gli oli extravergine di oliva dal Reg (CE) 61/2011, dopo che il Consiglio Oleicolo Internazionale aveva condotto una sperimentazione per standardizzare e adottare il metodo. Gli esteri alchilici di acidi grassi (FAAE_s) sono definiti dalla somma di esteri metilici di acidi grassi (FAME_s) ed esteri etilici di acidi grassi (FAEE_s). La formazione, durante la conservazione, di esteri etilici e metilici è fortemente legata alla concentrazione di alcoli liberi, quindi la presenza degli esteri riflette quella degli alcoli presenti nell'olio. In particolare, l'alcol etilico ha origine nelle olive, nelle paste e dunque nell'olio soltanto da processi fermentativi, così gli esteri etilici si confermano i marcatori più importanti per determinare la qualità degli oli extravergini. In oli invecchiati, con il processo di deterioramento, i trigliceridi si idrolizzano formando acidi grassi liberi, che sono i substrati per la sintesi di alchil esteri. La produzione di esteri etilici degli acidi grassi è fortemente legata a fattori ambientali (Di Giacinto et al., 2014). I processi di fermentazione si verificano quando le olive sono di scarsa qualità (ad esempio, troppo mature, danneggiate, conservate nelle condizioni sbagliate). Questi processi producono sia alcool metilico (metanolo) e alcool etilico (etanolo), che produce esteri alchilici tramite reazioni di transesterificazione. In particolare, aumentano gli esteri etilici dell'acido oleico e palmitico, rispetto ai metil esteri dei rispettivi acidi grassi. Le olive troppo mature con danno cellulare rilasciano metanolo attraverso la rottura delle pectine, che sono polimeri nelle strutture cellulari delle olive, mediante l'enzima pectina-metilesterasi. (Mariani & Bellan, 2011; Biedermann et al., 2008; Valli et al., 2013). Dunque, poiché l'etanolo può essere prodotto solo dalla fermentazione, il regolamento della Commissione europea 1348/2013, che ha modificato il regolamento della Commissione europea 2568/91, ha sostituito "alchilesteri" con "esteri di etile", con il limite non superiore ai 30 mg/kg.

Uno studio, attraverso l'analisi condotta su oli difettati, ha osservato che gli esteri etilici sono correlati ai processi di fermentazione ma sono anche responsabili dei difetti organolettici; nonostante ciò la loro determinazione non può sostituire l'analisi organolettica (Di Serio et al., 2017).

Accanto agli indici di qualità ufficiali, che consentono di attribuire ad un olio la categoria merceologica, è possibile ricorrere a parametri analitici non ufficiali allo scopo di caratterizzare in maniera più completa un olio dal punto di vista qualitativo. Tra questi: contenuto e composizione di tocoferoli, ad azione antiossidante e vitaminica; contenuto e composizione di composti fenolici, che influenzano il profilo organolettico, la stabilità all'ossidazione, la qualità nutrizionale dell'olio; contenuto di pigmenti, responsabili del colore dell'olio; steroli, utili per accertare sofisticazioni.

Capitolo II

Fenoli

2.1 Definizione e funzioni delle sostanze fenoliche

I composti fenolici sono dei metaboliti secondari di tutto il regno vegetale e si inseriscono nella dieta umana attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale, quali frutta e verdura. Le sostanze fenoliche rappresentano una famiglia numerosa (circa 10000 molecole) ed eterogenea, accumulate da una caratteristica chimica: presentano come unità di base un gruppo fenolico, cioè un anello fenilico a cui sono legati uno o più gruppi ossidrilici. La classe dei composti fenolici include sia composti semplici, monomeri, sia composti polimerizzati. I gruppi ossidrilici influiscono notevolmente sulle proprietà chimico-fisiche dei composti fenolici, in quanto aumentano il carattere idrofilico e conferiscono loro una natura debolmente acida, dovuta alla delocalizzazione per risonanza dell'anione coniugato, con l'effetto di stabilizzare la struttura. L'acidità dei fenoli varia inoltre in funzione dei sostituenti e della loro posizione. I fenoli, per la loro natura anfipatica, sono solo moderatamente solubili in acqua, mentre si sciolgono completamente nelle soluzioni acquose di idrossido di sodio perché si trasformano in sali (fenossido di sodio) grazie alla loro acidità e possono essere solubili in acqua se si trovano nella forma glucosidica. I composti fenolici con pochi gruppi ossidrilici sono solubili in metanolo, etanolo, cloroformio, etere. I fenoli aventi catene alifatiche laterali sono solubili in solventi poco polari. Inoltre, i gruppi ossidrilici possono formare legami idrogeno intramolecolari o con altre molecole quali proteine ed alcaloidi, dando luogo ad aggregati polimolecolari. Per questo motivo, i punti di ebollizione e di fusione sono molto più alti di quelli degli idrocarburi aventi lo stesso peso molecolare.

Durante la conservazione degli alimenti, i composti fenolici più semplici tendono a polimerizzare formando polimeri condensati ad elevato peso molecolare. La maggior parte dei composti fenolici in natura e nei prodotti alimentari si trova sotto forma di glicosidi, cioè coniugata ad un residuo di zucchero. Gli agliconi, ovvero le molecole prive del residuo di zucchero, sono invece diffusi soprattutto nei tessuti legnosi e nei

semi. Nell'olio d'oliva i composti fenolici conferiscono il gusto tipico e l'aroma amaro e fruttato. Questi composti si oppongono all'autossidazione, contribuendo alla stabilità dell'olio (Conte et al., 2004).

Per quanto concerne il ruolo nell'organismo umano, alcune sostanze fenoliche sono *radical scavenger* ed esplicano un'azione contro le principali patologie legate allo stress ossidativo (tumori, malattie cardiovascolari, osteoporosi, diabete, malattie neurodegenerative); inoltre, possono ritardare l'aterosclerosi (Perez et al., 2005).

Nelle piante, i composti fenolici possono avere la funzione di pigmenti floreali a basso peso molecolare, di antibiotici, di schermo nei confronti delle radiazioni UV, di repellenti per gli insetti e di segnali nelle interazioni pianta-microrganismi. Le piante in cui il metabolismo secondario è particolarmente sviluppato sono tendenzialmente più ricche in sostanze antiossidanti.

Il contenuto fenolico nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle condizioni pedoclimatiche (Lattanzio & Ruggiero, 2003). I composti fenolici si accumulano in genere, in tutti gli organi della pianta (radici, steli, foglie, fiori e frutti): tale accumulo si realizza in maniera specifica nei vari tessuti secondo i vari generi di pianta, con un maggiore accumulo dei fenoli negli strati epidermici e subepidermici dei vari tessuti. Ad eccezione della lignina, si accumulano preferenzialmente negli organi aerei della pianta piuttosto che nelle radici. Questa localizzazione preferenziale viene messa in relazione con l'effetto induttore della luce sul metabolismo fenolico, nonché con il ruolo protettivo esercitato dai composti fenolici.

2.2 I composti fenolici nella drupa e nell'olio

Le qualità nutrizionali dell'olio di oliva vergine (VOO) sono state attribuite principalmente all'elevato contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA), principalmente acido oleico, e dei suoi componenti minori in particolare i composti fenolici (Oueslati et al., 2018).

I composti fenolici sono sintetizzati originariamente dalla pianta come difesa nei confronti di molti agenti patogeni (Bianco et al., 1999), ma molti dei fenoli presenti nell'olio vergine di oliva si formano durante il processo di estrazione a partire da quelli

già presenti nella drupa. Durante la frangitura, gramolatura ed estrazione i composti fenolici della drupa vengono biotrasformati (Pannelli et al., 1991; Servili et al., 1996). I composti bioattivi dell'oliva e dell'olio di oliva possono essere suddivisi in due categorie: i composti bioattivi non polari presenti nella frazione insaponificabile dell'olio (come lo squalene, tocoferoli, steroli e composti triterpenici) e composti fenolici polari definiti "polifenoli dell'olio di oliva" che sono contenuti nella frazione ottenuta dai processi estrattivi. Il termine "polifenoli" non è accurato perché pochissimi composti della frazione polare sono effettivamente polifenoli. I polifenoli contengono due anelli fenilici uniti da una catena a tre atomi di carbonio lineare; in accordo con questa definizione, solo i flavonoidi come apigenina e luteolina sono polifenoli. Questi composti, tuttavia, sono presenti in piccole tracce nell'olio di oliva. Il resto dei fenoli polari (idrossitirosolo, tirosolo, forme dialdeidiche di acido decarbossimetil elenolico legato a idrossitirosolo e tirosolo, glicosidi e agliconi, lignani e acidi fenolici) non sono polifenoli. È meglio caratterizzarli come fenoli polari dell'olio di oliva per enfatizzare la differenza da altre classi di fenoli, tocoferoli, che sono fenoli non polari (Boskow, 2015).

I fenoli sono presenti a concentrazioni molto basse nella drupa e hanno diversi ruoli come agenti antimicrobici e conferiscono proprietà organolettiche ed aromatiche tipiche al frutto.

I composti fenolici dell'oliva si trovano in forma coniugata (spesso con degli zuccheri, come il glucosio) per aumentare la tossicità delle molecole nei confronti dei microrganismi e per favorire la solubilizzazione, lo stoccaggio in alcuni compartimenti cellulari e il trasporto delle stesse alle cellule.

I fenoli delle olive si dividono in fenoli lipofili, come i cresoli, e i fenoli idrofili tra cui gli acidi fenolici, i flavonoidi, i secoiridoidi e gli alcoli fenolici. Gli acidi fenolici nelle olive sono gli acidi idrossibenzoici come l'acido vanillico, siringico e gallico; acidi idrossicinnamici come l'acido caffeico, ferulico e sinapico e i flavonoidi come la cianidina. Tra i derivati dell'acido idrossicinnamico c'è il verbascoside. Un secoiridoide, la nuzenide, è presente solo nei semi. Agli alcoli fenolici appartengono idrossitirosolo (3,4-DHPEA) e il tirosolo (*p*-idrossifeniletanolo o *p*-HPEA) che sono presenti in maggior quantità (Ghanbari et al., 2012).

Le attività biologiche dell'olio d'oliva vergine (antiossidante, antinfiammatoria, anticancro, chemoprotettiva) sono state associate alla presenza di potenti antiossidanti, quali i fenoli idrofilici. Questi composti fenolici idrofilici rappresentano un gruppo di metaboliti secondari che non sono generalmente presenti in altri oli (Servili et al., 2011). L'olio vergine di oliva contiene principalmente acidi fenolici, fenoli semplici (tirosolo e idrossitirosolo), derivati di alcoli fenolici (tirosil acetato e idrossitirosil acetato), secoiridoidi (i glicosidi oleuropeina e ligstroside e i corrispondenti agliconi), forme mono- e di-aldeidiche dell'acido decarbossimetil elenolico, legati a idrossitirosolo e tirosolo, lignani, tra cui acetosipinoresinolo e pinoresinolo, maggiormente presenti nel seme del frutto e trasferiti nell'olio durante il processo estrattivo, flavonoidi (apigenina e luteolina) e idrossi-isocromani.

Il composto fenolico maggiormente presente nell'olio è la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenoico che deriva principalmente dall'oleuropeina aglicone e dal ligostride aglicone. Nell'olio d'oliva, rispetto al frutto, aumentano la concentrazione alcoli fenolici quali tirosolo (*p*-HPEA) e idrossitirosolo (3,4-DHPEA) per effetto di processi di idrolisi dei secoiridoidi che maggiormente partecipano a questi rispetto alle forme aldeidiche (meno polari), quali 3,4-DHPEA-EDA (3,4-diidrossifenil-etanolo legato alla forma dialdeidica dell'acido elenolico), il *p*-HPEA-EDA (*p*-idrossifeniletanolo legato alla forma dialdeidica dell'acido elenolico) e il 3,4-DHPEA-EA (3,4-diidrossifenil-etanolo legato all'acido elenolico). Nella produzione dell'olio d'oliva entrano in azione delle β -glucosidasi che idrolizzano il legame glicosidico tra il residuo di glucosio e quello dell'acido elenoico (EA) dei secoiridoidi, quali oleuropeina e ligstroside, dando vita alla serie dei corrispondenti agliconi; le esterasi causano, invece, la scissione di questi ultimi in acido elenolico e in idrossitirosolo o tirosolo (*Figura 3*).

Mentre i flavonoidi, gli alcoli e gli acidi fenolici si possono ritrovare in diverse famiglie botaniche, i secoiridoidi sono esclusivi delle specie appartenenti alla famiglia delle *Oleaceae* (Bendini et al., 2007; Kanakis et al., 2013).

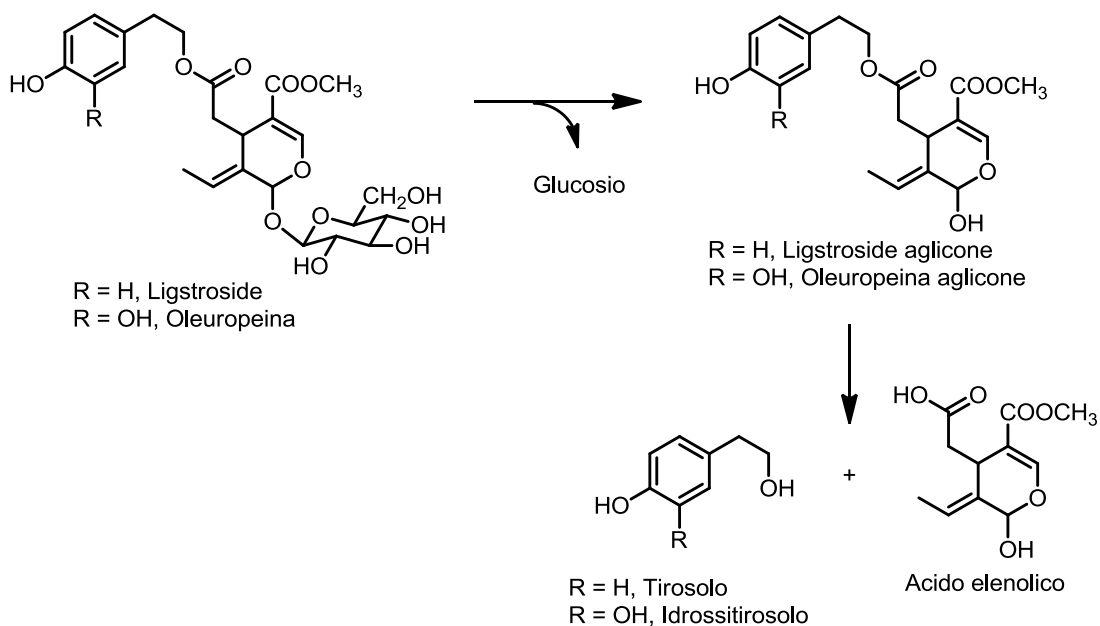


Figura 3. Formazione di tirosolo e idrossitirosolo dai secoiridoidi

2.3 Fattori che influiscono sul contenuto fenolico

Durante la lavorazione delle olive per la produzione dell'olio d'oliva vergine, i composti fenolici di partenza presenti nelle olive mature in parte rimangono tali, in parte si trasformano ed in parte finiscono nei sottoprodotti della lavorazione.

La produzione di composti fenolici da parte della pianta è influenzata da diversi fattori esterni che possono dipendere da lesioni della pianta o del frutto, esposizioni alle radiazioni UV. Inoltre, il contenuto fenolico dell'olio dipende dalla cultivar, dallo stadio di maturazione del frutto, dalla stagione, dalle condizioni pedoclimatiche, oltre che dal processo produttivo (sistema di estrazione, condizioni di lavorazione e di stoccaggio).

Alcuni composti fenolici, inclusi idrossitirosolo, ligstroside aglicone, oleuropeina aglicone, acetossi-pinoresinolo e acido elenolico mostrano un aumento delle loro concentrazioni nelle prime fasi della raccolta delle olive, seguito da una riduzione nelle fasi più avanzate di maturità (Ben et al., 2009). Di conseguenza, i frutti raccolti precocemente producono olio d'oliva ad alto contenuto di polifenoli. Tuttavia, questi composti sono stati anche associati alle caratteristiche organolettiche, e la raccolta

troppo presto produce oli d'oliva che a volte hanno una qualità sensoriale inaccettabile a causa di eccessive concentrazioni di polifenoli (Beltran et al., 2005).

La molitura delle olive è uno dei passaggi più importanti che influiscono sul profilo fenolico (Inarejos et al., 2011). Gli agliconi di oleuropeina e ligstroside e le corrispondenti forme decarbossimetilate vengono prodotti durante la frantumazione della drupa, a seguito di idrolisi e perdita di gruppi carbossimetile dell'oleuropeina, dimetil-oleuropeina e ligstroside. Uno studio comparativo condotto con entrambi i sistemi di frangitura (continuo e discontinuo), macina a pietra tradizionale discontinua e frantoio a martello continuo, ha mostrato che i composti fenolici erano meglio conservati nell'olio d'oliva ottenuto con il sistema continuo (Preziuso et al., 2010).

L'aumento della temperatura (da 15, 30, 37 a 42 °C) e dei tempi (da 20, 45 a 60 minuti) di macinazione migliorano il contenuto di fenoli e la stabilità ossidativa dell'olio extravergine di oliva. D'altra parte, un tempo più lungo di 60 minuti apparentemente influenza negativamente il contenuto di fenoli (Stefanoudaki et al., 2011).

Tuttavia, in un altro studio, il gruppo dei secoiridoidi ha mostrato un incremento quasi lineare delle concentrazioni a seguito dell'aumento della temperatura fino a 30 °C, seguito da una corrispondente diminuzione marcata con temperature maggiori (33 e 36 °C) (Parenti et al., 2008). Le lipossigenasi che catalizzano la formazione di idroperossidi potrebbero anche essere responsabili di un'ossidazione indiretta dei secoiridoidi. Queste attività enzimatiche spiegano anche l'aumento lineare della concentrazione di tirosolo ottenuto da degradazione di composti fenolici complessi (Clodoveo, 2012).

Il modo migliore per ridurre la perdita di composti fenolici durante la centrifugazione (due e tre fasi) è stabilito dall'equilibrio tra il volume di acqua aggiunto e una buona separazione delle fasi, in quanto l'aggiunta di acqua comporta una perdita di composti fenolici idrofilici (Masella et al., 2009). Il contenuto fenolico totale viene ridotto mediante filtrazione. Questo comportamento può essere spiegato dalla variazione del contenuto di acqua dell'olio extravergine di oliva. In realtà, si presume che la maggior parte dei composti fenolici, avendo caratteristiche anfifiliche, si trovano intorno a goccioline d'acqua nell'olio d'oliva. Il processo di filtrazione, dunque, rimuove l'umidità e il contenuto di acqua ma viene ridotta una percentuale della componente fenolica (Gomez-Caravaca et al., 2007). La concentrazione dei fenoli liberi, come

l'idrossitirosolo (Hyt) e il tirosolo (Ty), cambia durante lo stoccaggio: aumentano le loro concentrazioni durante lo stoccaggio e in oli non filtrati rispetto a quelli filtrati. In questo modo, la filtrazione riduce la velocità di idrolisi degli agliconi secoiridoidi (Brenes et al., 2001). La filtrazione, come step finale, è particolarmente importante per la qualità dell'olio extravergine di oliva e l'accettazione del consumatore ma bisogna tener conto della perdita di composti fondamentali e, dunque, di validi sistemi di filtrazione.

L'acidità libera influenza la suscettibilità all'ossidazione e contribuisce anche alla riduzione della durata di conservazione di EVOO. I solidi sospesi possono anche svolgere un ruolo stabilizzante per le degradazioni idrolitiche. Alcuni autori hanno suggerito reazioni tra solidi sospesi e acidi grassi liberi con produzione di un precipitato, uno stato in cui non sono in grado di ossidarsi. Pertanto, la filtrazione per rimuovere i solidi sospesi produce una riduzione della durata di conservazione dell'olio extravergine di oliva (Frega et al., 1999).

In uno studio più recente, sono stati conservati campioni di olio extravergine di oliva in diversi contenitori commerciali (vetro, polietilene tereftalato e Tetra-Brik) a temperatura ambiente (20 °C) e temperatura refrigerata (4 °C). Dopo 9 mesi di conservazione, la più piccola diminuzione del contenuto fenolico è stata registrata negli oli in Tetra-Brik, a causa di un piccolo processo di degradazione per il passaggio di luce e ossigeno (Samaniego-Sanchez et al., 2012). Il contenuto fenolico potrebbe dipendere dalle condizioni di conservazione incluso il tempo, temperatura, disponibilità di ossigeno e containers industriali o commerciali.

2.4 Tirosolo e i suoi derivati

Il tirosolo [2-(4-idrossifenil) etanolo] è un noto antiossidante monofenolico presente in grande quantità nell'olio e nelle acque dei reflui oleari (Fki et al., 2005).

È stato stabilito che il tirosolo ha un'attività antiossidante inferiore all'idrossitirosolo, a causa dell'assenza del gruppo *o*-difenolico nella sua struttura chimica (Mateos et al., 2003). Tuttavia, recenti studi suggeriscono che il tirosolo eserciti un potente effetto protettivo contro i danni ossidativi nei sistemi cellulari e migliora i sistemi di difesa antiossidante intracellulare (Di Benedetto et al., 2007). La sua efficacia è stata dimostrata anche nella prevenzione della modificazione della porzione apoproteica

(Caruso et al., 1999), nell'inibizione della 5-lipoossigenasi (De la Puerta et al., 1999) e nella protezione delle cellule Caco-2 della mucosa intestinale dagli effetti citostatici e citotossici delle LDL ossidate (Giovannini et al., 1999). Inoltre, si è dimostrato in grado di inibire l'aggregazione piastrinica indotta da ADP (Plotnikov et al., 2007), di ridurre significativamente l'attività aritmica che si verifica durante l'ischemia miocardica e la riperfusione (Chernyshova et al., 2007) e di possedere significative attività protettive contro la neurotossicità indotta da glutammato in colture primarie di cellule corticali di ratto e lesioni indotte da 5-S-cisteinil-dopamina *in vitro* (Vauzour et al., 2010).

Di recente interesse sono la sintesi e lo studio delle proprietà dei derivati lipofili del tirosolo. Uno studio ha esaminato come la sintesi degli esteri del tirosolo con acidi grassi, valutata dopo settantadue ore, diminuiva per esteri insaturi (Biedermann et al., 2008); la velocità di reazione di transesterificazione era più alta di quella di esterificazione, questo era attribuito al fatto che durante la reazione di esterificazione si produce acqua ed essa può idrolizzare l'estere formato. Dunque, l'esterificazione è leggermente più veloce della transesterificazione, ma la concentrazione più alta di acidi esterificati pone la transesterificazione come via principale di formazione degli esteri con alcoli. Derivati a catena corta, media e lunga del tirosolo sono stati sintetizzati mediante reazioni di transesterificazione lipasi-catalizzate (*Figura 4*) (Aissa et al., 2007).

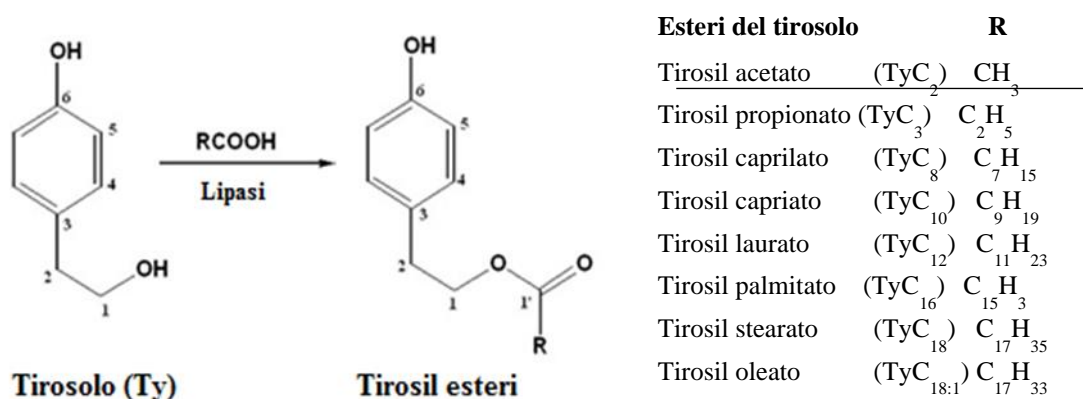


Figura 4. Esempio di sintesi di esteri tirosilici

Alcuni derivati esterificati (ad esempio l'estere acetico) sono naturalmente presenti nell'oliva e nell'olio. I derivati lipofili del tirosolo e, in particolare, gli esteri recanti catene aciliche, mostrano una migliore affinità con i costituenti della membrana lipofilica e quindi potrebbero essere importanti per applicazioni in campo farmaceutico e cosmetico (Fragopoulou et al., 2007). Inoltre, tirosil e idrossitirosil esteri sono rilevanti tensioattivi (Lucas et al., 2010).

Uno studio (Mateos et al., 2008) ha misurato la capacità riducente degli antiossidanti nei confronti degli ioni ferro, dimostrando una minore attività degli esteri tirosilici (acetato, butirrato, laurato, palmitato, stearato e oleato) rispetto al corrispondente tirosolo.

La valutazione dell'attività antiossidante ha dimostrato che i tirosil esteri sono meno attivi del tirosolo libero a differenza dell'idrossitirosolo che è meno attivo dei suoi esteri (Mateos et al., 2001). In particolare, tra gli esteri tirosilici, solo tirosil butirrato ha mostrato una capacità di *radical scavenger* elevata. È stato valutato anche l'effetto protettivo del tirosolo e dei suoi esteri sulla scissione di DNA derivata da radicali ossidrilici e perossidici, dimostrando un più alto effetto inibitorio per gli esteri caprilato e laurato (Sun et al., 2018).

In alcuni studi, è stata valutata l'attività antimicrobica del tirosolo e dei suoi esteri nei confronti di diverse specie patogene (*S. aureus*, *S. xylosus*, *B. cereus*). Tra tutti gli esteri testati, solo i tirosil derivati a catena media (TyC8, TyC10 e TyC12) hanno mostrato un'attività antibatterica, in particolare TyC10 (Aissa et al., 2012).

In studi recenti, è stata esaminata la relazione tra la lunghezza della catena lipidica e l'attività antiossidante degli esteri del tirosolo, riportando come non esista una correlazione lineare (Mateos et al., 2008; Tofani et al., 2010). Questa osservazione è in linea con quanto riportato per l'attività antiossidante di serie omologhe di acidi fenolici, che aumenta all'aumentare della catena alchilica, con una soglia per una catena media (fenomeno *cut-off*), oltre la quale l'ulteriore estensione della catena porta ad una drastica diminuzione di questa attività; dunque, se la catena alifatica è troppo corta o troppo lunga, l'attività antiossidante risultante non sarà ottimale (Laguerre et al., 2013). Inoltre, è stato verificato come per gli esteri del tirosolo (tirosil stearato, tirosil oleato e tirosil linoleato) che contengono 18 atomi di carbonio, l'attività

antiossidante aumenta leggermente con il grado di insaturazione (Wang & Shahidi, 2014). Altri studi hanno mostrato come diversi tirosil esteri con una catena di 18 atomi di carbonio, con grado di insaturazione crescente, possono essere usati come potenziali antiossidanti nei prodotti a base di lipidi; l'aumento del grado di insaturazione non è risultato però direttamente proporzionale alla sua efficienza antiossidante (Pande & Akoh, 2016).

Molto interessante, è stato uno studio che ha valutato il potere antiossidante di un lipofenolo ottenuto dalla reazione tra acido oleico e tirosolo, ovvero il tirosil oleato, in un sistema alimentare reale a base di lipidi. Un tipico prodotto italiano, i tarallini, sono stati formulati aggiungendo differenti concentrazioni di tirosil oleato ed è stato monitorato il processo ossidativo durante la conservazione; da questo studio è risultato come in assenza del lipofenolo l'ossidazione si completa prima, mentre concentrazioni crescenti di tirosil oleato, aumentano la durata di conservazione del prodotto e dunque la stabilità ossidativa, con aumento del valore di perossidi in un intervallo di tempo più lungo. Pertanto, la durata di conservazione dei prodotti da forno è fortemente influenzata dal tipo di grasso presente nella formulazione (Marzocchi & Caboni, 2018).

Capitolo III

Parte sperimentale: Materiali e Metodi

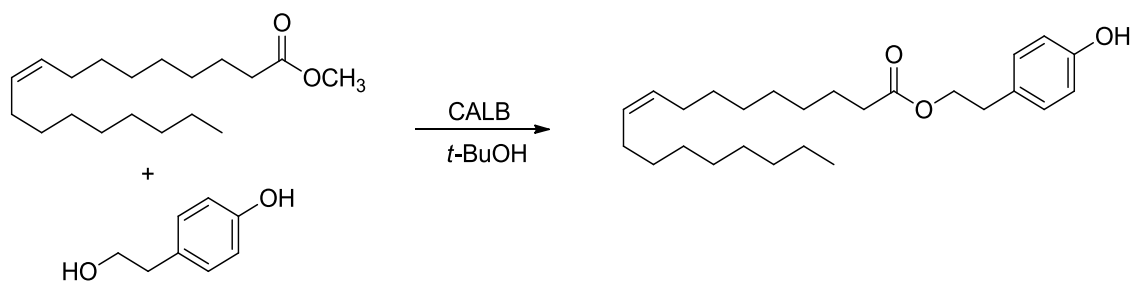
3.1 Campionamento oli

I campioni analizzati per il lavoro di tesi sono oli extravergine di oliva dell'*Olea europea L.* appartenenti a diverse cultivar: Carolea, Dolce di Rossano e Nocellara del Belice prodotti durante la campagna olearia 2017/2018; Carolea, Dolce di Rossano e Penullara della campagna olearia 2018/2019. Inoltre, sono stati analizzati campioni di oli difettati rancido, avvinato e riscaldamento. Gli oli sono stati conservati in bottiglie di vetro scuro, al riparo dalla luce e da fonti di calore. Campioni di olio extravergine appartenente alla cultivar Carolea della campagna olearia 2018/2019 sono stati sottoposti a trattamento termico, così da accelerare il processo di deterioramento dell'olio e dunque denominati: fritto 1h, fritto 2h e fritto 3h.

Da tutti i campioni sopra citati, sono stati estratti i composti fenolici e determinati i valori di acidità, numero di perossidi e misure spettrofotometriche (K232 e K270).

3.2 Sintesi del tirosil oleato

La sintesi del tirosil oleato (*Figura 5*) è stata effettuata secondo quanto già riportato in letteratura (Plastina et al., 2019). In particolare, il tirosolo (1.6 mmol) è stato posto a reagire con il metil estere dell'acido oleico (3.2 mmol) (entrambi acquisiti da Sigma-Aldrich, Milano, Italia), in presenza di Novozym[®]435 (Novozymes), costituito da lipasi B da *Candida Antarctica* immobilizzata (CALB, 200 mg) come catalizzatore, in un solvente come il *t*-butanolo (2 mL) in un agitatore orbitalico a 50 °C. Dopo 24 ore, l'enzima è stato filtrato, il solvente è stato evaporato sotto pressione ridotta e il prodotto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (SiO₂, utilizzando una miscela etere di petrolio-acetone come eluente, con un rapporto 95:5). L'identificazione del tirosil oleato è stata effettuata per confronto con i dati spettroscopici disponibili in letteratura e la purezza è stata determinata mediante HPLC (>98%).



CALB: Lipasi B da *Candida Antarctica*

Figura 5. Sintesi del tirosil oleato

3.3 *Trattamento termico dei campioni di olio*

Tre pyrex contenenti in totale 40 g di olio extravergine di oliva appartenente alla cultivar Carolea della campagna olearia 2018/2019, sono state immerse in un bagno ad olio di vaselina e sottoposte a riscaldamento a $180 \pm 2^\circ\text{C}$. Aliquote di circa 13 g sono state rimosse durante la frittura ad intervalli di tempo predefiniti (60, 120, 180 minuti) e alla fine del trattamento termico sono state conservate accuratamente a -20°C (Blasi et al., 2018).

3.4 *Estrazione dei composti fenolici dall'olio*

Per l'estrazione dei composti fenolici è stato utilizzato il metodo COI (COI, "Consiglio Oleicolo Internazionale"). In particolare, ogni campione di olio (2 g) è stato trattato con 10 mL di una soluzione metanolo/acqua (80/20 v/v), la miscela ottenuta è stata agitata mediante l'uso del Vortex per 1 minuto, successivamente sottoposta ad un bagno ad ultrasuoni per 15 minuti e centrifugata per 25 minuti a 8000 rpm ad una temperatura di 5°C . I surnatanti sono stati filtrati utilizzando un filtro (membrana polimerica) di $0.45\ \mu\text{m}$ (CA-membrane sterile, EXP 2003-07), poi opportunamente diluiti per l'analisi HPLC-MS/MS.

3.5 Analisi HPLC-MS/MS

La determinazione del tirosil oleato nelle matrici investigate è stata condotta presso il Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura di Rende (CREA-OFA) del Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), secondo il metodo precedentemente messo a punto (Benincasa et al., in preparazione). Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema HPLC (Agilent Technologies 1200 series) munito di una colonna cromatografica Discovery C18 [150 mm di lunghezza e 4.6 mm di diametro interno e 3 μm di granulometria (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Il gradiente di eluizione binario, composto da una soluzione acquosa allo 0,1% di acido formico (A) e metanolo (B) ad un flusso di 400 $\mu\text{L}/\text{min}$, è stato programmato in modo da incrementare in 10 minuti la percentuale di B da 30 a 100% e tenuto per 5 minuti per poi risalire alle composizioni di partenza (70% A e 30% B) in 10 minuti.

Le analisi MS/MS sono state condotte per mezzo di uno spettrometro di massa modello MSD API 4000 Q-Trap (Sciex Applied Biosystem) in modalità negativa utilizzando il monitoraggio delle reazioni multiple (MRM), in cui uno ione di una particolare massa viene selezionato nel primo quadrupolo, frammentato nel secondo e i prodotti di reazione rilevati nel terzo. Lo spettro di frammentazione del tirosil oleato è stato registrato in modalità di acquisizione Product Ion Scan. I parametri strumentali utilizzati sono: temperatura sorgente 400 $^{\circ}\text{C}$; voltaggio ion spray -4500 V; curtain gas 20 psi; potenziale di entrata -11 eV; potenziale di frammentazione -125 eV; energia di collisione -20 eV; potenziale di collisione in uscita -16 eV; gas (1) 35 psi; gas (2) 25 psi; dwell time 500 ms. Per l'analisi quantitativa dei campioni, è stato utilizzato il monitoraggio delle reazioni multiple (MRM) in cui lo ione molecolare del tirosil oleato $(\text{M-H})^-$, selezionato nel primo quadrupolo, è stato frammentato nel secondo e i prodotti di reazione rilevati nel terzo. In particolare, la transizione monitorata è stata la seguente: 401.2 $(\text{M-H})^- \rightarrow 281.3$ (oleato) $^-$. Di seguito, si riporta la curva di calibrazione effettuata utilizzando un campione di tirosil oleato come standard esterno (*Figura 6*).

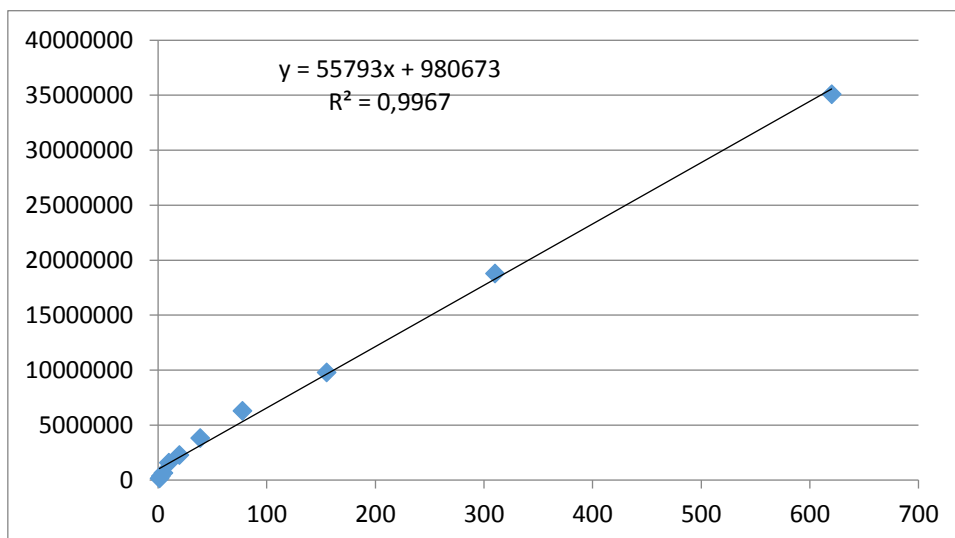


Figura 6. Curva di calibrazione del tirosil oleato ottenuta riportando sull'ascissa i valori delle concentrazioni (mg/L) delle soluzioni standard e sull'ordinata le aree (cps) corrispondenti.

3.6 Determinazione del valore di acidità libera (AV)

Principio del metodo: la determinazione del grado di acidità (acidi grassi liberi) è basata sulla titolazione volumetrica (acido debole-base forte) della soluzione dell'olio con una soluzione acquosa di NaOH. La fenolftaleina, un acido debole che ha un viraggio intorno a pH=8.2 (intervallo di viraggio ± 1), è stato usato come indicatore (COI, "Consiglio Oleicolo Internazionale"). Procedimento: la determinazione è stata condotta disciogliendo in una beuta da 250 mL 2 g di olio da analizzare in 50 mL di una miscela etere etilico-etanolo assoluto (1:1) precedentemente neutralizzata con idrossido di sodio (NaOH) 0.1 N, in presenza di tre gocce di fenolftaleina. Dopo l'aggiunta di altre tre gocce dell'indicatore, la titolazione è proseguita, agitando, con la soluzione di idrossido di sodio, fino a viraggio della fenolftaleina (colorazione rosa persistente per almeno 10 secondi).

Il valore di acidità è stato espresso come percentuale di acido oleico pari a:

$$\frac{V \cdot N \cdot 282}{10 \cdot m}$$

dove V è il volume in ml del titolante NaOH consumato, N è la normalità di NaOH, m è il peso in grammi dell'olio e 282 è il peso molecolare dell'acido oleico.

3.7 Determinazione del valore di perossidi (PV)

Principio del metodo: la determinazione del numero di perossidi è basata sulla titolazione iodometrica, in cui la sostanza in esame viene sciolta in acido acetico e cloroformio, con una soluzione di ioduro di potassio; i perossidi presenti nell'olio ossidano lo ioduro riducendosi a loro volta ad alcoli e lo iodio liberato viene titolato con una soluzione di tiosolfato di sodio standardizzata (COI, "Consiglio Oleicolo Internazionale").

Procedimento: la determinazione è stata condotta disciogliendo in una beuta da 250 mL 2 g di olio da analizzare in 10 mL di cloroformio e 15 mL di acido acetico con 1 mL di soluzione di ioduro di potassio; la soluzione, subito dopo agitazione per 1 minuto, è stata successivamente tappata e riposta al riparo dalla luce per 5 minuti esatti. Dopo il breve intervallo di riposo, aggiungendo 75 mL di acqua distillata e 1 mL di soluzione di amido come indicatore, lo iodio liberato è stato titolato con una soluzione di tiosolfato di sodio 0.01 N fino a decolorazione della soluzione che, da un colore scuro tenderà ad acquisire più o meno il colore di partenza dell'olio.

Il numero di perossidi è stato espresso come milliequivalenti di ossigeno attivo per kg di olio (meq O₂/kg, calcolato secondo la seguente equazione:

$$\frac{V \cdot N}{m} \times 1000$$

dove V è il volume in mL del titolante Na₂S₂O₃ consumato, N è la normalità di Na₂S₂O₃ ed m è il peso in grammi dell'olio.

3.8 Determinazione di specifici valori di estinzione molare (analisi spettrofotometrica)

Principio: l'analisi è espressa mediante dei coefficienti *K* che rappresentano l'assorbimento da parte dell'olio all'esposizione di luce ultravioletta in particolari condizioni, secondo la legge di Lambert-Beer. I coefficienti di estinzione molare tra lunghezze d'onda di 232 nm e di 270 nm indicano lo stato ossidativo dell'olio. Questo esame permette il riconoscimento di un olio rettificato in quanto contiene doppi e tripli legami coniugati che assorbono a lunghezze d'onda superiori a 200 nm, a differenza di un olio vergine che contiene soltanto doppi legami isolati e sistemi di due o tre doppi legami non coniugati che assorbono a lunghezze d'onda massime tra 175 e 185 nm.

Inoltre, l'assorbimento a 232 nm ed a 270 nm non è dovuto soltanto ai sistemi dienici e trienici, ma anche ai suoi prodotti di ossidazione, che si formano negli oli in fase di irrancidimento (COI, “Consiglio Oleicolo Internazionale”).

Procedimento: sono stati pesati 0.25 g dell'olio in esame (omogeneo ed esente di impurezze sospese) in un matraccio tarato da 25 mL, portando a volume con cicloesano ed omogenizzando per inversione. La soluzione risultante, perfettamente limpida è stata utilizzata per il riempimento di cuvette in quarzo con spessore di 1 cm; usando come riferimento il solvente impiegato, sono state misurate le estinzioni alle lunghezze d'onda significative comprese fra 232 e 276 nm, in particolare quelle più significative a 232, 266, 270 e 274 nm, utilizzando uno spettrofotometro Ultrospec 2100 pro UV-Vis (Amersham Biosciences).

Le estinzioni specifiche (coefficienti di estinzione) alle varie lunghezze d'onda sono state calcolate come segue:

$$K_{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{C}$$

dove K_{λ} è l'estinzione specifica alla lunghezza d'onda A_{λ} è l'estinzione misurata alla lunghezza d'onda e C è la concentrazione della soluzione in g/100ml.

I risultati sono stati espressi con due cifre decimali; la determinazione del ΔK è stata intesa come:

$$\Delta K = K_{270} - [(K_{266} + K_{274}) / 2]$$

3.9 Analisi sensoriale: metodo Panel Test

Pari importanza rispetto alla determinazione dei parametri analitici, ai fini dell'attribuzione della categoria merceologica, assume la valutazione organolettica. Il Consiglio Oleicolo Internazionale (COI) ha fornito una metodologia codificata sensoriale per gli oli d'oliva vergini, nota come Panel Test.

La maggior parte della valutazione sensoriale svolta da un panel addestrato comporta la misurazione in due aree principali, test di differenza e analisi descrittiva. I test di differenza sensoriale sono procedure utilizzate per determinare se i giudici possono distinguere tra due stimoli simili, ovvero due campioni alimentari molto simili. Queste valutazioni sono usate per determinare se si verificano lievi cambiamenti dovuti alla

riformulazione del prodotto o al cambiamento nell'elaborazione tecnologica. I test di differenza sono particolarmente adatti alla valutazione di oli vegetali durante la loro lavorazione, utilizzati per controllare l'efficienza di raffinazione. Inoltre, possono essere utilizzati per misurare la leggera variazione di sapore determinata dai cambiamenti in deposito o imballaggio. L'analisi descrittiva, l'altra principale area di valutazione sensoriale, descrive con precisione e misura gli attributi sensoriali del cibo. Ne consegue che questo può essere fatto solo con una formazione di giudici.

L'analisi organolettica prevede l'utilizzo di diverse sensibilità: quella olfattiva con ricezione degli stimoli da parte delle cellule olfattive o indirettamente attraverso il percorso retronasale permettendo la valutazione di sostanze volatili che sostano più a lungo a contatto con queste cellule; la sensibilità gustativa, grazie alla presenza di papille gustative di diverse forme sulla lingua permette la percezione dei sapori, in particolare la nota amara dovuta alla presenza di oleuropeina (il salato non è percepibile perché nell'olio non si trovano sali e l'acido non viene riconosciuto in quanto gli acidi grassi non sono rilevati dalle papille gustative); la sensibilità chimica lungo la mucosa della bocca, percepisce il piccante dovuto alle sostanze fenoliche e l'astringente; infine, la sensibilità tattile permette di percepire la fluidità dell'olio, dovuta alla concentrazione di acidi grassi insaturi.

La mattina è il momento migliore per assaggiare gli oli. È stato dimostrato che ci sono ottimi periodi di percezione per quanto riguarda il gusto e l'olfatto durante il giorno. I pasti sono preceduti da un periodo in cui aumenta la sensibilità olfatto-gustativa, mentre in seguito questa percezione diminuisce. Tuttavia, questo criterio non dovrebbe essere portato all'estremo in cui la fame può distrarre gli assaggiatori, diminuendo così la loro capacità discriminativa. Gli assaggiatori, prima del test, devono comunque seguire delle regole dettagliate.

Gli attributi positivi sono:

- mandorla: odore leggero che ricorda quello di mandorla fresca o secca;
- mela: una sensazione che ricorda questo frutto;
- carciofo: un odore che ricorda il carciofo crudo;
- astringente: una sensazione di arricciamento nella bocca creata dal tannino;
- amaro: questo è un gusto caratteristico preferito degli oli d'oliva, se non è troppo intenso;

- fruttato: gamma di odori (dipendenti dalla varietà) caratteristici dell'olio fresco percepita direttamente o per via retronasale. Il fruttato è qualificato come verde se la gamma di odori ricorda l'erba verde;
- erba verde: una sensazione che ricorda quella dell'erba appena tagliata;
- fieno: un odore che ricorda quello di erba secca;
- piccante: una sensazione tattile simile a quella di un peperoncino leggero, specialmente nella parte posteriore della gola, che può forzare un colpo di tosse.

Gli attributi negativi, invece, sono:

- salamoia: gusto salato dell'olio ottenuto da olive in salamoia.
- grossolano: una sensazione tattile nella bocca dovuta alla consistenza dell'olio;
- cetriolo: da conservazione prolungata, in particolare in stagno o lattine;
- terrestre: questo termine è usato quando l'olio ha acquisito un odore umido e ammuffito di olive non lavate e fangose;
- sparto: odore di canapa acquisito quando la pasta di olive è stata spalmata su stuoie di sparto utilizzato per costruire i fiscoli;
- piatto: oli che hanno perso il loro aroma caratteristico e non hanno né sapore né odore;
- congelato: a causa delle olive che sono state esposte a temperature di congelamento. Una volta cotto, questo olio emana odori sgradevoli;
- verme: odore impartito dalle larve della mosca dell'olivo. L'odore è allo stesso tempo putrefatto e putrido contemporaneamente;
- riscaldato: riscaldamento prolungato durante l'estrazione;
- fangoso: tipico odore di olio che è stato conservato a lungo sul proprio sedimento.
- ammuffito: l'odore di muffa dalle olive conservate troppo a lungo prima di essere spremute;
- metallico: oli lavorati o immagazzinati con contatto esteso su superfici metalliche;
- rancido: vecchi oli che hanno iniziato a ossidarsi a causa dell'esposizione alla luce o all'aria;

- acqua di vegetazione: oli che hanno assorbito gli odori sgradevoli dalle acque di vegetazione perché rimasti a contatto con esse per troppo tempo;
- aceto di vino: odore tipico di vino o aceto dovuto alla fermentazione delle olive;
- lubrificante: flavor dell'olio che ricorda il gasolio, il grasso o l'olio minerale;
- cotto o stracotto: flavor caratteristico dell'olio dovuto a eccessivo e/o prolungato riscaldamento, che si verifica in particolare durante la termogramolatura, se realizzata in condizioni termiche inadeguate;
- fieno - legno: flavor caratteristico di alcuni oli provenienti da olive secche.

L'analisi si basa sui giudizi di un gruppo di tecnici, condotto da un capogruppo, che ha sufficienti conoscenze e capacità per preparare sessioni di analisi sensoriale, motivare il giudizio, elaborare i dati, interpretare i risultati e redigere la relazione.

Una specifica sala di degustazione, cabine di assaggio con temperature tra 20 e 25 °C (*Figura 7*), dovranno accomodare un gruppo di 8-12 persone, selezionate e addestrate per l'identificazione e misurazione dell'intensità di diverse sensazioni percepite, positive e negative. La valutazione sensoriale viene effettuata secondo regole



Figura 7. Cabina di assaggio

codificate, usando condizioni controllate per minimizzare le influenze esterne e usando un bicchiere da degustazione adeguato, adottando sia un vocabolario specifico che un foglio di profilo che include attributi sensoriali positivi e negativi. La raccolta dei risultati e l'elaborazione statistica devono essere standardizzati. Il colore dell'olio vergine d'oliva può influenzare e interferire nella fase di percezione del sapore e poiché

non rappresenta un indice di qualità, per evitare pregiudizi, la degustazione viene eseguita usando un bicchiere di vetro scuro (blu o ambrato). Il bicchiere ha una forma di tulipano, quindi, il diametro è maggiore alla base e si restringe nella parte superiore per favorire la concentrazione degli aromi verso il naso. Al momento della presentazione in cabina, il bicchiere deve contenere 15 mL di olio ed essere coperto da un vetro di orologio in modo da evitare la dispersione dei composti volatili. Un aspetto molto importante ai fini dell'oggettività del giudizio è la temperatura di assaggio dell'olio. Il metodo prescrive che il bicchiere sia mantenuto alla temperatura di $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizzando apposite piastre riscaldanti, questo perché i composti aromatici ad elevate temperature volatilizzano rendendo più semplice l'analisi. Il campione deve essere presentato in maniera anonima e il bicchiere deve essere contrassegnato con un codice composto da cifre o una combinazione di lettere e cifre scelti a caso.

La tecnica applicata per la degustazione è quella descritta nell'allegato XXI del Reg. (CEE) N. 2568/91: si versa l'olio nel bicchiere, si riscalda ad una temperatura di 30°C , si annusa inclinandolo leggermente e ispirando piano e profondamente 2 o 3 volte cercando di captare tutte le sensazioni gradevoli e sgradevoli. Si assume una piccola quantità (circa 3 mL) di olio e la si distribuisce sulla lingua, in particolare nella parte mediana posteriore, per percepire eventuale presenza di amaro. Si mantiene l'olio in bocca e successivamente lo si spinge nella parte posteriore del palato per percepire eventuale presenza di piccante. Con aspirazioni corte e successive si introduce aria nella bocca per favorire la percezione, per via retronasale, dei composti aromatici volatili. Se si effettuano diversi assaggi nella stessa sessione, è opportuno utilizzare un prodotto che può eliminare i resti dell'olio dal precedente assaggio, come ad esempio masticare e poi sputare una piccola fetta di mela verde.

La scheda dell'assaggio (*figura 8*) è costituita da una parte superiore dove sono indicati i principali difetti dell'olio e da una parte inferiore dove sono indicati gli attributi positivi dell'olio. Un olio per essere extravergine deve essere privo di difetti e deve essere fruttato. Quindi la mediana del difetto deve essere uguale a 0 e la mediana del fruttato deve essere maggiore di 0. La scheda viene utilizzata dall'assaggiatore che, con la penna, segna un tratto verticale sul segmento corrispondente al descrittore

Figura 1

SCHEDA DI PROFILO DELL'OLIO DI OLIVA VERGINE

INTENSITA' DI PERCEZIONE DEI DIFETTI

Riscaldato/morchia _____

Muffa-umidità-terra _____

Avvinato-inacetito
acido-agro _____

Olive gelate
(legno umido) _____

Rancido _____

Altri attributi negativi: _____

Metallico Fieno secco Verme Grossolano

Descrittore: Salamola Cotto o stracotto Acqua di vegetazione

Sparto Cetriolo Lubrificanti

INTENSITA' DI PERCEZIONE DEGLI ATTRIBUTI POSITIVI

Fruttato _____

Verde Maturo

Amaro _____

Piccante _____

Nome dell'assaggiatore: _____ Codice dell'assaggiatore: _____

Codice del campione: _____

Data: _____ Firma: _____

Osservazioni: _____

Figura 8. Scheda di valutazione

percepito. Il segno sarà collocato ad una distanza dall'origine proporzionale all'intensità di percezione dello stimolo. Naturalmente l'abilità nell'utilizzo della scala viene solo dopo aver acquisito la necessaria esperienza. Terminata la valutazione sensoriale, il capo Panel raccoglie i fogli di profilo compilati dagli assaggiatori ed inserisce i dati nel programma elettronico per il calcolo della mediana. Sulla base dei valori della mediana del fruttato e della mediana dei difetti si passa alla classificazione. I valori degli altri indici di qualità acidità, numero di perossidi e costanti spettrofotometriche, devono risultare conformi ai limiti della categoria e completano la definizione della classificazione (Muzzalupo et al., 2012).

Capitolo IV

Risultati e discussione

4.1 Analisi quantitativa del tirosil oleato

La determinazione del tirosil oleato, in estratti fenolici ottenuti secondo il metodo COI (“Consiglio Oleicolo Internazionale”) a partire da oli extravergine di diverse cultivar e campagne olearie, oli difettati e oli sottoposti a trattamento termico è stata effettuata mediante analisi LC-MS/MS secondo il metodo precedentemente messo a punto (Benincasa et al., in preparazione). I risultati ottenuti sono riportati in *tabella 1*.

Tab.1. Concentrazione di tirosil oleato nei vari campioni analizzati

Campione	Cultivar	Campagna	Tirosil oleato (mg/kg)
EVOO	Carolea	2017-2018	0.11 ± 0.01
EVOO	Carolea	2018-2019	0.11 ± 0.02
EVOO	Dolce di Rossano	2017-2018	0.12 ± 0.01
EVOO	Dolce di Rossano	2018-2019	0.10 ± 0.01
EVOO	Nocellara del Belice	2017-2018	0.12 ± 0.01
EVOO	Pennulara	2018-2019	0.10 ± 0.01
Rancido	Blend	2017-2018	4.3 ± 0.5
Riscaldo	Blend	2018-2019	4.9 ± 0.2
Avvinato	Blend	2018-2019	5.0 ± 0.2
Fritto 1h	Carolea	2018-2019	0.12 ± 0.01
Fritto 2h	Carolea	2018-2019	0.10 ± 0.01
Fritto 3h	Carolea	2018-2019	0.12 ± 0.01

Come si evince dai risultati, la quantità di tirosil oleato è risultata maggiore negli oli difettati (rancido, riscaldo e avvinato) che in quelli extravergine. D’altro canto, non è stata osservata alcuna variazione della concentrazione di tirosil oleato in funzione della

cultivar o dell'anno di produzione. Inoltre, anche in oli sottoposti a trattamento termico, la quantità di tirosil oleato è rimasta pressoché invariata.

4.2 Numero di perossidi

Dalle determinazioni del valore di perossidi effettuate mediante titolazioni, è risultato che quelli degli oli d'oliva extravergine della campagna olearia 2018-2019 (Carolea, Dolce di Rossano e Pennulara) rientrano nei limiti preposti dalla legge, con valori inferiori a 20 milliequivalenti di O₂/kg di olio.

I valori ottenuti, invece, dalle determinazioni riguardanti oli d'oliva extravergine della campagna olearia 2017-2018 (Carolea, Dolce di Rossano e Nocellara del Belice), risultano superiori al limite di legge, con valori maggiori per gli oli extravergine della cultivar Nocellara e Dolce di Rossano.

Inoltre, i valori relativi alle determinazioni del valore di perossidi degli oli trattati termicamente, risultano inferiori rispetto al valore limite, e, in particolare, tutti inferiori a 4 milliequivalenti di O₂/kg di olio. Questi risultati sono in linea con quanto riportato in letteratura (Blasi et al., 2018) e dipende dalla degradazione degli idroperossidi ad alte temperature.

4.3 Acidità libera

I valori ottenuti dalle determinazioni del valore di acidità sono risultati al di sotto del limite di legge per un olio d'oliva extravergine (non superiore a 0.8 % g di acido oleico/100 g di olio) sia per gli oli della campagna olearia 2017-2018 (Carolea, Dolce di Rossano e Nocellara del Belice) che per quelli della campagna olearia 2018-2019 (Carolea, Dolce di Rossano e Pennulara).

4.4 Misura di ΔK

I valori ottenuti dalle determinazioni del valore di ΔK sono risultati al di sotto del limite di legge per un olio d'oliva extravergine (non superiore a 0.01), sia per gli oli della campagna olearia 2017-2018 (Carolea, Dolce di Rossano e Nocellara del Belice) che per quelli della campagna olearia 2018-2019 (Carolea, Dolce di Rossano e

Pennulara). D'altro canto, il valore di ΔK per gli oli sottoposti a stress termico è risultato superiore al valore di legge.

4.5 Analisi sensoriale

L'esame organolettico, contemplato dall'allegato XII del Reg 2568/01, è un valido strumento per la classificazione merceologica degli oli di oliva e, quindi, per la valorizzazione degli oli di eccellenza. In questo contesto, il panel test è stato utilizzato per testare la qualità di tutti gli oli analizzati; il risultato ottenuto è stato quindi confrontato con la presenza o meno del tirosil oleato.

4.5.1 Cv. Carolea (2017/2018)

L'olio della cv Carolea rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 9*): fruttato medio di oliva al giusto grado di maturazione con sentori di erba e mandorla. Al gusto si avverte inizialmente la mandorla seguita dall'erba e dalle verdure mature. Amaro e piccante mediamente percepiti e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

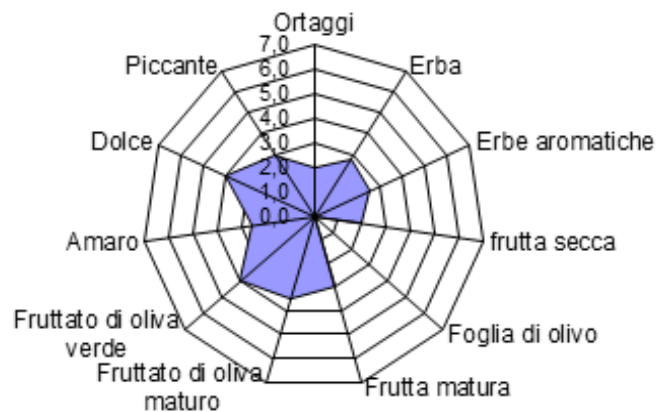


Figura 9. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Carolea

4.5.2 Cv. Dolce di Rossano (2017/2018)

L'olio della cv Dolce di Rossano rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 10*): fruttato medio di oliva verde con sentori di erba fresca, carciofo e mandorla. Al gusto si avverte inizialmente l'erba di campo subito seguita dal carciofo e dalla mandorla Amaro e piccante mediamente percepiti e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

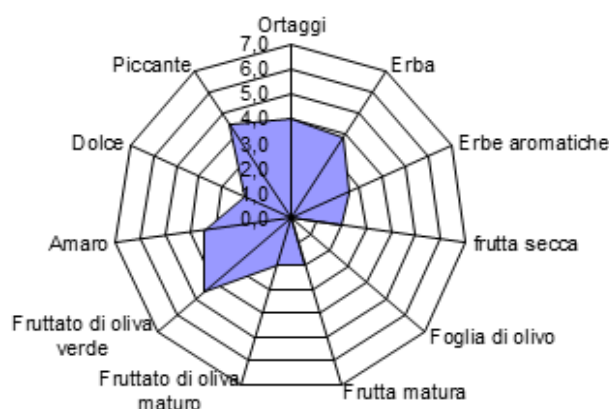


Figura 10. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Dolce di Rossano

4.5.3 Cv. Nocellara del Belice (2017/2018)

L'olio della cv Nocellara del Belice rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 11*): fruttato medio di oliva verde con sentori di erbaceo, erbe aromatiche, carciofo e mandorla. Al gusto si avverte decisa la

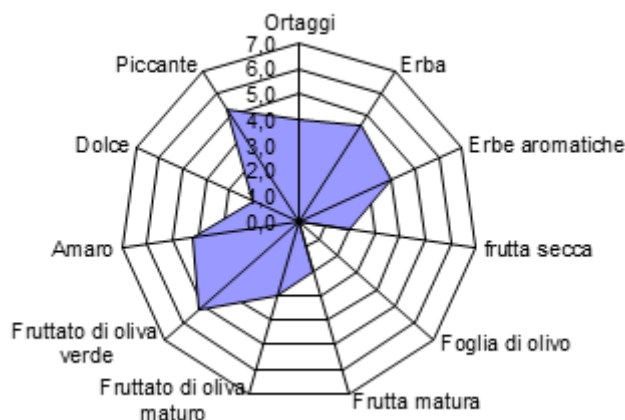


Figura 11. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Nocellara del Belice

mandorla seguita dalle erbe aromatiche e dal carciofo. Amaro e piccante decisi e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

4.5.4 Cv. Carolea (2018/2019)

L'olio della cv Carolea rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 12*): fruttato medio di oliva al giusto grado di maturazione con sentori di erba e mandorla. Al gusto si avverte inizialmente la mandorla seguita dall'erba e dalle verdure mature. Amaro e piccante mediamente percepiti e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

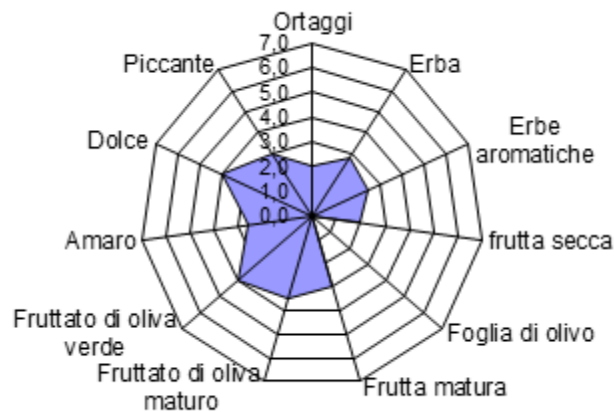


Figura 12. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Carolea

4.5.5 Cv. Dolce di Rossano (2018/2019)

L'olio della cv Dolce di Rossano rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 13*): fruttato medio di oliva verde con sentori di erba fresca, carciofo e mandorla. Al gusto si avverte inizialmente l'erba di campo subito seguita dal carciofo e dalla mandorla Amaro e piccante mediamente percepiti e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

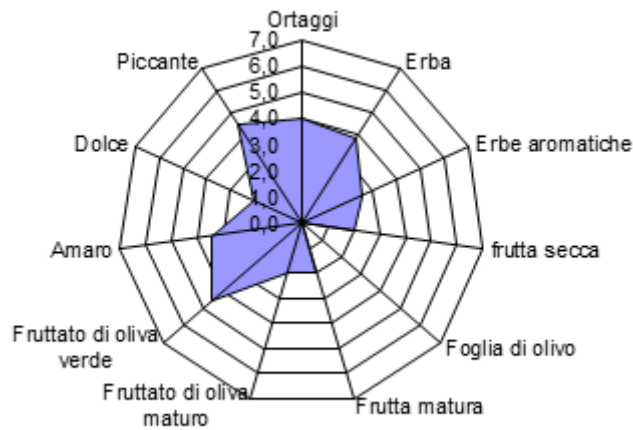


Figura 13. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Dolce di Rossano

4.5.6 Cv. Pennulara (2018/2019)

L'olio della cv Pennulara rispecchia la qualità di un extravergine e ha mostrato le seguenti caratteristiche (*figura 14*): fruttato medio di oliva verde con sentori di erbaceo, erbe aromatiche, carciofo e mandorla. Al gusto si avverte decisa la mandorla seguita dalle erbe aromatiche e dal carciofo. Amaro e piccante decisi e persistenti. Presenza di tirosil oleato <1 ppm.

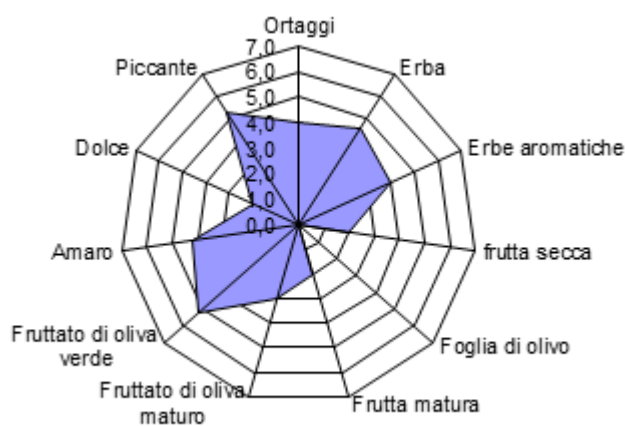


Figura 14. Spider plot degli attributi organolettici dell'olio della cv Pennulara

Conclusioni

In questo lavoro di tesi, è stata determinata la quantità di tirosil oleato in oli extravergine prodotti a partire da olive appartenenti a cultivar diverse. E' stata anche valutata l'eventuale influenza, a parità di cultivar, dell'anno di produzione. È stato osservato che la concentrazione di tirosil oleato è indipendente da questi parametri. Inoltre, non è stata osservata alcuna variazione della quantità di tirosil oleato anche nei campioni di olio sottoposti a stress termico. Viceversa, una quantità maggiore di tirosil oleato è stata riscontrata in oli difettati, i cui difetti dipendono da non idonea conservazione delle olive e/o da qualità scadente delle stesse. Si può quindi concludere che la presenza del tirosil estere è inversamente proporzionale alla qualità dell'olio, ma non dipende dalla sua conservazione o da eventuali stress termici.

Bibliografia

- Aissa I., Bouaziz M., Ghangui H., Kammoun A., Miled N., Sayadi S., Gargouri Y. (2007). Optimization of Lipase-Catalysed synthesis of acetylated tyrosol by response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 55:10298-10305.
- Aissa I., Sghair R. M., Bouaziz M., Laouini D., Sayadi S., Gargouri Y. (2012). Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmania activities. *Lipids in Health and Dis.*, 11:13.
- Beltran G., Aguilera M. P., Rio C. D., Sanchez S., Martínez L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem.*, 89:207–215.
- Ben Youssef N., Zarrouk W., Carrasco-Pancorbo A., Ouni Y., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutiérrez A., Daoud D., Zarrouk M. (2009). Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chetoui virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.*, 90:199–204.
- Bendini A., Cerretani L., Poerio A., Bonoli-Carbognin M., Gallina Toschi T., Lercker G. (2006). Oxidative stability of virgin olive oils, produced by organic, integrated or conventional agricultural methods. *Progr. Nutr.*, 8(2):104-15.
- Bendini A., Cerretani L., Carrasco-Pancorbo A., Gómez-Caravaca A. M., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez A., Lercker G. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12(8):1679-1719.
- Bianco A., Muzzalupo I., Piperno A., Romeo G., Uccella N. (1999). Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 47:3531–3534.
- Biedermann M., Bengartz A., Mariani C., Grob K. (2008). Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *Eur Food Res Technol.*, 288:65-74.
- Blasi F., Rocchetti G., Montesano D., Lucini L., Chiodelli G., Ghisoni S., Baccolo G., Simonetti M. S., Cossignani L. (2018). Changes in extra-virgin

olive oil added with *Lycium barbarum* L. carotenoids during frying:

Chemical analyses and metabolomic approach. *Food Res. Int.*, 105:507–516.

- Boskow D. (2015). Plant polyphenols. In olive and olive oil bioactive constituents. Boskow D., Editore, AOCS Press, Urbana.
- Bown D. (1995). *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*, Dorling Kindersley, Londra.
- Brenes M., Garcia A., Garcia P., Garrido A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 49:5609-5614.
- Cappelli P., Vannucchi V. (2009). *Chimica degli alimenti*. Terza Edizione, Zanichelli, pp. 538-549.
- Caruso D., Berra B., Giavarini F., Cortesi N., Fedeli E., Galli G. (1999). Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 9:102-107.
- Cerretani L., Bendini A., Rotondi A., Mari M., Lercker G., Gallina Toschi T. (2004). Evaluation of oxidative stability and organoleptic properties of extra-virgin olive oils in relation to olive ripening degree. *Progr. Nutr.*, 6(1):50-6.
- Chernyshova G. A., Plotnikov M. B., Smolyakova V. I., Golubeva I. V., Aliev O. I., Tolstikova T. G., Krysin I. V. (2007). *Bull. Exp. Biol. Med.*, 143:689-691.
- Clodoveo M. L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - an overview. *Trends Food Sci. Technol.*, 25:13–23.
- Cognoli S., Squadrilli L. (2017). *Lo straordinario mondo dell'olio extravergine d'oliva*. Edizione Lswr.
- Conte L., Cabras P., Martelli A. (2004). *Lipidi In Chimica degli alimenti*. Padova, Piccin, Nuova Libreria, pp. 50-55.
- De la Puerta R., Ruiz-Gutierrez V., Houlst J. R. (1999). Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.*, 57:445-449.
- Di Benedetto R., Vari R., Scazzocchio B., Filesi C., Santangelo C., Giovannini C., Matarrese P., D'Archivio M., Masella R. (2007). Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite

- of its weak antioxidative effectiveness. *Nutr. Metab. CardioVasc. Dis.*, 17:535–545.
- Di Giacinto L., Di Loreto G., Di Serio M. G., Giansante L., Faberi A., Marianella R. M., et al. (2014). Monitoraggio degli alchil esteri (AE) nell'olio extra vergine di oliva, “MONITORALCHIL”. Torre dè Passeri (PE), Italy, , pp. 1–109.
 - Di Serio M. G., Giansante L., Di Loreto G., Faberi A., Ricchetti L., Di Giacinto L. (2017). Ethyl esters versus fermentative organoleptic defects in virgin olive oil. *Food Chem.*, 219:33–39.
 - Fki I., Allouche N., Sayadi S. (2005). The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chem.*, 93:197-204.
 - Fragopoulou E., Nomikos T., Karantonis H. C., Apostolakis C., Pliakis E., Samiotaki M., Panayotou G., Antonopoulou S. (2007). *J. Agric. Food Chem.*, 55:80-89.
 - Frega N., Bocci F., Lercker G. (1993). High-resolution gas-chromatographic determination of diacylglycerols in common vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70:175-7.
 - Frega N., Mozzon M., Lercker G. (1999). Effects of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *J. Am. Oil Chem Soc.*, 76:325-329.
 - Ghanbari R., Anwar F., Alkharfy K. M., Gilani A. H., Saari, N. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)- A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 13(3):3291-3340.
 - Giovannini C., Straface E., Modesti D., Coni E., Cantafora A., De Vincenzi M., Malorni W., Masella R. (1999). Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized LDL-induced injury in Caco2 cells. *J. Nutr.*, 129:1269-1277.
 - Gomez-Caravaca A. M., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Lercker G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DADMSD. *Am. J. Food Technol.*, 2:671-678.

- Inarejos-García A. M., Fregapane G., Salvador M. D. (2011). Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur. Food Res. Technol.*, 232:441–451.
- Kanakis P., Termentzi A., Michel T., Gikas E., Halabalaki M., Skaltsounis A. L. (2013). From olive drupes to olive oil. An HPLC-orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med.*, 79(16):1576-87.
- Laguerre M., Bayrasy C., Lecomte J., Chabi B., Decker E. A., Wrutniak Cabello C., et al. (2013). How to boost antioxidants by lipophilization? *Biochimie.*, 95:20–6.
- Lattanzio V., Ruggiero P. (2003). I composti fenolici di interesse biologico, Patron Editore.
- Lercker G., Frega N., Bocci F., Mozzon M. (1999). Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils: influence of the kneading of olive-paste. *Grasas y Aceites*, 50:26-9.
- Lercker G., Gallina Toschi T. (2005). Aspetti tecnologici e caratteristiche degli oli da olive. Dalle olive all’olio: un viaggio alla scoperta del più nobile dei condimenti. Altra Romagna Edizione, Forlì, pp. 10-21.
- Lo Scalzo R., Scarpato M. L. (1993). A new secoiridoid from olive waste waters. *J. Nat. Prod.*, 56:621-623.
- Lucas R., Comelles F., Alcantara D., Maldonado O. S., Curcuroze M., Parra J. L., Morales J. C. (2010). Surface-Active Properties of Lipophilic Antioxidants Tyrosol and Hydroxytyrosol Fatty Acid Esters: A Potential Explanation for the Nonlinear Hypothesis of the Antioxidant Activity in Oil-in-Water Emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, 58:8021–8026.
- Mariani C., Bellan G. (2011). Sul possibile aumento degli alchil esteri negli oli extravergini di oliva. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 1:3–10.
- Marzocchi S., Caboni M. F. (2018). Study of the Effect of Tyrosyl Oleate on Lipid Oxidation in a Typical Italian Bakery Product. *J. Agric. Food Chem.*, 66:12555–12560.

- Masella, P., Parenti A., Spugnoli P., Calamai L. (2009). Influence of vertical centrifugation on extra virgin olive oil quality. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86:1137–1140.
- Mateos R., Espartero J. L., Trujillo M., Rios J. J., Leon-Camacho M., Alcudia F., Cert A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.*, 49:2185-2192.
- Mateos R., Dominguez M. M., Espartero J., et al. (2003). Antioxidant Effect of Phenolic Compounds, α -tocopherol, and Other Minor Components in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 51:7170-7175.
- Mateos R., Trujillo M., Pereira-Caro G., Madrona A., Cert A., Espartero, J. L. (2008). New lipophilic tyrosyl esters. Comparative antioxidant evaluation with hydroxytyrosyl esters. *J. Agric. Food Chem.*, 56:10960-10966.
- Murphy D. J. (1993). Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progr. Lipid. Res.*, 32:247-80.
- Muzzalupo I., Pellegrino M., Perri E. (2012). Sensory Analysis of Virgin Olive Oils. *Olive Germplasm, The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*.
- Oueslati I., Manai H., Madrigal-Martínez M., Martínez-Cañas M. A., Jsánchez-Casas J., Zarrouk M., Flamini G. (2018). Volatile molecular markers of VOO Thermo-oxidation: Effect of heating processes, macronutrients composition, and olive ripeness on the new emitted aldehydic compounds. *Food Res. Int.*, 106:654–665.
- Pande G., Akoh C. (2016). Enzymatic Synthesis of Tyrosol-Based Phenolipids: Characterization and Effect of Alkyl Chain Unsaturation on the Antioxidant Activities in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 93:329–337.
- Pannelli G., Servili M., Baldioli M., Montedoro G. F. (1991). Changes in the phenolic and pectic substances in olive fruit and oil as a function of ripening, cultivar and extraction technology. *OLEA*, pp. 21-64.

- Parenti A., Spugnoli P., Masella P., Calamai L. (2008). The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 110:735– 741.
- Perez-Jimenez F., Alvarez de Cienfuegos G., Badimon L., Barja G., Battino M., Blanco A., et al. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur. J. Clin. Investig.*, 35:421–4.
- Pignatti S. (1982). Flora d'Italia, Edagricole, Bologna.
- Plastina P., Benincasa C., Perri E., Fazio A., Augimeria G., Polandd M., Witkampd R., Meijerinkd J. (2019). Identification of hydroxytyrosyl oleate, a derivative of hydroxytyrosol with anti-inflammatory properties, in olive oil by-products. *Food Chem.*, 279:105–113.
- Plotnikov M.B., Chernysheva G.A., Smolyakova V. I., Maslov M. Y., Cherkashina I. V., Krysin A. P., Sorokina I. V., Tolstikova T. G. (2007). Effect of n-tyrosol on blood viscosity and platelet aggregation. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 143:61-63.
- Preziuso S. M., Di Serio M. G., Biasone A., Vito R., Regina Mucciarella M., Di Giovacchino L. (2010). Influence of olive crushing methods on the yields and oil characteristics. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112:1345–1355.
- Riley F. R. (2002). Olive oil production on bronze Age crete: nutritional properties, processing methods, and storage life of Minoan olive oil. *Oxf. J. Archaeol.*, 21:63-75.
- Salvador M. D., Aranda F., Gomez-Alonso S., Fregapane G. (2008). Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chem.*, 80:359–366.
- Samaniego-Sanchez C., Oliveras-Lopez M. J., Quesada Granados J. J., Villalon-Mir M., Lopez-G-Serrana H. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 114:194–204.
- Servili M., Baldioli M., Montedoro G. (1994). Phenolic composition of virgin olive oil in relationship to some chemical and physical aspects of malaxation. *Acta Hort.*, 356:331-6.

- Servili M., Baldioli M., Mariotti F., Montedoro G. F. (1996). Secoiridoides of virgin olive oil: modification during the oil mechanical extraction process. Proceedings of the world Conference and Exhibition on Oil seed and edible oils processing. Istanbul, October, pp. 289-295.
- Servili M., Montedoro G. F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104:602–613.
- Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Esposito S., Montedoro G. (2003). Air exposure time of olive pastes during the extraction process and phenolic and volatile composition of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 80:685-9.
- Servili M., Esposito S., Veneziani G., Urbani S., Taticchi A., Di Maio I., Selvaggini R., Sordini B., Montedoro G. (2011). Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olivevegetation water concentrate produced by membrane treatment. *Food Chem.*, 124:1308-1315.
- Stefanoudaki E., Koutsaftakis A., Harwood J. L. (2011). Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chem.*, 127:1481–1486.
- Tofani, D., Balducci V., Gasperi T., Incerpi S., Gambacorta A. (2010). Fatty acid hydroxytyrosyl esters: Structure/antioxidant activity relationship by ABTS and in cell-culture DCF assays. *J. Agric. Food Chem.*, 58:5292–5299.
- Valli E., Bendini A., Maggio R. M., Cerretani L., Toschi T. G., Casiraghi E., Lercker, G. (2013). Detection of low-quality extra virgin oils by fatty acid alkyl esters evaluation: A preliminary and fast mid-infrared spectroscopy discrimination by a chemometric approach. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 48:548–555.
- Vauzour D., Corona G., Spencer J. P. E. (2010). Caffeic acid, tyrosol and p-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. *Arch. Biochem. Biophys.*, 501:106-111.
- Wang, J. K., Shahidi F. (2014). Acidolysis of p-coumaric acid with omega-3 oils and antioxidant activity of phenolipid products in in vitro and biological model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 62(2):454–461.
- Yuanxin S., Dayong Z., Fereidoon S. (2018). Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters. *Food Chem.* 245:1262–1268.