

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

“Determinazione dell'idrossitirosil oleato in oli extra vergine d'oliva”

Relatore

Dott. Pierluigi Plastina

Candidato

Vincenza Budriesi

Matricola 188412

Correlatore

Dott.ssa Cinzia Benincasa

Anno Accademico 2017 / 2018

Ai miei genitori, ad Antonio e a Francesco

Indice

Introduzione	1
Capitolo 1	4
Olea Europea	4
1.1 Ulivo, morfologia della pianta.....	4
1.2 Il frutto.....	5
1.3 Olio extra vergine di oliva	7
1.4 Estrazione dell'olio extra vergine d'oliva	9
1.5 Prodotti di scarto.....	11
1.6 Indicatori per la tutela della qualità dell'olio EVO	13
1.6.1 Panel Test	16
CAPITOLO 2	20
Composti fenolici	20
2.1 Fenoli	20
2.2 Proprietà dei fenoli	21
2.3 Idrossitirosolo	21
2.4 Derivati dell'Idrossitirosolo.....	24
2.5 Idrossitirosil oleato	25
CAPITOLO 3	27
Materiali e Metodi	27
3.1 Campionamento oli	27
3.2 Sintesi dell'idrossitirosolo	27
3.3 Sintesi dell'idrossitirosil oleato	28
3.4 Estrazione dei composti fenolici.....	28
3.5 Determinazione dell'idrossitirosil oleato nell'olio mediante LC-MS/MS	29
3.6 Determinazione dell'acidità libera.....	30
3.7 Determinazione del numero di perossidi	31
3.8 Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto	32
CAPITOLO 4	35
Risultati e discussione	35
4.1 Determinazione quantitativa dell'idrossitirosil oleato	35
4.2 Determinazione dell'acidità totale.....	36
4.3 Determinazione del numero di perossidi	36
4.4 Determinazione del ΔK	36
4.5 Analisi sensoriale.....	36

4.5.1 Cv. Carolea (2017/2018)	37
4.5.2 Cv. Dolce di Rossano (2017/2018).....	37
4.5.3 Cv. Nocellara del Belice (2017/2018)	38
4.5.4 Cv. Carolea (2018/2019)	38
4.5.5 Cv. Dolce di Rossano (2018/2019).....	39
4.5.6 Cv. Pennulara (2018/2019).....	39
Conclusioni	40
Bibliografia	41

Introduzione

L'olio d'oliva è uno dei componenti più importanti della Dieta mediterranea, grazie alle sue caratteristiche organolettiche, proprietà nutrizionali e influenze culturali (Fernández *et al.*, 2018; Polari *et al.*, 2018). La considerazione di olio alimentare pregiato che l'olio extra vergine di oliva ha sempre avuto presso i popoli del bacino del Mediterraneo, e che oggi si sta diffondendo praticamente in tutto il mondo, è dovuta soprattutto alla sua composizione in acidi grassi con un rapporto tra monoinsaturi e polinsaturi perfettamente equilibrato, ideale per l'alimentazione umana (Preedy V. *et al* 2010;) e al patrimonio antiossidante dovuto soprattutto alla presenza di sostanze fenoliche, che conferiscono all'olio anche gli attributi amaro e piccante. L'idrossitirosolo (HTy) (Fig. 1) è un composto fenolico trovato in foglie di ulivo e nell'olio extravergine di oliva, che ha un ben noto potere antiossidante e proprietà di scavenging di radicali. Recentemente, ha ricevuto particolare attenzione per le sue attività antiproliferative e apoptotiche e per le sue proprietà antinfiammatorie. L'idrossitirosolo (Fig. 1) è un noto antiossidante naturale derivato dall'idrolisi enzimatica o chimica (Capozzi *et al.*, 2000) dell'oleuropeina, uno dei principali composti fenolici presenti in tutte le parti dell'olivo (Figura 1). Durante la maturazione e la lavorazione delle olive, le β -glucosidasi endogene rilasciano HTy dai derivati del secoiridoide per mezzo di meccanismi idrolitici, conferendo all'olio extra vergine di oliva il tipico sapore ricco e complesso. Tra i fenoli idrofilici, è uno dei composti più rappresentativi nell'olio extravergine di oliva ed è presente principalmente come derivato del secoiridoide insieme a quantità minori della forma libera (Fig. 2).

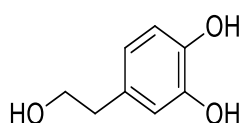


Figura 1: Struttura dell'idrossitirosolo

Considerando il suo forte carattere idrofilo, l'idrossitirosolo è presente anche nei sottoprodotti dell'industria dell'olio d'oliva, in particolare nei rifiuti liquidi denominati acque di scarico delle olive (OMWW). Essi sono prodotti annualmente in grandi volumi in pochi mesi e rappresentano un grave problema ambientale nell'area mediterranea per il contenuto di materia organica e la tossicità (Fiorentino *et al.*, 2013). Diversi studi in vitro e in vivo condotti utilizzando idrossitirosolo in forma libera

hanno riportato un'ampia gamma di attività biologiche, tra cui antimicrobica, ipotensiva, ipoglicemizzante, antiaggregante piastrinica, cardioprotettiva, antiossidante, antiproliferativa e antiinfiammatoria (Hu, *et al.*, 2014) o induzione dell'apoptosi in cellule HL-60 (Sepporta *et al.*, 2013).

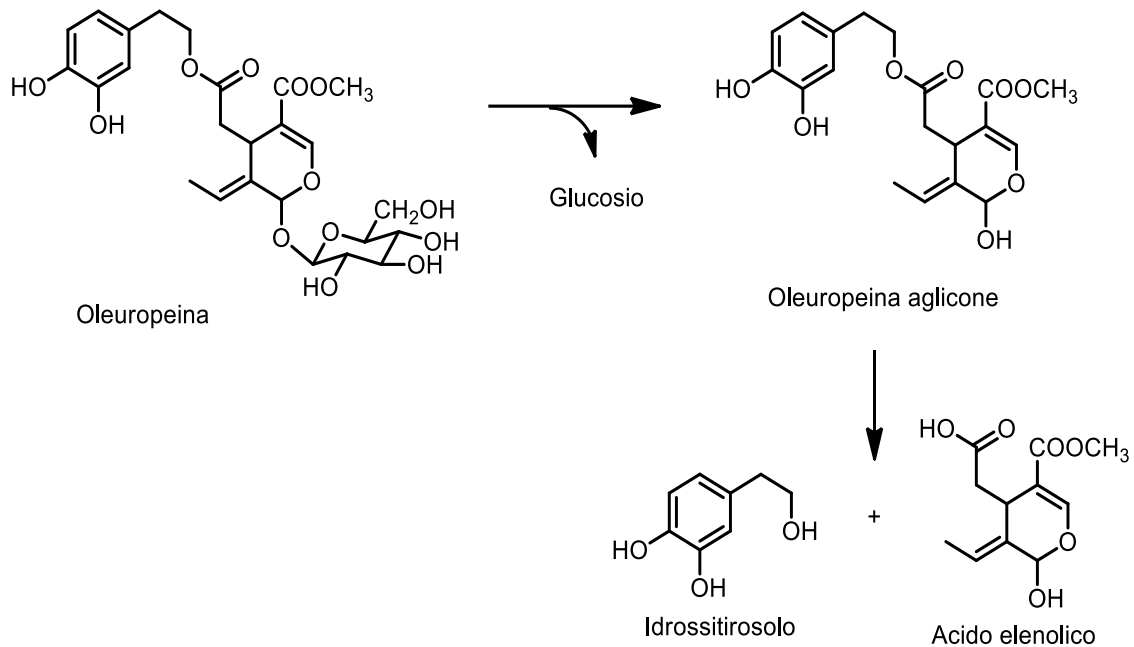


Figura 2: Formazione dell'idrossitirosolo dall'oleuropeina

Nonostante presenti una vasta gamma di attività biologiche, l'idrossitirosolo è instabile (a meno che non sia conservato e asciugato in assenza di aria) e ha una limitata solubilità nei mezzi lipidici. La sua elevata idrofilicità, il suo scarso assorbimento e la sua rapida eliminazione, ha indotto a creare nuove molecole (principalmente lipofile) a base di idrossitirosolo. Nel corso degli ultimi anni, molti sforzi sono stati focalizzati verso la sintesi di derivati dell'idrossitirosolo con migliori proprietà e potenzialmente utili nel trattamento delle malattie degenerative croniche. Diversi derivati dell'idrossitirosolo esterificati con acidi grassi hanno ricevuto molto interesse da parte della comunità scientifica, in virtù della loro maggiore bioattività, dovuta ad una maggiore lipofilicità che ne aumenta la stabilità metabolica e l'abilità di attraversare le membrane cellulari (Burattini *et al.*, 2013). Più recentemente, mediante una reazione di esterificazione lipasi-catalizzata a partire dall'idrossitirosolo e dagli esteri metilici di diversi acidi grassi, è stata sintetizzata una serie di idrossitirosil esteri sottoposta a valutazione delle proprietà anti-infiammatorie, utilizzando una linea cellulare di

macrofagi murinici stimolati con lipopolisaccaridi (LPS) di origine batterica, un modello comunemente utilizzato per la valutazione in vitro delle proprietà anti-infiammatorie (Plastina *et al.*, 2019). In particolare, fra i vari composti testati, compreso l'idrossitirosolo non esterificato, l'idrossitirosil oleato (Fig. 3) è risultato il solo in grado di ridurre il livello di ossido nitrico (NO), un marker infiammatorio, alle concentrazioni testate. Inoltre, l'idrossitirosil oleato è risultato efficace anche nell'inibizione di un altro marker infiammatorio, la prostaglandina E₂ (PGE₂). È poi stato verificato che l'inibizione avviene a livello trascrizionale, dato che l'over-espressione (indotta da LPS) dell'mRNA dell'ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e della ciclossigenasi (COX-2) era inibita dall'idrossitirosil oleato. Inoltre, questo derivato è stato per la prima volta identificato nei sottoprodotti dell'industria olearia (sansa e acque di vegetazione).

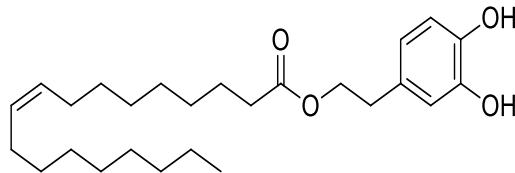


Figura 3: Struttura dell'Idrossitirosil oleato

Scopo

Viste le diverse proprietà positive dell'idrossitirosil oleato e la sua recente identificazione nei sottoprodotti dell'industria olearia, scopo del lavoro svolto nel corso della tesi è stato verificarne l'eventuale presenza in oli extra vergine d'oliva, confrontando campioni ottenuti da cultivar e da campagne olearie differenti.

Capitolo 1

Olea Europea

1.1 Ulivo, morfologia della pianta

L'ulivo (Fig. 4) è una pianta assai longeva che può facilmente raggiungere alcune centinaia d'anni: questa sua caratteristica è da imputarsi soprattutto al fatto che riesca a rigenerare completamente o in buona parte l'apparato epigeo e ipogeo che siano danneggiati. Inoltre è una pianta sempreverde, ovvero la sua fase vegetativa è pressoché continua durante tutto l'anno, con solo un leggero calo nel periodo invernale. L'ulivo coltivato appartiene alla vasta famiglia delle Oleaceae che comprende ben 30 generi (fra i quali ricordiamo il *Ligustrum*, il *Syringa* e il *Fraxinus*); la specie è suddivisa in due sottospecie, l'olivo coltivato (*Olea europaea sativa*) e l'oleastro (*Olea europaea oleaster*). La zona di origine dell'Ulivo (*Olea europaea* L.) si ritiene sia sud caucasica (12.000 a.C.) sebbene molti la considerino una pianta prettamente mediterranea. Questa, infatti, si è ambientata molto bene nel bacino mediterraneo soprattutto nella fascia dell'arancio in cui appunto la coltura principe è quella degli agrumi associata in ogni modo a quella dell'ulivo: in questa fascia sono compresi paesi come l'Italia, il sud della Spagna e della Francia, la Grecia e alcuni Paesi mediorientali che si affacciano sul Mediterraneo orientale. L'ulivo è una specie tipicamente basitone, cioè che assume senza intervento antropico la forma tipicamente conica. Il tronco è contorto, la corteccia è grigia e liscia ma tende a sgretolarsi con l'età; il legno è di tessitura fine, di colore giallo-bruno, molto profumato (di olio appunto), duro ed utilizzato per la fabbricazione di mobili di pregio in legno massello. Le radici sono prevalentemente di tipo fittonante nei primi 3 anni di età, dal 4° anno in poi si trasformano quasi completamente in radici di tipo avventizio, superficiali e che garantiscono alla pianta un'ottima vigoria anche su terreni rocciosi dove lo strato di terreno che contiene sostanze nutrienti è limitato a poche decine di centimetri. Le gemme sono prevalentemente di tipo ascellare: da notare che in piante molto vigorose oltre che alle gemme a fiore (producono frutti con i soli primordi di organi produttivi) e a legno si possono ritrovare anche gemme miste (che producono sia fiori che foglie e rami). I fiori sono ermafroditi, piccoli, bianchi e privi di profumo, costituiti da calice (4 sepal) e corolla (gamopetala a 4 petali bianchi); sono raggruppati in mignole (10-15 fiori ciascuna) che si formano da gemme miste presenti su rami dell'anno precedente o su quelli di quell'annata. Le foglie sono di forma lanceolata, disposte in

verticilli ortogonali fra di loro, coriacee. Sono di colore verde glauco e glabre sulla parte superiore mentre presentano peli stellati su quella inferiore che le conferiscono il tipico colore argentato e la preservano a loro volta da eccessiva traspirazione durante le calde estati mediterranee.



Figura 4. *Olea Europea*

1.2 Il frutto

Il frutto (Fig. 5) è una drupa ovale ed è importante notare che è l'unico frutto dal quale si estrae un olio (gli altri oli si estraggono con procedimenti chimici o fisici da semi). Solitamente di forma ovoidale può pesare da 2-3 g per le cultivar di olio fino a 4-5 gr nelle cultivar da tavola. La buccia, o esocarpo, varia il suo colore dal verde al violaceo a differenza delle diverse cultivar. La polpa, o mesocarpo, è carnosa e contiene il 25-30% di olio, raccolto all'interno delle sue cellule sotto forma di piccole goccioline. Il seme è contenuto in un endocarpo legnoso, anche questo ovoidale, ruvido e di colore marrone: è facile trovare noccioli sprovvisti di embrione, soprattutto nelle cultivar Montalcino e Rossellino, che determina un deprezzamento del prodotto. Per le olive non esiste un periodo di raccolta ben precisa. Le olive si dividono, a seconda della maturazione dei frutti, in: a maturazione scalare, a maturazione contemporanea. Inoltre a differenza della loro precocità si suddividono in: precoci (Leccino, Rosciola e Moraiolo), medio-precoci (Cardoncella) e tardive (Frantoio).

Per le olive da olio si decide di effettuare la raccolta quando i frutti sono giunti a maturazione (solitamente dalla metà di Ottobre a tutto il mese di Dicembre), il che si deduce dall'invasatura dell'esocarpo (tipica e differente tra cultivar e cultivar); nelle olive da tavola la brucatura si può attuare sia prima che dopo l'invasatura (a seconda delle lavorazioni che dovranno subire). Importante, soprattutto per le olive da olio, è stimare bene il momento della loro raccolta tenendo a mente alcune considerazioni:

- la cascola pre-raccolta causa delle perdite significative sulla futura produzione di olio; il prodotto ottenuto comunque da olive cascolate è di qualità scadente: nelle cultivar soggette a tale fenomeno è bene anticipare la raccolta;

anticipando la raccolta si evitano sia danni da eventi atmosferici che da attacchi parassitari;

- le olive raccolte precocemente, con maturazione comunque già conclusa, hanno sia sapore più gradevole sia acidità più bassa sia resa di olio migliore;

- la prolungata permanenza dalle olive già mature sulla pianta porta le nuove gemme a non differenziarsi, favorendo così l'alternanza di produzione.

La raccolta delle olive si può effettuare sia manualmente sia meccanicamente. Quella manuale si divide in tre tipi diversi;

- brucatura: i frutti sono asportati grazie al solo ausilio delle mani e si depositano in ceste o canestri. Si arriva a 5-10 kg/h di olive da olio fino a 10-20 kg/h per quelle da tavola;

- pettinatura: le drupe vengono 'pettinate' o 'strisciate' con attrezzi detti pettini, e fatte cadere su teli o reti poste sotto gli alberi. La resa si aggira attorno a 15-25 kg/h per entrambe le categorie.

- raccattatura: praticata soprattutto in Liguria, Puglia e Sicilia e consiste nel raccogliere l'oliva quando questa è caduta naturalmente senza dover far intervenire manodopera come per i casi precedenti.

Invece quella meccanizzata si attua con i seguenti tipi di macchine:

- ganci o pettini oscillanti che, azionati da compressori e portati all'estremità di aste, permettono di raddoppiare la resa oraria;

- scuotitori da applicare alle branchie o direttamente al tronco. Ci sono in commercio macchinari scuoti-raccoglitori che abbinano l'apparato scuotitore a quello di intercettazione del prodotto. Le principali avversità biologiche sono date sia da agenti di danno (insetti) che da agenti di malattia (funghi o batteri). Quelle causate da agenti di malattia sono principalmente tre: Cicloconio o occhio di pavone: (*Cycloconium*

oleaginum) questa è una tra le più importanti e dannose malattie di origine fungina che attaccano l'olivo: di fatto colpisce soprattutto le foglie ma non risparmia né i rametti né i frutti. Sulle foglie si manifesta con macchie rotondeggianti di 10 mm costituite da cerchi concentrici policromatici (dal giallo al brunastro) che disegnano l'occhio di pavone e causano effetti di filloptosi sulle piante colpite; sui frutti i sintomi sono più occasionali e meno pericolosi e si manifestano come piccole macchioline nere infossate e puntiformi; i rametti sono attaccati solo sulla parte erbacea e i sintomi si manifestano simili a quelli delle foglie. La lotta è di tipo chimico, sia guidata sia integrata: prevede un campionamento delle foglie per determinare la soglia d'intervento (30-40 % delle foglie raccolte): se la soglia viene raggiunta o superata si interviene con un trattamento a Febbraio - Marzo e uno a Ottobre a base di rameici (Poltiglia bordolese, Idrossidi di rame) o ditiocarbammati (Zineb o Ziram).



Figura 5. Sezione dell'oliva

1.3 Olio extra vergine di oliva

L'olio d'oliva è uno dei componenti più importanti della Dieta Mediterranea, grazie alle sue caratteristiche organolettiche, proprietà nutrizionali e influenze culturali. Rispetto ad altri oli vegetali, la maggiore ricchezza degli oli d'oliva è dovuta

principalmente alle differenze nel processo di produzione (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2017). La composizione chimica dell'olio extra vergine d'oliva (EVO) è caratterizzata da due componenti principali: i composti saponificabili e gli insaponificabili. Il primo gruppo comprende triacilgliceroli (TAG), gliceridi parziali, esteri di acidi grassi o acidi grassi liberi e fosfatidi, e rappresentano quasi il 98% della composizione chimica dell'olio, mentre il secondo è formato da componenti minori come idrocarburi (squalene), fitosteroli (β -sitosterolo, stigmasterolo e campersterolo), tocoferoli, carotenoidi, pigmenti (clorofilla), alcoli alifatici e triterpenici, acidi triterpenici (acido oleanolico), composti volatili e polifenoli. Per quanto riguarda il primo gruppo di composti, gli acidi principali presenti nell'olio d'oliva sono oleico (C18:1, ω 9), palmitico (C16:0), palmitoleico (C16:1), stearico (C18:0), linoleico (C18:2, ω 6) e α -linolenico (C18:3, ω 3). Gli acidi miristico (C14:0), eptadecanoico ed eicosanoico si trovano invece in tracce. Tra i tocoferoli, il livello degli otto "E-vitameri" noti negli oli di oliva vergini si è dimostrato quasi composto dall'omologo α che comprende il 90% del contenuto totale di tocoferolo e si trova nella forma libera. Le clorofille sono espresse principalmente come feofitina α e, in misura minore, come feofitina β , mentre i principali carotenoidi trovati sono luteina e β -carotene, seguiti da composti minori come violaxantina, neoxantina, luteoxantina, antheraxantina, mutatoxantina e β -criptoxantina. Tutti questi composti contribuiscono, anche se in modo diverso, al sapore dell'olio e ai suoi benefici per la salute. Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza del ruolo protettivo di EVO rispetto allo sviluppo delle più comuni malattie degenerative nel contesto di una dieta equilibrata di tipo mediterraneo, e questo effetto benefico è stato attribuito sia al suo alto contenuto di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e ai componenti minori, principalmente alla frazione fenolica (Covas *et al.*, 2006). Rappresenta la fonte primaria di grassi ed è stato associato a una minore incidenza di malattie cardiache croniche (Guasch-Ferré *et al.*, 2014). In base alla descrizione e alla definizione riportata nei Regolamenti dell'Unione Europea gli oli d'oliva sono classificati in base alla loro qualità, in olio extravergine di oliva (EVO), olio d'oliva vergine (VOO) e olio d'oliva ordinario (OO). L'olio EVO è un olio di oliva vergine avente un'acidità libera massima in termini di acido oleico, minore di 0,8 g di acido per 100 g di olio; VOO è un olio di oliva vergine avente un'acidità libera massima di 2 g per 100 g; l'olio d'oliva ordinario è un olio d'oliva con acidità non superiore al 3,3%. Un'attenzione particolare è stata data ai composti trovati in EVO. I valori nutrizionali e salutistici, così come le proprietà biologiche di EVO, possono essere

attribuiti alle sue componenti bioattive inclusi acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi, tocoferoli e polifenoli, in particolare biofenoli, che sono i più rappresentati. Tra le proprietà benefiche di EVO, i suoi effetti antiossidanti sono stati intensamente studiati a causa del legame tra lo stress ossidativo e le malattie aterosclerotiche. Lo stress ossidativo è implicato nella patogenesi di diversi fattori di rischio di aterosclerosi, tra cui ipertensione, diabete e sindrome metabolica (Hajjar *et al.*, 2013). Gli oli d'oliva sono estratti da olive fresche solo per via meccanica e processi fisici (fresatura, gramolazione e centrifugazione), che consentono di mantenere intatte le proprietà del frutto, in particolare i composti legati alla sua capacità bioattiva (fenoli, tocoferoli, steroli, pigmenti, ecc.) (Tsimidou e Boskou, 2015).

1.4 Estrazione dell'olio extra vergine d'oliva

L'estrazione dell'EVO è un processo industriale di trasformazione agro-alimentare, attraverso il quale l'olio contenuto nelle cellule del mesocarpo, viene separato dalla fase solida e da quella acquosa. L'estrazione richiede che i trigliceridi e i composti minori in esso disciolti, a cominciare dai composti fenolici, siano resi il più possibile disponibili alla separazione attraverso la trasformazione delle olive in pasta d'olive. La conseguente rottura del frutto in un fluido plastico viscoso, ricco d'acqua e di ossigeno disciolto, dà origine in funzione dei tempi e delle temperature operative ad una serie di fenomeni enzimatici ed idrolitici a carico dei componenti dell'olio, la cui ottimizzazione è decisiva per la caratterizzazione in positivo o in negativo dell'olio estratto. In tutte le operazioni la corretta scelta degli impianti da utilizzare e delle condizioni operative da adottare passa attraverso la scelta del giusto equilibrio tra fenomeni estrattivi e fenomeni di trasformazione. La frangitura delle olive rappresenta una fase fondamentale per la qualità dell'olio estratto meccanicamente. Infatti tutti i composti fenolici di un olio si originano durante il processo frangitura per cui questo risulta essere un punto critico nella produzione dell'olio vergine di qualità.

La concentrazione fenolica nell'olio vergine di oliva è strettamente correlata all'attività del patrimonio enzimatico endogeno nel frutto dell'oliva. Durante il processo di frangitura (Capella *et al.*, 1997) si ha l'attivazione del patrimonio enzimatico endogeno, in particolare vi è l'attivazione della β -glucosidasi contenuta nell'epicarpo del frutto. Questo enzima catalizza l'idrolisi di oleuropeina,

demetiloleuropeina e ligstroside contenuti nel frutto dell'oliva portando alla formazione dei corrispondenti agliconi. Durante il processo di frangitura oltre all'attivazione della β -glucosidasi, si attivano anche complessi enzimatici quali polifenolossidasi (PPO) e perossidasi (POD). Questi ultimi hanno effetto negativo sulla qualità sensoriale e salutistica degli oli, aspetto strettamente connesso alla presenza di alcune classi di composti chimici come le sostanze fenoliche. In particolare PPO e POD catalizzano la degradazione delle sostanze fenoliche nella fase di gramolatura. In questo contesto diventa di notevole impatto il tipo di tecnologia utilizzata per la frangitura e i parametri relativi alla gramolatura. I punti critici di quest'ultimo processo sono: la temperatura, il tempo di esposizione e il tipo di atmosfera. Questi parametri influenzano il profilo fenolico e, quindi, le caratteristiche degli oli corrispondenti. La gestione del patrimonio antiossidante dell'olio durante la gramolatura ed il controllo delle variabili che sono implicati in questa fase sono pertanto indispensabili per l'ottenimento di un prodotto che sia apprezzabile dal punto di vista qualitativo e salutistico. Le linee di lavorazione nell'estrazione meccanica differiscono per i metodi utilizzati nelle singole fasi, pertanto esistono differenti tipologie di impianto. L'estrazione dell'olio d'oliva consiste tipicamente in tre fasi operative:

- frantumazione delle olive tramite frangitura o molitura, in cui le cellule del frutto vengono scomposte e l'olio rilasciato;
- miscelazione, in cui la pasta rimanente viene miscelata lentamente per aumentare la resa in olio;
- separazione dell'olio dai componenti residui. Quest'ultima fase potrebbe essere condotta secondo uno dei seguenti processi: processo di pressatura discontinua tradizionale, sistema di estrazione centrifuga a 3 fasi centrifuga o a 2 fasi. L'acqua viene aggiunta in alcuni di questi passaggi per spremere la maggior parte dell'olio dall'oliva. I benefici biologici della salute dovuti al consumo di olio d'oliva non sono solo legati all'alto contenuto di grassi monoinsaturi. Infatti, diversi componenti minori hanno anche importanti proprietà bioattive contribuendo al suo valore nutrizionale. Tra questi, i polifenoli hanno ricevuto recentemente grande attenzione (Shahidi e Ambigaipalan, 2015), in quanto giocano un ruolo chiave nella salute umana, attraverso i loro effetti protettivi contro le malattie neurodegenerative e cardiovascolari (Olmo-García *et al.*, 2017;) proteggendo il corpo dal danno ossidativo. Diversi lavori hanno dimostrato le correlazioni positive tra l'assunzione giornaliera di composti fenolici

tipici della dieta mediterranea e salute (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2016;). Di recente, l'EFSA (European Food Safety Authority) ha riconosciuto un'indicazione sulla salute associata al contributo di "polifenoli di olio d'oliva" per la protezione dei lipidi del sangue da stress ossidativo, che è consentito solo per "oli d'oliva contenenti almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati (inclusi oleuropeina e tirosolo) per 20 g di olio d'oliva" (regolamento (UE) 432/2012 della Commissione, EFSA, 2012). I principali polifenoli che si trovano negli oli di oliva vergini sono tirosolo, idrossitirosolo, acido 4-idrossibenzoico e acido 4-idrossifenilacetico, insieme a lignani, secoiridoidi e flavonoidi (García-Villalba *et al.*, 2010). Sebbene tutti siano classificati come composti fenolici, non tutti sono inclusi nel suddetto claim salutistico. Tuttavia, il contenuto di composti fenolici nell'olio di oliva (sia qualitativi che quantitativi) è fortemente influenzato da diversi fattori, dando origine a oli di oliva con composizione e qualità diverse nel corso degli anni.

Tra i fattori da considerare, ci sono la tipologia di cultivar, l'origine geografica, l'irrigazione, le condizioni climatiche, i processi di produzione, la maturazione dei frutti, i metodi di raccolta, la freschezza del frutto prima dell'estrazione, il metodo di estrazione e le condizioni di conservazione (Gómez-Caravaca *et al.*, 2016). Quindi, anche nelle condizioni produttive e tecnologiche più adeguate, lo stesso albero può dare origine a oli di oliva con composizioni diverse negli anni, essendo difficile identificare le cultivar più adeguate per garantire una ricchezza bioattiva coerente (se non studiate per un lungo periodo di tempo). Finora, la maggior parte degli studi si è concentrata solo sulla valutazione composizione fenolica di olio d'oliva su brevi periodi (uno o due anni) e pochissimi fino a tre anni, il che non è sufficiente per sostenere davvero le conclusioni.

1.5 Prodotti di scarto

I reflui oleari sono considerati inquinanti, nonostante si tratti di prodotti naturali, poiché i composti di natura organica presenti si degradano provocando un aumento dei livelli di BOD (domanda biochimica di ossigeno dei microorganismi aerobi presenti) e di COD (domanda chimica di ossigeno per la completa ossidazione dei composti organici). Anche la presenza di un elevato contenuto salino, un basso valore di pH e di sostanze biotossiche conferiscono ai reflui una spiccata azione antimicrobica e fitotossica (Doula *et al.*, 2017). La produzione di olio d'oliva genera una grande

quantità di acque reflue, un potente inquinante che è attualmente scartato ma potrebbe essere considerato come una potenziale fonte di preziosi prodotti naturali a causa del suo contenuto in composti fenolici e altri antiossidanti naturali. Il mix tra l'acqua di vegetazione d'oliva e l'acqua sottoposta a processo si chiama acqua di frantoio (olive mill waste waters, OMWW). Tra i tre processi di produzione dell'olio d'oliva, la pressione e i sistemi di centrifugazione a 3 fasi generano enormi quantità (fino a 30 milioni di m³ all'anno) di OMWW (El-Abbassi *et al.*, 2013). Anche se meno ecologici, questi due processi sono ancora largamente in uso, specialmente nell'area mediterranea dove inducono la produzione di grandi volumi di OMWW durante un brevissimo periodo dell'anno (da novembre a febbraio). Questi due elementi (concentrazione nel tempo e nella posizione) combinati con il contenuto di OMWW in sali, metalli pesanti o composti fenolici svolgono un ruolo importante nell'impronta ecologica negativa della produzione di olio d'oliva, rafforzata dagli impianti di trattamento di specifici OMWW insufficienti e dalle cattive pratiche come il loro dumping illegale sul suolo o nei fiumi circostanti (McNamara *et al.*, 2008). Questo rifiuto è uno degli effluenti più nocivi prodotti dalle industrie agroalimentari a causa del suo alto carico inquinante e dell'elevata tossicità per l'intero ecosistema (piante, batteri, organismi acquatici e aria) a causa del suo pH acido e del suo contenuto in sostanze organiche come i fenoli (Dermeche *et al.*, 2013). Come esempio della portata dell'impatto ambientale di OMWW, si deve notare che 10 milioni di m³ all'anno di questo effluente sono equivalenti alle acque reflue generate da circa 20 milioni di persone (McNamara *et al.*, 2008). Pertanto, il trattamento o la valorizzazione di OMWW è un importante problema ambientale. Rispetto alle acque di vegetazione, la sansa ha goduto di maggiore considerazione da parte degli operatori del settore, poiché rappresenta la materia prima da cui ottenere l'olio di sansa e al giorno d'oggi non è assolutamente contemplata la possibilità di sprecare tale sostanza, in quanto rappresenta una risorsa economica intorno alla quale si è sviluppato un mercato imponente, oltre che una fonte di reddito per i frantoi; La sansa di olive, infatti, viene di solito venduta ai sansifici dove subisce successivi e differenti processi di lavorazione, dai quali è possibile ottenere l'olio di sansa, il nocciolino di sansa vergine, la sansa esausta e il nocciolino di sansa esausta, utilizzati come biomasse.

1.6 Indicatori per la tutela della qualità dell'olio EVO

La tutela della qualità e della genuinità degli oli extra vergine di oliva viene attuata con i metodi previsti dal Regolamento n. 2568/91/CEE e successive modificazioni, che fissa anche dei precisi limiti per i parametri chimici, chimico-fisici e per la valutazione organolettica. Dal 1° aprile 2011 l'Unione Europea ha emanato un'ulteriore modifica del regolamento citato Reg. n. 61/2011/UE. G.U. L 23 del 27/01/2011 che, recependo le indicazioni provenienti dal Consiglio Olivicolo Internazionale (COI) di Madrid, il quale a sua volta si è fatto portavoce della comunità scientifica internazionale, ha introdotto l'analisi degli alchil esteri (AE), come una determinazione analitica riproducibile ed affidabile ad efficace supporto della qualità dell'olio extra vergine di oliva. È avvenuta una successiva modifica (UE) numero 1348/2013 che classifica in particolare gli esteri etilici come indicatore in grado di rilevare miscele fraudolente di oli extra vergine di oliva con oli di qualità inferiore. Questi ultimi potrebbero appartenere alle categorie di oli vergini, lampanti o deodorati, anche se alchilici gli esteri sono considerati marcatori specifici della materia prima (Olive). Un incremento di esteri alchilici può essere osservato negli oli di oliva ottenuti da olive non di buona qualità, cioè danneggiate o conservate in cattive condizioni. In tali casi, la produzione di etanolo dalla fermentazione degli zuccheri di oliva, e di acidi grassi liberi dalla lipolisi, è un evento comune che innesca la sintesi di esteri alchilici. Molto usata è la procedura illegale di aggiunta oli deodorizzati agli oli extra vergine di oliva. La deodorizzazione è in realtà un processo di rimozione il cui fine è rimuovere i sapori incommestibili provenienti dalla lavorazione dell'olio. Per esempio, l'olio d'oliva "lampante", che è non commestibile a causa dei suoi acidi grassi liberi e sapori sgradevoli contenuto, è sottoposto a questa procedura per essere commercializzato. Generalmente, nella deodorizzazione, il vapore viene fatto passare attraverso l'olio bollente a pressione ridotta a temperature superiori a 200 ° C. Dopo il trattamento, l'olio viene miscelato con olio d'oliva o olio di oliva e commercializzato come "olio d'oliva", che è ovviamente meno prezioso di EVO. Normalmente, la deodorizzazione influisce molto su alcuni specifici parametri chimico-fisici, che producono oli deodorati facilmente distinguibile dagli EVO. Di recente, una versione delicata di deodorizzazione sta diventando popolare nell'adulterazione dell'olio d'oliva, che rende gli oli in grado di superare i test tradizionali applicati per controllo qualità. La lieve deodorizzazione avviene a livello inferiore temperature (120 °C), per un tempo ridotto e sottovuoto. Si stima che questo tipo di adulterazione sia drammaticamente diffusa, soprattutto in considerazione dell'allarme basso costo di numerose marche di

EVO che possono essere trovati in gli scaffali dei supermercati. Come stabilito dal regolamento UE numero 61/2011, la presenza di oli leggermente deodorizzati negli oli d'oliva sono accompagnati da un parallelo incremento di metile e esteri etilici di acidi grassi (FAME e FAEE) negli olii trattati. Tali composti derivano normalmente dall'esterificazione del libero acidi grassi con alcoli a catena corta (etanolo e metanolo). Il loro livello nell'olio d'oliva dipende dalla disponibilità dei precursori ed enzimi, come nel caso dell'utilizzo di olive troppo mature per la produzione di petrolio. È stato rilevato da alcuni ricercatori che oli extra vergine di elevata qualità non contengono praticamente alchil esteri, i quali si formano principalmente in seguito a processi di fermentazione subiti dalle olive dal momento della raccolta al processo estrattivo, gli stessi responsabili di difetti organolettici quali riscaldamento/morchia, avvinato e anche muffa. L'etanolo prodotto dal metabolismo aerobico dei microorganismi presenti in olive di cattiva qualità e il metanolo, prodotto dalle pectine metilesterasi, possono esterificare gli acidi grassi liberi e produrre gli alchil esteri (Valli *et al.*, 2013). La presenza, nell'olio, di alchil esteri al di sopra dei limiti rivela dunque lo stato di degradazione delle olive di partenza ed il loro contenuto non aumenta durante la conservazione se non minimamente e a carico soprattutto dei metil esteri. Da queste considerazioni è scaturito il limite proposto dal Reg. N. 61/2011/UE Reg. n. 61/2011/UE. G.U. L 23 del 27/01/2011 per la categoria olio extra vergine di oliva di 75 mg/kg per tali sostanze. A seguito di ciò ed in modo più restrittivo, la legislazione italiana con il Decreto Legge n. 83/2012, cosiddetto decreto sviluppo convertito dalla legge 7 agosto 2012 n. 134, all'art. 43 comma 1-bis Legge 7/08/2012 n. 134. G.U. n. 187 dell'11/08/2012, al fine di garantire ulteriormente l'immissione sul mercato di oli extra vergine di oliva di buona qualità ottenuti da produzioni agricole italiane che attualmente devono confrontarsi con i prodotti della grande distribuzione etichettati spesso impropriamente come extra vergini, ha stabilito che detti oli abbiano, oltre un'irrepreensibile quadro organolettico, un contenuto in alchil esteri minore o uguale a 30 mg/kg. Il REG. 1348/2013 è l'ultimo regolamento che introduce nuovi valori limite in conformità col Consiglio Oleicolo Internazionale (COI). In particolare definisce i seguenti limiti relativi solo agli etil esteri degli acidi grassi e non più ai metil esteri: EEAG \leq 40mg/kg (2012-2013) EEAG \leq 35mg/kg (2014-2015) EEAG \leq 30mg/kg (>2015). A differenza degli alchil esteri, le cere e gli stigmastadieni sono stati introdotti nella norma comunitaria come parametri di genuinità: le cere consentono di svelare, insieme all'analisi relativa al contenuto di alcoli alifatici totali, l'aggiunta di olio di sansa ad oli di pressione, in quanto il primo è più ricco di cere a causa dell'estrazione con solventi; la

determinazione degli idrocarburi steroidei di neoformazione originati per deidratazione dagli steroli, a seguito di drastici trattamenti con terre attive, è un metodo ufficiale per l'individuazione di oli raffinati in oli vergini. Le cere, inoltre, essendo più facilmente estraibili da olive troppo mature, in cui è probabile che processi di degradazione siano già in atto, sono indicatori anche di cattiva qualità. L'acidità è un parametro importantissimo che ci dà informazioni sulla qualità delle olive molite. Attacchi di mosca, cattiva conservazione e altri difetti sul frutto si ripercuotono su questo parametro. L'extravergine deve avere un'acidità inferiore a 0,8 % ma oli di ottima qualità hanno valori non superiori a 0,1-0,2%. I perossidi sono un parametro importante soprattutto in fase di conservazione del prodotto e sono influenzati da luce, temperatura e presenza di ossigeno. L'analisi dell'ultravioletto (Fig. 6) è una tipologia di analisi che oltre a fornire utili elementi di giudizio sulla qualità di un olio, contribuisce a risolvere il problema del riconoscimento dell'olio rettificato eventualmente aggiunto all'olio di oliva vergine, sfruttando il fatto che gli oli naturali non contengono doppi legami coniugati che invece si formano, sia pure in misura minima, durante la rettifica, particolarmente nella fase di decolorazione su terre attive, e questi composti assorbono proprio a 270 nm. Ne consegue che i rettificati presentano valori di assorbimento nell'UV notevolmente superiori a quelli dei vergini. Questo tipo di analisi ha una doppia valenza sia qualitativa che di conformità. Si intende per K270 o K232 il coefficiente di estinzione alle lunghezze d'onda specifiche, ovvero l'assorbimento di luce ultravioletta da parte del campione. L'ossidazione primaria determina un aumento del K232 mentre l'ossidazione secondaria determina un aumento del K270. La formazione di idroperossidi da acidi grassi polinsaturi provoca uno slittamento del doppio legame e un aumento dell'assorbimento a 232 nm. Inoltre, durante la rettifica degli oli lampanti ossidati, il passaggio su terre attive provoca la formazione di trieni coniugati aventi una banda di assorbimento, con tre massimi, intorno ai 270 nm. Anche la formazione di composti chetonici, per ossidazione ancora più spinta (ossidazione secondaria), provoca un maggiore assorbimento che si manifesta attorno ai 270 nm. L'esame UV viene condotto sull'olio disciolto in opportuno solvente (cicloesano o isoottano) nell'intervallo compreso tra i 220 e i 280 nm.

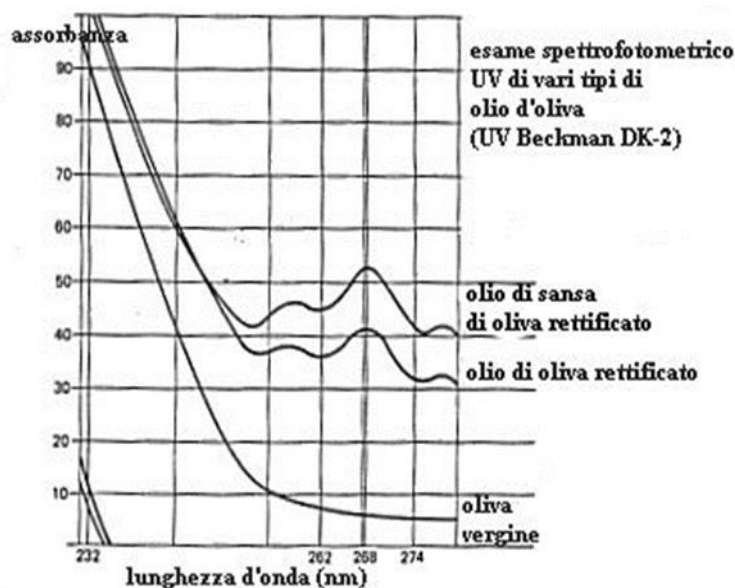


Figura 6. Rappresentazione dello spettro di tre tipologie di oli

1.6.1 Panel Test

Il Panel Test è l'analisi organolettica eseguita da un gruppo di assaggiatori addestrati (panel). Esso è descritto nell'allegato XII del Regolamento CEE 2568/01 e nelle successive modifiche. L'esame organolettico deve essere effettuato in un ambiente adeguato, funzionale e normalizzato che agevoli il lavoro e tenda a favorire la ripetibilità e la riproducibilità dei risultati. Il laboratorio sensoriale, sala panel, qualunque sia la sua superficie, dovrà accomodare tra le 8 e le 12 cabine di assaggio. Le caratteristiche costruttive della cabina di assaggio sono dettagliatamente spiegate nel documento COI/T.20/Doc. n. 6/Rev.1 e sono tali da assicurare una buona stabilità e favorire la percezione delle sensazioni olfattive. Il bicchiere per l'assaggio deve essere in vetro resistente di colore scuro perché il colore non deve influenzare l'assaggiatore in quanto il colore non rappresenta un indice di qualità. Generalmente il bicchiere per l'assaggio dell'olio è in vetro blu, ma può essere anche in vetro color ambra.. 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 (Fig. 7). Nel momento in cui viene presentato 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 parametro molto importante ai fini dell'oggettività del giudizio è la temperatura di assaggio dell'olio in quanto può modificare profondamente le percezioni sensoriali. Il

metodo prescrive che il bicchiere sia mantenuto alla temperatura di 28 ± 2 °C utilizzando apposite piastre riscaldanti. Il campione deve essere presentato in maniera anonima. L'assaggio si articola nel seguente modo: si versa l'olio nel bicchiere, si riscalda ad una temperatura di 30°C, si annusa 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 retro nasale, dei composti aromatici volatili. La scheda dell'assaggio è costituita da una parte superiore in cui 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 percepito. Il segno sarà collocato ad una distanza dall'origine proporzionale all'intensità di percezione dello stimolo. Ultimata 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.



Figura 7. Raffigurazione Panel test

L'analisi sensoriale consiste invece nell'analisi qualitativa di un olio d'oliva attraverso l'utilizzo dei sensi, per la sua classificazione merceologica. Esso è un valido strumento per la valorizzazione degli oli di eccellenza e per il riconoscimento di quelli DOP e IGP.

Per eseguire l'analisi organolettica vengono utilizzate diverse sensibilità:

- la sensibilità olfattiva ha sede sul fondo delle fosse nasali, principalmente nella regione superiore della cavità nasale dove sono localizzate le cellule olfattive che fungono da recettori. Le sostanze inalate inviano uno stimolo chimico alle cellule olfattive, che riconoscono la sensazione odorosa grazie all'associazione con un alimento noto nel quale quell'odore è particolarmente presente con forte intensità. La percezione della stimolazione esterna chimica può essere ottenuta anche per via indiretta attraverso il percorso retronasale. È proprio quest'ultima via che permette una valutazione accurata delle sensazioni aromatiche, dal momento che le sostanze odorose volatili (molecole gassose) sostano più a lungo a contatto delle cellule olfattive;

-la sensibilità gustativa ha sede essenzialmente sulla lingua dove, grazie alla presenza di papille gustative di diversa forma (fungiformi, filiformi, fogliate), vengono percepiti 4 sapori (il salato, il dolce, l'acido o aspro e l'amaro) a livello di diverse regioni. In particolare, la punta della lingua, ricca di papille fungiformi, è stimolata dalle sostanze dolci, mentre ai lati è percepita in maniera preponderante la sensazione di "salato", grazie alla presenza delle papille filiformi; dietro queste, le papille fogliate prediligono l'acido/aspro, mentre la base della lingua, ricca di papille circumvallate, è stimolata da sostanze amare. Nella valutazione organolettica degli oli vergini di oliva, il senso del gusto viene impegnato essenzialmente nella percezione della nota "amara", dovuta prevalentemente all'oleuropeina. Il salato non è percepibile perché nell'olio non si trovano sali. L'acido, invece, non viene riconosciuto dal momento che gli acidi grassi dell'olio non sono rilevati dalle papille gustative a causa dell'elevato peso molecolare, superiore alle dimensioni dei recettori stessi;

-la sensibilità chimica è allocata lungo la mucosa della bocca e percepisce il piccante e l'astringente. La sensazione del piccante è dovuta all'infiammazione del nervo trigemino quando nell'olio sono presenti le sostanze fenoliche;

-la sensibilità tattile chinestetica percepisce la fluidità dell'olio, dovuta essenzialmente alla concentrazione degli acidi grassi insaturi.

Gli attributi positivi dell'olio sono:

-fruttato: insieme delle sensazioni olfattive, che dipendono dalla varietà delle olive, caratteristiche dell'olio ottenuto da frutti sani e freschi, verdi o maturi, percepite per via diretta e/o retronasale;

- amaro: sapore elementare caratteristico dell'olio ottenuto da olive verdi o invaiate, percepito dalle papille caliciformi che formano la V linguale;

- piccante: sensazione tattile di pizzicore caratteristica degli oli prodotti all'inizio della campagna, principalmente da olive ancora verdi, che può essere percepita in tutta la cavità orale, in particolare in gola.

Gli attributi negativi dell'olio sono:

- cotto o stracotto: flavor caratteristico dell'olio dovuto a eccessivo e/o prolungato riscaldamento, che si verifica in particolare durante la termo-gramolatura, se realizzata in condizioni termiche inadeguate;

-fieno - legno: flavor caratteristico di alcuni oli provenienti da olive secche;

-grossolano: sensazione orale/tattile densa e pastosa prodotta da alcuni oli vecchi;

- lubrificanti: flavor dell'olio che ricorda il gasolio, il grasso o l'olio minerale;

- acqua di vegetazione: flavor acquisito dall'olio a causa di un contatto prolungato con le acque di vegetazione che hanno subito un processo di fermentazione;

- salamoia: flavor dell'olio estratto da olive conservate in salamoia;

- metallico: flavor che ricorda il metallo. È caratteristico dell'olio mantenuto a lungo in contatto con superfici metalliche durante i procedimenti di frangitura, gramolatura, pressione o stoccaggio;

- sparto: flavor caratteristico dell'olio ottenuto da olive pressate in fiscoli di sparto nuovi. può presentare caratteristiche diverse a seconda dello sparto utilizzato per costruire i fiscoli (sparto verde o secco);

- verme: flavor dell'olio ottenuto da olive fortemente colpite da larve di mosca dell'olivo (*Bactroceraoleae*);

- cetriolo: flavor dell'olio che ha subito un condizionamento ermetico eccessivamente prolungato, particolarmente in lattine, e che viene attribuito alla formazione di 2,6-nonadienale.

CAPITOLO 2

Composti fenolici

2.1 Fenoli

I composti fenolici più importanti che sono stati identificati in EVO possono essere suddivisi in diversi gruppi come acidi fenolici (in particolare derivati di acidi idrossibenzoici e idrossicinnamici), alcoli fenolici tra cui idrossitirosolo (3,4-diidrossifeniletanolo, HTy), tirosolo (4-idrossifeniletanolo, Ty) e i loro derivati con acido elenolico, quali i secoiridoidi (oleuropeina e ligstroside e i corrispondenti agliconi), lignani (pinoresinolo, 1-acetossipinoresinolo e siringaresinolo) e flavoni (luteolina e apigenina) (Bendini *et al.*, 2007). Il contenuto fenolico dell'olio extra vergine di oliva è influenzato da diversi fattori: la data di raccolta, durante la quale la composizione qualitativa e quantitativa delle sostanze fenoliche subisce forti fluttuazioni, tecniche di lavorazione industriale e metodi di conservazione e conservazione (Cerretani *et al.*, 2006). I fenoli sono metaboliti secondari tipici della cellula vegetale, caratterizzati dalla presenza di almeno un anello fenolico nella loro struttura. Negli organismi vegetali sono presenti fenoli semplici e complessi che, a differenza degli alcaloidi, costituiscono una linea di difesa contro l'aggressione di potenziali patogeni, attraendo al contempo gli insetti impollinatori e dunque svolgendo una duplice attività difensiva e attrattiva. I composti fenolici, presenti in abbondanza nell'olio di oliva e nei vini, grazie alla presenza dei gruppi ossidrilici nella loro struttura, sono capaci di catturare i radicali liberi, ossidandosi a chinoni e dunque esercitando una naturale azione antiossidante (Fernández-Bolaños *et al.*, 2012) (Fig. 8).

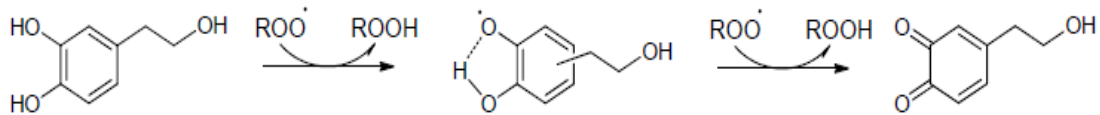


Figura 8. Meccanismo d'azione dell'idrossitirosolo come radical scavenger.

2.2 Proprietà dei fenoli

I composti fenolici hanno mostrato un ampio spettro di attività: si prestano bene come antiossidanti, scavenger per radicali liberi, antiinfiammatori, antitumorali, con un buon rapporto sicurezza/tossicità. In seguito ad ingestione, possono mostrare capacità antiossidante locale nel tratto gastrointestinale e successivamente, dopo l'assorbimento e il metabolismo, possono mostrare la loro attività a livello cellulare. D'altra parte, oltre alle capacità antiossidanti, sono state studiate altre proprietà benefiche, quali effetti neuroprotettivi, cardioprotettivi, antiinfiammatori, antiipertensivi e antitumorali (Elgebaly *et al.*, 2018). L'effetto dei fenoli sui meccanismi fisiopatologici coinvolti in malattie cardiovascolari è stato caratterizzato solo in parte; questi effetti includono l'inibizione dell'aggregazione piastrinica, l'inibizione dell'ossidazione delle LDL, la stimolazione della produzione di NO e la down-regulation dell'espressione di molecole di adesione endoteliale (Bernini *et al.*, 2015). Studi epidemiologici hanno mostrato una correlazione inversa tra il consumo di fenoli dell'olio di oliva e l'incidenza di tumori, in particolare del cancro al colon-retto, del cancro al seno e di tumori alla prostata. Studi su animali hanno anche dimostrato la protezione da parte dei fenoli dell'olio d'oliva verso la carcinogenesi indotta chimicamente, come il cancro cutaneo causato dai raggi UV (Galanakis *et al.*, 2018) e tumori epatici spontanei. Altri studi hanno riportato che l'oleuropeina provoca una regressione del tumore (Sherif e Al-Gayyar, 2018). Di conseguenza, le prove epidemiologiche e sperimentali suggeriscono un possibile ruolo dei fenoli dell'olio d'oliva come HTy nella prevenzione e nel trattamento del cancro.

2.3 Idrossitirosolo

Tra i costituenti minori dell'olio extravergine di oliva, l'idrossitirosolo (2, (3,4-diidrossifenil) etanolo, Hty) è considerato uno dei più efficaci antiossidanti derivato dall'idrolisi chimica o enzimatica del glicoside oleuropeina. Il consumo di HTy ha diversi benefici per la salute e i meccanismi responsabili di questi effetti sono stati principalmente attribuiti alla sua capacità di eliminare le specie reattive dell'ossigeno e di migliorare i sistemi antiossidanti endogeni. In studi precedenti condotti su epatociti primari di ratto (Priore *et al.*, 2015), è stato scoperto che HTy (da solo o come parte di un estratto grezzo) si distingue per la sua capacità di modulare anche alcune attività enzimatiche rilevanti per il metabolismo lipidico.

Un grande numero di prove indica che HTy è un potente antiossidante e la sua capacità di ridurre le specie reattive dell'ossigeno (ROS) in esperimenti sia in vitro che in vivo è stata ben documentata (Echeverría *et al.*, 2017). Lavori recenti hanno evidenziato che i ROS promuovono l'espressione delle proteine leganti gli elementi regolatori degli steroli (SREBPs) e dei fattori di trascrizione coinvolti nella sovraregolazione degli enzimi chiave della lipogenesi e della colesterogenesi (Damiano. *et al.*, 2013). Il trattamento con un antiossidante riduce il ROS, sopprime l'accumulo di gocce lipidiche e ritarda la neurodegenerazione (Liu *et al.*, 2015). Oltre all'effetto antiossidante riportato, la supplementazione di HTy alle cellule C6 del glioma determina un effetto di riduzione precoce e diretto della sintesi degli acidi grassi e della colesterogenesi. Questo effetto può essere almeno parzialmente ascritto a un meccanismo molecolare che coinvolge la down-regulation dell'espressione di ACC e idrossimetilglutaril-CoA reductasi (HMGCR). Questa diminuzione è più evidente quando l'acido oleico (OA) viene aggiunto alle cellule insieme a HTy, indicando nella maggior parte dei casi un effetto additivo di questi componenti di EVO sul metabolismo lipidico. Quindi, anche questo aspetto dovrebbe essere considerato nel determinare l'azione benefica dei componenti di EVO, OA e HTy, nella disfunzione cerebrale quando si verificano alterazioni del metabolismo lipidico. Una questione importante riguarda la biodisponibilità dei composti fenolici di EVO. HTy è assorbito in modo dose-dipendente negli esseri umani. I dati sulle concentrazioni di fenolo nel plasma che possono essere raggiunti nell'uomo dopo il consumo di olio d'oliva sono scarsi e controversi (; De la Torre *et al.*, 2008). Ciò può essere dovuto a una serie di fattori, tra cui i livelli molto variabili di fenoli trovati in EVOO (50-800 mg / kg); il livello di assunzione alimentare di olio d'oliva; il metodo e il tempo scelti per la quantificazione del fenolo plasmatico (Visioli *et al.*, 2000). La maggior parte di HTy è presente nel plasma e nelle urine in forme coniugate, principalmente glucuro-coniugati, suggerendo un ampio metabolismo intestinale / epatico di primo passaggio dell'HTy ingerito (Miro-Casas *et al.*, 2003). Tuttavia, una concentrazione plasmatica di HTy fino a 15 µM è stata misurata nell'uomo durante le prime 4 ore dopo l'ingestione di 40 mL di olio d'oliva contenente una quantità considerevole di fenoli (366 mg / kg) (Covas *et al.*, 2006). Inoltre, è stato stabilito che HTy è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, sebbene presenti un basso assorbimento cerebrale (Rodríguez-Morató *et al.*, 2015). Nonostante le notevoli proprietà (EFSA, 2011) e sebbene siano disponibili varie procedure per la sua sintesi ed estrazione, HTy è ancora raramente

usato come integratore alimentare o come stabilizzatore negli alimenti, nelle preparazioni cosmetiche o industriali, probabilmente per l'elevata instabilità all'aria e per il suo carattere amfifilico, che ne rendono difficile sia l'estrazione da soluzioni acquose, sia la solubilizzazione in ambiente lipidico (Tofani *et al.*, 2010). Recentemente, è stato dimostrato che l'integrazione della dieta con HTy può migliorare la colite cronica attraverso la sintesi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) e la sua capacità antiossidante (Aparicio-Soto *et al.*, 2014). Alcuni studi sperimentali hanno dimostrato che la somministrazione di VOO o HT isolato ha un effetto neuroprotettivo nel tessuto cerebrale di ratto, che colpisce i principali percorsi biochimici di danno cerebrale in ischemia (De La Cruz *et al.*, 2015).

In campioni di sangue umano è stato anche riportato che l'Hty inibisce la produzione di interleuchina (IL)1 β in leucociti indotti con lipopolisaccaride batterica (González-Correa *et al.*, 2009). Inoltre, nelle colture di leucociti umani Hty inibisce l'espressione di fattori stimolanti per la sintesi di citochine (NF κ B, STAT-1 α , IRF-1) (Rosignoliet *al.*, 2013); è stato dimostrato nei macrofagi attivati che Hty non inibisce direttamente l'attività di enzimi inducibili (iNOS e COX-2) ma regola negativamente i fattori di trascrizione per la sintesi e l'espressione di questi enzimi. Questi risultati possono spiegare la relazione tra l'effetto di Hty sulla produzione di IL1 β e la capacità antiossidante di questo composto, in quanto i radicali liberi sono i principali responsabili dell'attivazione di questi fattori di trascrizione. Queste alterazioni biochimiche possono in parte spiegare la maggiore morte neuronale dopo riossigenazione da ipossia in animali diabetici che in animali normoglicemici. Questa maggiore sensibilità alla morte cellulare dopo lesione ischemica è stata documentata in modelli sperimentali *in vivo* di ischemia-riperfusion (Liu *et al.*, 2015) e riossigenazione da ipossia in fettine di cervello da ratti diabetici (González-Correa *et al.*, 2006). Il trattamento con Hty negli animali diabetici ha ridotto l'efflusso di LDH nelle porzioni di cervello dopo il modello di riossigenazione da ipossia. I tassi percentuali di riduzione della morte neuronale erano rispettivamente 25,9, 37,5 e 41,0% dopo la somministrazione di 1, 5 e 10 mg / kg / die di Hty. Hty fornisce protezione del DNA e riduce lo stress ossidativo in un'area specifica del cervello, in parte attraverso l'attivazione dell'eme ossigenasi (HO-1). In precedenti lavori, Hty ottenuto da VOO ha avuto un effetto neuroprotettivo in un modello sperimentale di diabete indotto nei ratti (De La Cruz *et al.*, 2010). Le vie biochimiche con cui Hty produce questo effetto sembrano essere le stesse degli animali normoglicemici,

sebbene questi percorsi siano più compromessi negli animali diabetici. Per quanto riguarda l'effetto dell'HTy sui componenti biochimici di un modello sperimentale di infiammazione tissutale, l'effetto sulla prostaglandina E₂ (PGE₂) dipende dall'espressione e dall'attività dei tipi cicloossigenasi 1 (COX-1) e 2 (COX-2). L'inibizione specifica della COX-2 è risultata correlata molto meglio con un effetto neuroprotettivo che inibisce COX-1 o COX-1 / COX-2 non specifica (López-Villodres *et al.*, 2012). Inoltre, nei campioni di sangue umano è stato riscontrato che HT inibisce entrambi COX-1 e COX-2 (González-Correa *et al.*, 2009).

L'idrossitirosole possiede attività antiproliferative, pro-apoptotiche e antiinfiammatorie, potenzialità che lo rendono in grado di contrastare i segni del cancro. L'idrossitirosole può proteggere le cellule dallo stress ossidativo attraverso un'attività antiossidante diretta e una indiretta (Bernini *et al.*, 2013). Nel primo caso HTy impedisce il danno ossidativo del DNA nelle cellule mononucleate del sangue, contrastando efficacemente la fase di iniziazione della cancerogenesi in vivo, in quanto le concentrazioni utili di HTy potrebbero essere facilmente raggiunte con l'assunzione di olio d'oliva.

2.4 Derivati dell'Idrossitirosole

L'idrossitirosole, nonostante le sue molteplici funzioni positive, è una molecola poco stabile, ha una limitata solubilità nei mezzi lipidici. Inoltre, ha uno scarso assorbimento e una veloce eliminazione nell'uomo. Tutti questi fattori hanno indotto a creare nuove molecole (principalmente lipofile) a base di idrossitirosole. Sono stati eseguiti molti esperimenti per sintetizzare i derivati di HTy e gli analoghi con un migliore equilibrio idrofilia/lipofilia (HLB) per aumentarne la biodisponibilità e migliorarne le funzioni biologiche. L'acilazione o l'alchilazione in funzione dell'idrossitirosole con lunghe catene alchiliche sature o insature dà luogo a esteri ed eteri lipofili con una buona attività antiossidante. In letteratura la maggior parte degli studi sugli antiossidanti lipofili dimostra che più è lunga la catena alchilica, più attiva è l'attività antiossidante. Nell'ultimo decennio, una crescente attenzione è stata rivolta agli esteri idrossitirosilici, in particolare a quelli derivanti dagli acidi grassi i quali, a causa della maggiore solubilità in una matrice oleosa, potrebbero risolvere i problemi legati all'estrazione da soluzioni acquose, sia quelli legati all'uso di HTy come additivo negli alimenti e nei cosmetici.

È stato dimostrato che, in modelli *ex vivo*, alcuni idrossitirosil esteri apportano una maggiore protezione a proteine e lipidi contro l'ossidazione causata dai radicali perossidici. Infine, derivati alchil eteri di HTy, più stabili rispetto a HTy, hanno dimostrato di esercitare effetti antiproliferativi, neuroprotettivi, antiagglomeranti e antinfiammatori maggiori di quelli di HTy.

La bassa lipofilia di HTy ha spinto a studiare due derivati presenti anche in EVO, ai fini di migliorare i profili farmacocinetici e aumentare la biodisponibilità: uno più lipofilo, ovvero l'idrossitirosil acetato e un altro più idrofilo, il 3,4-diidrossifenilglicole.

L'idrossitirosil acetato è stato in grado di ridurre lo squilibrio metabolico indotto da una dieta ad alto contenuto di colesterolo in misura maggiore rispetto a HTy; inoltre, diversi studi hanno dimostrato che l'idrossitirosil acetato esercita *in vitro* un effetto neuroprotettivo e antiaggregante maggiore rispetto all'idrossitirosolo. Inoltre, è stata anche dimostrata la sua capacità di aumentare il consumo di glucosio negli adipociti 3T3-L1 e nei miotubi C2C12 attraverso la riduzione della regolazione di PPAR γ , C/EBP α e SREBP-1c e dei loro geni bersaglio a valle (GLUT4, CD36 e FAS) (Aparicio-Soto *et al.*, 2015).

Il diidrossifenilglicolo invece è un importante composto fenolico che si presenta in concentrazioni superiori rispetto a HTy in taluni preparati di olive da tavola e nei rifiuti solidi in seguito all'estrazione dell'olio d'oliva. Questo fenolo ha mostrato maggiori capacità antiradicaliche rispetto a HTy e una prevenzione della perossidazione dei lipidi paragonabile a quella della vitamina E.

Una serie di idrossitirosil esteri caratterizzati da catene aciliche corte (C2), medie (C12) e lunghe (C16 e C18) sono stati investigati per la loro capacità di ridurre il livello di ossido nitrico (NO) in macrofagi RAW264.7 stimolati con lipopolisaccaride (LPS). Entrambi gli esteri a lunga catena, vale a dire l'idrossitirosil stearato (HtySte) e idrossitirosil oleato (HtyOle), hanno dato una riduzione di NO di circa il 40% a 2.5 μ M e il 50% a 5 μ M, con HtyOle efficace già a 1 μ M. Al contrario, idrossitirosilacetato (HtyAce) e altri esteri Hty aventi una catena più corta, alle stesse concentrazioni testate non hanno inibito la produzione di NO (Plastina *et al.*, 2019).

2.5 Idrossitirosil oleato

Finora, l'idrossitirosil oleato è principalmente noto come un derivato semi-sintetico lipofilo dell'idrossitirosolo. È stato dimostrato che il composto possiede attività

antiossidanti (Mateos *et al.*, 2008). Inoltre, l'esterificazione genera una molecola con proprietà tecnologico-farmacocinetiche vantaggiose rispetto all'idrossitiroso stesso (Zhou *et al.*, 2017). Oltre a inibire la produzione di NO, è stato osservato che l'idrossitirosoil oleato inibisce significativamente il rilascio di prostaglandine E₂ (PGE₂) in macrofagi murinici stimolati con LPS. Inoltre, HtyOle attenua l'espressione LPS-indotta del gene di iNOS, COX-2 e IL-1 β . HtyOle è stato anche identificato sia nella sansa che in acque di vegetazione (OMWW). La sua quantità nelle due matrici è stata quantificata in 4.3 e 2.6 $\mu\text{g g}^{-1}$, rispettivamente (Plastina *et al.*, 2019).

CAPITOLO 3

Materiali e Metodi

3.1 Campionamento oli

Gli oli extravergini di oliva utilizzati derivano da cultivar: Carolea (cv 2017/2018), Nocellara del Belice 2017/2018, Dolce di Rossano 2017/2018, Carolea 2018/2019, Dolce di Rossano 2018/2019, Pennulara 2018/2019) durante le campagne olearie 2017/2018 e 2018/2019. Sono state inoltre utilizzate tre tipologie di oli difettati (blend), in particolare, rancido, avvinato e riscaldamento.

3.2 Sintesi dell'idrossitirosolo

La sintesi dell'idrossitirosolo (Fig.9), è avvenuta mediante una riduzione dell'acido 3,4-diidrossifenilacetico con LiAlH_4 [Sigma-Aldrich (Milano, Italia)] come riportato da (Plastina *et al.*, 2019). In un pallone codato da 250 mL, munito di refrigerante (entrambi codati, sotto un flusso di azoto, è stato aggiunto a 50 mL di tetraidrofurano (THF), 1.5 g dell'acido 3-4 diidrossifenilacetico (9 mmol). Lentamente è stato aggiunto 1g di litio alluminio idruro (LiAlH_4), fino ad ottenere una miscela quasi densa. È seguita agitazione meccanica. La miscela, è stata riscaldata a 50 °C, per un'ora circa, è stata fatta raffreddare in un bagno di ghiaccio, trattata con acqua per ottenere "distruzione" del LiAlH_4 rimasto non reagito. La miscela è poi stata trattata con una soluzione acquosa di HCl 10% (ph:2) ed è stata effettuata l'estrazione con acetato di etile (40 mL x 5). La fase organica è stata lavata due volte con acqua neutra e anidrificata con Na_2SO_4 . Successivamente, il prodotto è stato purificato mediante cromatografia su colonna (SiO_2 , usando cloroformio-metanolo 98:2).

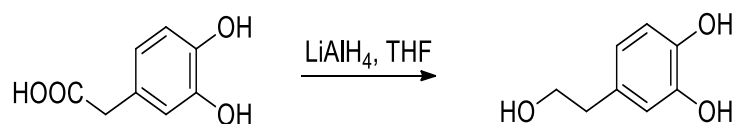
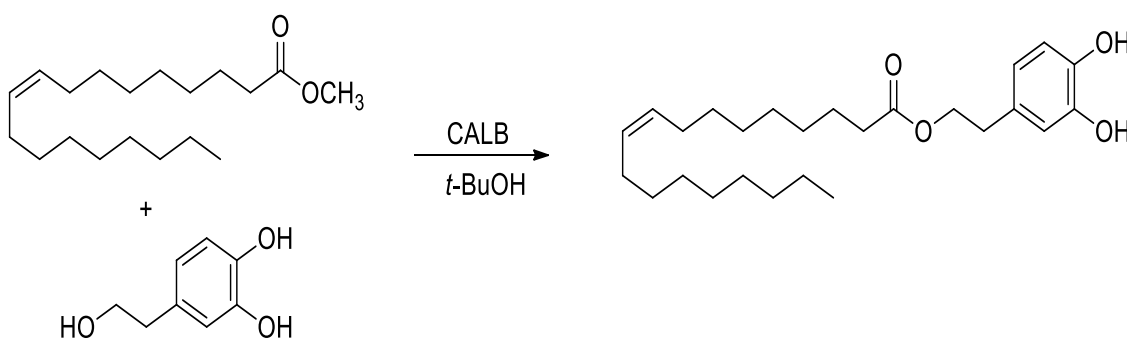


Figura 9 Sintesi dell'Idrossitirosolo

3.3 Sintesi dell'idrossitirosil oleato

La sintesi dell'idrossitirosil oleato (Fig. 10) è stata realizzata in accordo con la procedura già riportata in letteratura (Plastina *et al.*, 2019). Brevemente, l'idrossitirosolo (123 mg) è stato posto a reagire con metil oleato (2 mL) e in presenza di lipasi B da *Candida Antarctica* immobilizzata su supporto polimerico (*Candida antarctica* lipasi B, CALB, 200 mg) in un orbital shaker, alla temperatura di 50 °C. La reazione è stata condotta per 24 ore. Successivamente, dopo aver allontanato l'enzima per filtrazione, il prodotto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di SiO₂, usando una miscela di etere di petrolio e acetato di etile (90/10)



CALB: Lipasi B da *Candida Antarctica*

Figura 10. Sintesi dell'idrossitirosil oleato

3.4 Estrazione dei composti fenolici

L'estrazione dei composti fenolici è avvenuta utilizzando il metodo COI (International Olive Council) COI/T.20/Doc. n. 29 Novembre 2009; 2 g di olio sono stati trattati con 10 mL di una soluzione acqua/metanolo (20/80; v/v). Successivamente la soluzione è stata miscelata mediante l'utilizzo del vortex, per 1 minuto. A seguire, è stata sonificata per 15 minuti tramite un omogeneizzatore ultrasonico e centrifugata per 25 minuti a 8000 rpm ad una temperatura di 5 °C. I surnatanti sono stati filtrati mediante l'utilizzo di filtri a membrana (0.45 µm CA-membrane sterile EXP 2003-07) e opportunamente diluita per analisi HPLC-MS/MS.

3.5 Determinazione dell'idrossitirosil oleato nell'olio mediante LC-MS/MS

La determinazione del idrossitirosil oleato nelle matrici testate 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 (Plastina *et al.*, 2019). 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 dell'idrossitirosil 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 -25 eV; potenziale di collisione in uscita -16 eV; gas (1) 40 psi; gas (2) 30 psi; dwell time 400 ms. Per l'analisi quantitativa dei campioni, è stato utilizzato il monitoraggio delle reazioni multiple (MRM) in cui lo ione quasi molecolare dell'idrossitirosil 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: 417.1 ($(\text{M-H})^-$) \rightarrow 281.3 (oleato) $^-$. Di seguito si riporta la curva di calibrazione ottenuta usando un campione di HtyOle come standard esterno (Fig. 11).

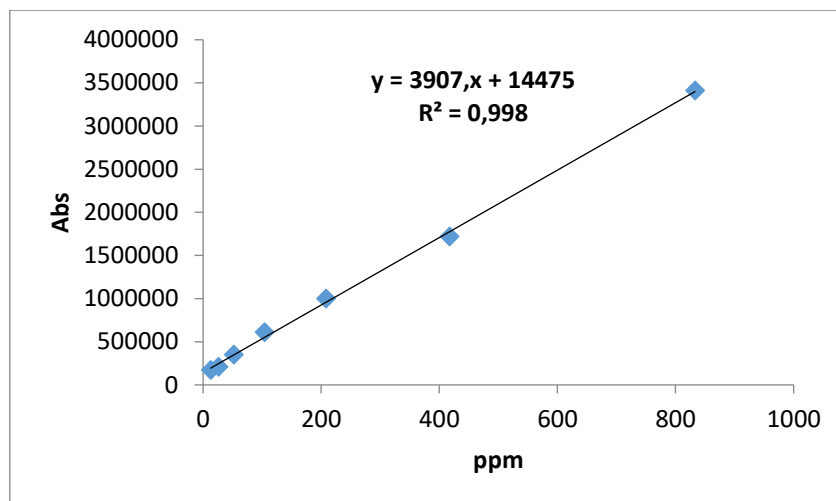


Figura 11. Curva di calibrazione dell'idrossitiroxil oleato

3.6 Determinazione dell'acidità libera

Il grado di acidità è un parametro specifico che misura gli acidi grassi liberi negli oli e che viene espresso convenzionalmente in % di acido oleico. In alternativa si usa anche il numero di acidità che è dato dai milligrammi di NaOH necessari per neutralizzare 1g di sostanza grassa. Il grado di acidità non è, per ovvie ragioni, caratteristico dei singoli oli, essendo la sua variabilità piuttosto legata alla provenienza del grasso ad al suo stato di conservazione. Ma la sua importanza è però fondamentale, perché in relazione ad esso si stabilisce l'attitudine dei grassi alla commestibilità nonché la classificazione commerciale. Nell'olio di oliva si può avere un elevato grado di acidità libero, quando il prodotto sia stato ottenuto da olive cadute e lasciate per terra un tempo sufficiente all'innesco di fenomeni fermentativi di carattere anche idrolitico con liberazione degli acidi grassi. L'acidimento che è dovuto alla liberazione di acidi grassi dei trigliceridi a opera della lipasi è una reazione molto importante. È un processo idrolitico, quindi richiede presenza di molecole di acqua, per questo tutti gli oli vanno accuratamente separati dalla fase acquosa. La reazione sfruttata per la titolazione è una reazione di neutralizzazione. La determinazione del grado di acidità è basata sulla titolazione della soluzione del grasso attraverso una soluzione acquosa di NaOH (titolazione acido debole-base forte). Trattandosi di titolazione di acido debole, l'indicatore usato è la fenoftaleina. Tutti i reattivi sono di qualità analitica conosciuta; l'acqua impiegata è acqua distillata. La miscela 1:1 etere dietilico-etanolo al 95% (v/v), è stata neutralizzata esattamente al momento dell'impiego con la soluzione di idrossido di potassio in presenza di 0.3 mL della soluzione di fenolftaleina per 100ml di miscela.

La soluzione titolante utilizzata è stata NaOH 0.1 N. L'indicatore utilizzato per il viraggio del pH è stata la fenolftaleina, soluzione etanolica al 1%. Nello specifico, 2 g di olio sono stati sciolti in 50 mL della miscela etere-etanolo precedentemente neutralizzata con NaOH. Sono state aggiunte 3 gocce dell'indicatore di fenolftaleina. È seguita titolazione con la soluzione di idrossido di sodio di 0,1 N fino a viraggio dell'indicatore (colorazione rosa della fenolftaleina persistente per almeno 10 secondi) (Metodo COI, International Olive Council).

L'acidità espressa come % in massa è pari a:

$$[(V \cdot c \cdot M) / 10] \cdot m$$

V= volume in ml della soluzione a titolo noto di idrossido di sodio usato

c= la concentrazione esatta della soluzione a titolo noto di idrossido di sodio usato

M=il peso molecolare dell'acido oleico (282)

m= il peso in grammi della sostanza da analizzare

3.7 Determinazione del numero di perossidi

Il numero di perossidi è il quantitativo delle sostanze presenti nel campione, espresse in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, che ossidano lo ioduro di potassio nelle condizioni che vengono descritte. La sostanza in esame, sciolta in acido acetico glaciale (15 mL) e cloroformio (10 mL), viene addizionata con una soluzione di ioduro di potassio (1 mL) agitando. La beuta contenente il campione è stata tappata rapidamente, agitata per un minuto lasciata riposare per cinque minuti al riparo dalla luce, ad una temperatura compresa tra 15 e 25 °C. Trascorsi i cinque minuti, sono stati aggiunti 75 mL di acqua distillata. L'indicatore utilizzato è stata la soluzione di salda d'amido (1 mL). Successivamente è stata condotta la titolazione dello iodio liberato con soluzione di tiosolfato di sodio (0,01 N) standardizzata (Metodo COI, International Olive Council). Il numero di perossidi (P.V.), espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg, viene dato dalla formula:

$$[(V \cdot T) / m] \times 1000$$

dove:

V= è il numero di ml della soluzione standardizzata di tiosolfato di sodio (6.4) usata per la prova, corretto in modo da tener conto della prova in bianco.

T= è la normalità esatta della soluzione di tiosolfato di sodio (6.4) usata. m = è il peso in g della sostanza da analizzare.

3.8 Analisi spettrofotometrica nell'ultravioletto

Questo tipo di analisi è espresso mediante dei coefficienti K che rappresentano l'assorbimento da parte dell'olio all'esposizione di luce ultravioletta in particolari condizioni.

I coefficienti di estinzione molare alle lunghezze d'onda di 232 nm e di 270 nm indicano lo stato ossidativo dell'olio. Questo esame, oltre a fornire utili elementi di giudizio sulla qualità di un olio, ha permesso di risolvere definitivamente il problema del riconoscimento dell'olio rettificato eventualmente aggiunto all'olio di oliva vergine, sfruttando il fatto che gli oli naturali ottenuti per semplice pressione non contengono doppi legami coniugati che invece si formano, sia pure in misura minima, durante la rettifica, particolarmente nella fase di decolorazione su terre attive. Durante i processi industriali di rettificazione si formano dieni e trieni coniugati che manifestano assorbimento caratteristico (intorno a 230 nm i sistemi dienici e intorno a 270 nm i sistemi trienici). Infatti, gli acidi grassi polinsaturi sono facilmente ossidabili ed è possibile l'isomerizzazione da cis a trans e lo slittamento dei doppi legami dalla posizione isolata a quella coniugata. Ne consegue che i rettificati presentano valori di assorbimento nell'UV, particolarmente nella zona intorno ai 270 nm, notevolmente superiori a quelli dei vergini. Negli oli di oliva vergini ed in buon stato di conservazione, sono presenti soltanto doppi legami isolati, e sistemi di due o tre doppi legami non coniugati, relativi agli acidi oleico (un doppio legame in posizione 9), linoleico (2 doppi legami in posizione 9, 12) e linolenico (3 doppi legami in posizione 9,12,15). Infatti i gruppi etilenici isolati, oppure i gruppi carbossilici degli acidi grassi, presentano massimi di assorbimento tra 175 e 185 nm, cioè al di fuori della regione dell'UV che inizia a lunghezze d'onda superiori a 200 nm. È bene precisare che 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, ad esempio, in fase di irrancidimento.

L'analisi UV viene condotta sull'olio disciolto in opportuno solvente, cicloesano, nell'intervallo compreso tra i 220 e i 280 nm; in particolare, le lunghezze d'onda più significative sono 232, 266, 270 e 274 nm. I valori di assorbimento vengono espressi come assorbanza specifica, intendendo con questa espressione l'assorbanza ad una certa lunghezza d'onda, di una soluzione all'1% dell'olio in esame nel solvente prescelto, osservata in una cuvette dello spessore di 1 cm (Metodo COI, International Olive Council). Nel caso degli oli è invalso l'uso di esprimere l'assorbanza specifica

con la lettera K . Per esempio, l'espressione K_{270} indica l'assorbanza specifica dell'olio in esame alla lunghezza d'onda di 270 nm. In termini numerici si ha:

$$K_{270} = A_{270} / Cl$$

Dove A_{270} è il valore dell'assorbanza a 270 nm della soluzione dell'olio in esame, C la concentrazione della soluzione espressa in g/100 mL ed l lo spessore in cm della cella di quarzo nella quale viene esaminata la soluzione di olio. Per quanto riguarda il solvente, il Metodo Ufficiale pubblicato nel 1963 sulla Gazzetta Ufficiale, indica l'isoottano, mentre nelle numerose sperimentazioni effettuate negli anni precedenti era stato usato generalmente il cicloesano. Il campione in esame deve essere perfettamente omogeneo ed esente di impurezze sospese. Gli oli liquidi a temperatura ambiente si filtrano su carta alla temperatura di circa 30 °C. Si pesano esattamente circa 0.25 g in matraccio tarato da 25 mL, si porta a volume con un solvente opportuno (isoottano o cicloesano) quindi si omogeneizza per inversione. La soluzione risultante deve essere perfettamente limpida. Qualora si riscontri opalescenza o torbidità si filtra rapidamente su carta.

Con la soluzione così ottenuta si riempie la cuvetta e si misurano le estinzioni usando come riferimento il solvente impiegato, alle lunghezze d'onda significative comprese fra 232 e 276 nm. I valori di estinzione letti devono essere compresi nell'intervallo 0.1 – 0.8, in caso contrario è necessario ripetere le misure operando con soluzioni opportunamente più diluita o più concentrata. Si riportano le estinzioni specifiche (coefficienti di estinzione) alle varie lunghezze d'onda calcolate come segue:

$$K_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} / Cl$$

K_{λ} = estinzione specifica alla lunghezza d'onda

ε_{λ} = estinzione misurata alla lunghezza d'onda

C = concentrazione della soluzione in g/100ml

l = spessore della cuvette in cm

I risultati si esprimono con due cifre decimali. L'esame spettrofotometrico dell'olio di oliva secondo il metodo ufficiale dei Regolamenti della CEE prevede la determinazione dell'estinzione specifica, in soluzione di isoottano, alle lunghezze d'onda di 232 e 270nm e la determinazione del ΔK inteso come:

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

K_{λ} = estinzione specifica alla lunghezza d'onda ΔK , lunghezza d'onda di massimo assorbimento intorno a 270 nm.

Tabella 1. Parametri ΔK

Categoria	K232	K270	ΔK
Extra Vergine	<2.50	<0.22	<0.01

Il comportamento spettrale è notevolmente diverso, ed è questa spiccata differenza che permette di individuare anche piccole aggiunte di rettificato, o di sansa, all'olio di oliva extravergine. Quest'ultimo, infatti, presenta un assorbimento che decresce rapidamente verso valori molto bassi (< 0.200) nella zona compresa tra 260 e 280 nm, dove l'andamento della curva è praticamente parallelo all'asse delle ascisse, sulla quale sono riportate le lunghezze d'onda (in ordinate sono riportati i valori di assorbanza). Nel caso del rettificato, e più ancora nel caso dell'olio di sansa, i valori di assorbanza in tale zona sono molto più elevati e la curva assume un andamento caratteristico con tre massimi, dovuti alla presenza dei trieni, tra i quali il più accentuato è quello centrale a 270 nm. Ai fini del giudizio, specialmente nel caso di miscele, è importante conoscere anche l'altezza del picco principale, tenendo conto del valore dell'assorbanza a 270 nm, corrispondente al massimo, e quelli a 266 ed a 274 nm, corrispondenti ai due minimi.

CAPITOLO 4

Risultati e discussione

4.1 Determinazione quantitativa dell'idrossitirosil oleato

La determinazione dell'idrossitirosil oleato è stata condotta sulla frazione fenolica ottenuta da oli d'oliva secondo il metodo COI (International Olive Council) mediante il metodo precedentemente messo a punto (Plastina *et al.*, 2019). La presenza dell'analita di interesse è stata riscontrata nei diversi campioni di oli extra vergine d'oliva analizzati. Nel dettaglio, si osserva che HtyOle è presente in concentrazioni più alte in oli ottenuti dalla cultivar Carolea (tabella 2). Inoltre, per gli oli di questa cultivar è stata osservata una certa variabilità in funzione della campagna olearia. Gli oli ottenuti dalla cultivar Dolce di Rossano contengono una quantità tra 1.6 e 2.1 mg/kg, a seconda dell'annata di produzione. Gli oli derivanti dalle cultivar Nocellara del Belice e Pennulara mostrano valori di HtyOle di poco superiori a 1 ppm. Infine, gli oli difettati presentano la più bassa concentrazione di idrossitirosil oleato tra i campioni analizzati.

Tabella 2. Concentrazioni dell'idrossitirosil oleato nei diversi campioni analizzati

Campione	Cultivar	Campagna olearia	Idrossitirosil oleato (mg/kg)
EVOO	Carolea	2017-2018	4.9 ± 0.2
EVOO	Carolea	2018-2019	4.0 ± 0.7
EVOO	Dolce di Rossano	2017-2018	1.6 ± 0.3
EVOO	Dolce di Rossano	2018-2019	2.1 ± 0.2
EVOO	Nocellara del Belice	2017-2018	1.3 ± 0.1
EVOO	Pennulara	2018-2019	1.3 ± 0.1
Rancido	Blend	2017-2018	0.4 ± 0.1
Riscaldo	Blend	2018-2019	0.4 ± 0.1
Avvinato	Blend	2018-2019	0.4 ± 0.1

4.2 Determinazione dell'acidità totale

I risultati ottenuti mediante le titolazioni in cui è avvenuta una reazione di neutralizzazione tra un acido debole e una base forte hanno dimostrato che le cultivar della campagna olearia 2018/2019 (Carolea, Dolce di Rossano e Pennulara) hanno presentato un numero di perossidi rientrante nel range di un olio extra vergine, ossia inferiore a 0.8% (g di acido oleico su 100g di olio). Anche le cultivar dell'anno 2017/2018 (Carolea, Dolce di Rossano e Nocellara del Belice) hanno dimostrato presentare un'acidità rientrante nel range di un olio extravergine.

4.3 Determinazione del numero di perossidi

I valori del numero di perossidi relativo ai campioni della campagna olearia 2018/2019 sono risultati inferiori al limite di 20 meq/kg. Il numero di perossidi della campagna olearia 2017/2018 non è invece rientrato nei limiti di legge per un olio extra vergine. Nel dettaglio, il Nocellara del Belice ha riportato valori di 52.27 meq/Kg, il Dolce di Rossano ha presentato valori di 51.55 meq/Kg e il Carolea 41.97 meq/Kg.

4.4 Determinazione del 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 (<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).

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 dell'idrossitirosoil oleato.

4.5.1 Cv. Carolea (2017/2018)

La cultivar Carolea (2017/2018) ha presentato le seguenti caratteristiche: 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. (Fig. 12). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 4.9 mg/kg.

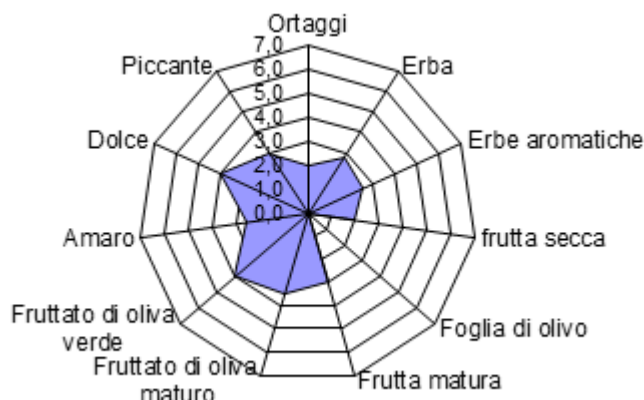


Figura 12. Rappresentazione dello spider plot, cultivar Carolea (2017/2018)

4.5.2 Cv. Dolce di Rossano (2017/2018)

La cultivar Dolce di Rossano (2017/2018) ha presentato le seguenti caratteristiche: 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 (Fig. 13). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 1.6 mg/kg.

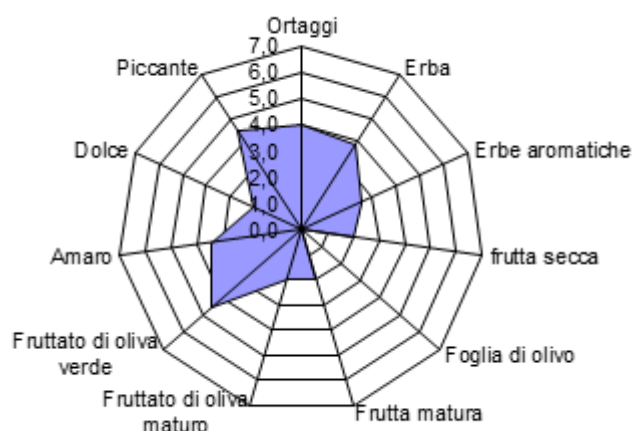


Figura 13. Rappresentazione dello spider plot, cultivar Dolce di Rossano (2017/2018)

4.5.3 Cv. Nocellara del Belice (2017/2018)

La cultivar Nocellara del Belice (2017/2018) ha presentato le seguenti caratteristiche: 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 (Fig. 14). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 1.3 mg/kg.

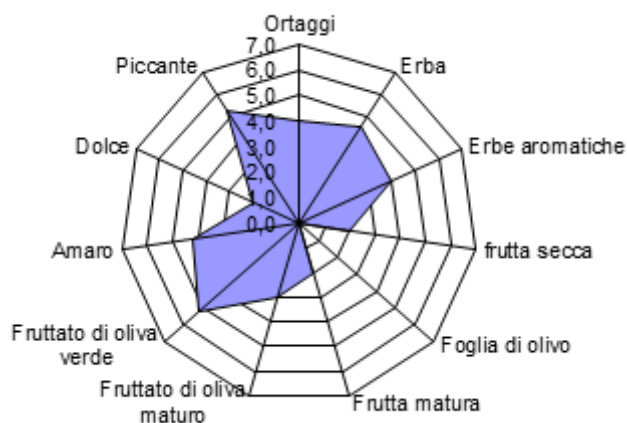


Figura 14. Raffigurazione dello spider plot, cultivar Nocellara del Belice (2017/2018)

4.5.4 Cv. Carolea (2018/2019)

La cultivar Carolea (2018/2019) ha presentato le seguenti caratteristiche: 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 (Fig. 15). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 4.0 mg/kg.

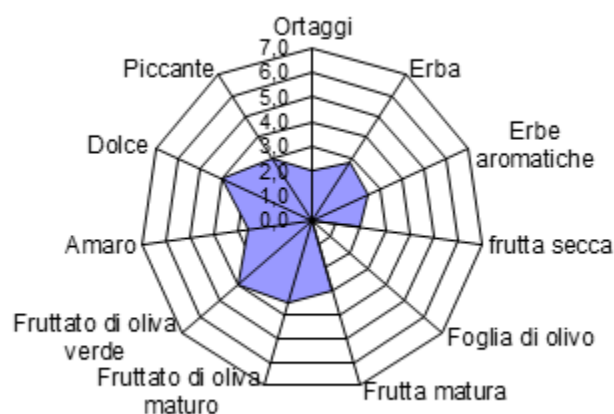


Figura 15. Raffigurazione dello spider plot, cultivar Carolea (2018/2019)

4.5.5 Cv. Dolce di Rossano (2018/2019)

La cultivar Dolce di Rossano (2018/2019) ha presentato le seguenti caratteristiche: fruttato medio di 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 (Fig. 16). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 2.1 mg/kg.

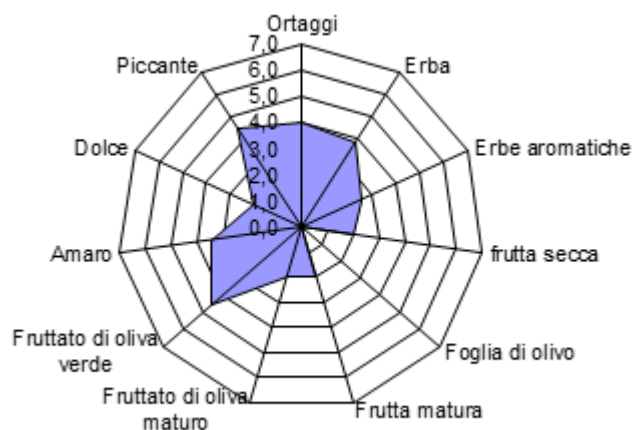


Figura 16. Rappresentazione dello spider plot, cultivar Dolce di Rossano (2018/2019)

4.5.6 Cv. Pennulara (2018/2019)

La cultivar Pennulara (2018/2019) ha presentato le seguenti caratteristiche: 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 (Fig. 17). Presenza di idrossitirosil oleato pari a 1.3 mg/kg.

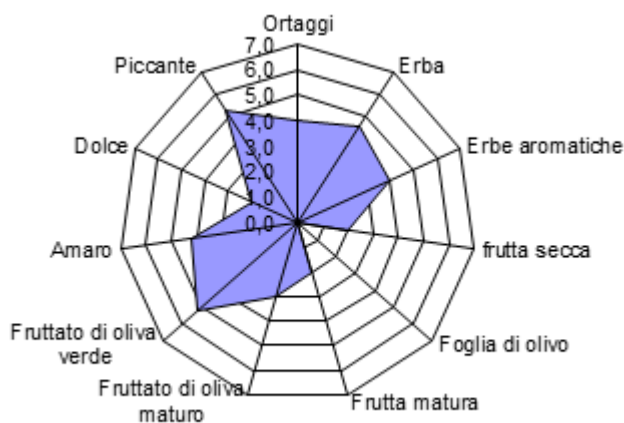


Figura 17. Rappresentazione dello spider plot, cultivar Pennulara (2018/2019)

Conclusioni

Lo scopo di questa tesi è stato determinare la presenza dell'idrossitirozil oleato nella frazione fenolica degli oli d'oliva, in quanto, in precedenza, era stato identificato soltanto nei sottoprodotti derivanti dalla lavorazione dell'olio, ossia nella sansa e nelle acque di vegetazione. Sono stati presi in considerazione oli extravergine d'oliva derivanti da tre cultivar (Carolea, Nocellara del Belice e Dolce di Rossano) della campagna olearia 2017/2018, e di oli di 3 cultivar (Carolea, Pennulara e Dolce di Rossano) della campagna olearia 2018/2019. Inoltre, sono stati analizzati anche degli oli difettati. L'idrossitirozil oleato è stato identificato e quantificato in tutti i campioni analizzati. In particolare, la sua concentrazione è risultata maggiore negli oli extra vergine d'oliva rispetto a quelli caratterizzati da difetti (rancido, riscaldo e avvinato). Inoltre, la sua concentrazione è risultata dipendente dalla cultivar e dalla diversa campagna olearia. Sulla base dei risultati ottenuti, si può concludere che la variazione della quantità di idrossitirozil oleato possa essere funzione della qualità dell'olio.

Bibliografia

- Aparicio-Ruiz, R.; García-González, D. L.; Oliver-Pozo, C.; Tena, N., Morales, M. T.; Aparicio, R. (2016). Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 299–307.
- Aparicio-Soto M.; Sánchez-Fidalgo S.; González-Benjumea A.; Maya I.; Fernández-Bolaños J.G.; Alarcón-de-la-Lastra C. (2015) Naturally Occurring Hydroxytyrosol Derivatives: Hydroxytyrosyl Acetate and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Modulate Inflammatory Response in Murine Peritoneal Macrophages. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 836–846.
- Bernini R.; Gilardini Montani M. S.; Merendino N.; Romani A.; Velotti F. (2015). Hydroxytyrosol-Derived Compounds: A Basis for the Creation of New Pharmacological Agents for Cancer Prevention and Therapy. *J. Med. Chem.*, 58, 9089–9107.
- Bendini A.; Cerretani L.; Carrasco-Pancorbo A.; Gómez-Caravaca A.M.; Segura-Carretero A.; Fernández-Gutiérrez A.; and Lercker G.; (2007) Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. *Molecules*, 12, 1679–1719.
- Bernini R.; Merendino N.; Romani A.; Velotti F. (2013) Naturally Occurring Hydroxytyrosol: Synthesis and Anticancer Potential. *Current Medicinal Chemistry*, 20, 655-670.
- Burattini S.; Salucci S.; Baldassarri V.; Accorsi A.; Piatti E.; Madrona A.; Espartero J.L.; Candiracci M.; Zappia G.; Falcieri E. (2013) Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate, *FoodChem. Toxicol.*, 55, 248–256.
- Capella P.; Fedeli E.; Bonaga G.; Lerker G. (1997). Manuale degli oli e dei grassi. *Tecniche Nuove*, Milano.
- Capozzi, F.; Piperno, A.; Uccella, N. (2000). Oleuropein Site Selective Hydrolysis by Technomimetic Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1623–1629.
- Cerretani L.; Bendini A.; Del Caro A.; Piga A.; Vacca V.; Caboni M.F et al., (2006) Preliminary characterisation of virgin olive oils obtained from different cultivars in Sardinia. *Eur Food Res Technol*, 222, 354–361.

- Covas M. I., De la Torre K., Farré-Albaladejo M., et al. (2006) Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 40(4), 608–616.
- Covas, M.I.; Ruiz-Gutierrez, V.; De la Torre, R.; Kafatos, A.; Lamuela-Raventos, R.M.; Osada, J.; Owen, R.W.; Visioli, F. (2006) Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans. *Nutr. Rev.*, 64, 20–30.
- Damiano F., Rochira A., Tocci R., Alemanno S., Gnoni A., Siculella L. (2013) HnRNP A1 mediates the activation of the IRES-dependent SREBP-1a mRNA translation in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochemical Journal*, 449(2), 543–553.
- De La Cruz, J. P., Del Río, S.; Arrebola, M. M., López-Villodres, J. A., Jebrouni, N., González-Correa, J. A., (2010) Effect of virgin olive oil plus acetylsalicylic acid on brain slices damage after hypoxia-reoxygenation in rats with type 1-like diabetes mellitus. *Neurosci. Lett.*, 471, 89– 93
- De La Cruz, J. P.; Ruiz-Moreno, M. I.; Guerrero, A.; Reyes, J. J.; Benitez-Guerrero, A.; Espartero, J. L., González-Correa, J. A. (2015) Differences in the neuroprotective effect of orally administered virgin olive oil (*Olea europaea*) polyphenols tyrosol and hydroxytyrosol in rats. *J. Agric. Food Chem.* 63, 5957– 5963.
- De la Torre R. (2008) Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. *Inflammopharmacology*, 16(5), 245–247.
- Dermeche S.; Nadour M.; Larroche C.; Moulti-Mati F.; Michaud P. (2013) Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 481532-1552.
- Doula M. K., Moreno-Ortego J. L., Tinivella F., Inglezakis V. J., A., Komnitsas K. (2017) Olive mill waste: recent advances for the sustainable development of olive oil industry. *Olive Mill Waste Recent Advances for Sustainable Management.*, cap 2, 29-56.
- Echeverría F.; Ortiz M.; Valenzuela R.; Videla L. A. (2017). Hydroxytyrosol and cytoprotection: a projection for clinical interventions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 18.
- El-Abbassi A.; Hafidi, A.; Khayet M.; García-Payo M.C. (2013), Integrated direct contact membrane distillation for olive mill wastewater treatment *Desalination*, 323, 31-38.
- Elgebaly H. A.; Mosa N. M., Allach M., El-massry K. F., El-Ghorab A. H., Al Hroob A. M., Mahmoud A. M (2018). Olive oil and leaf extract prevent fluoxetine-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 98, 446-453

- Fernández-Bolaños J. G.; López O; López-García M. Á.; Marset A.; (2012). Biological Properties of Hydroxytyrosol and Its Derivatives, Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions.
- Fiorentino, A.; Gentili, A.; Isidori, A.; Monaco, P.; Nardelli, A.; Parrella, A.; Temussi, F. (2003). Environmental Effects Caused by Olive Mill Wastewaters: Toxicity Comparison of Low-Molecular-Weight Phenol Components. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1005–1009.
- Galanakis C. M.; Tsatalas P.; Galanakis I. M. (2018). Phenols from olive mill wastewater and other natural antioxidants as UV filters in sunscreens. *Environmental Technology & Innovation.*, 9, 160-168.
- García M.; Yousfi K.; Oliva J.; García-Díaz M.T.; Pérez-Camino M.C., (2005) Hot water dipping of olives (*Olea europaea*) for virgin oil debittering. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 53, 8248-8252.
- García-Villalba, R.; Carrasco-Pancorbo, A.; Oliveras-Ferraros, C.; Vázquez-Martín, Menéndez A; Segura-Carretero J. A. A.; et al. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 416–429.
- Gómez-Caravaca A.M., Maggio R.M., Cerretani L., (2016) Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. *A review*.
- Gonzalez, M.; Zarzuelo, A.; Gamez, M. J.; Utrilla, M. P.; Jimenez, J.; Osuna, I. (1992). Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Medica*, 58, 513–515.
- González-Correa, J. A.; Arrebola, M. M.; Cansino, A. L.; Muñoz-Marín, J.; Ruiz-Villafranca, D.; Guerrero, A. Sánchez de la Cuesta, F.; De La Cruz, J. P. (2006) Effects of hypoxia reoxygenation in brain slices from rats with type 1-like diabetes mellitus *Diabetes/Metab. Res. Rev.* 22, 390– 400.
- González-Correa, J.N.A.; López-Villodres, J.A.; Asensi, R.; Espartero, J. L.; Rodríguez-Gutiérrez, G.;De La Cruz, J. P. (2009) Virgin olive oil polyphenol hydroxytyrosol acetate inhibits in vitro platelet aggregation in human whole blood: comparison with hydroxytyrosol and acetylsalicylic acid *Br. J. Nutr.*, 101, 1157–1164.
- Guasch-Ferré, M.; Hu, F.B.; Martínez-González, M.A.; Fitó, M.; Bulló, M.; Estruch, R.; Ros, E.; Corella, D.; Recondo, J.; Gómez-Gracia, E.; Fiol, M.; Lapetra, J.; Serra-Majem, L.; Muñoz, M.A.; Pintó, X.; Lamuela-Raventós, R.M.; Basora, J.; Buil-Cosiales, P.; Sorlí, J.V.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Martínez, J.A.; Salas-Salvadó, J. (2014) Olive Oil Intake and Risk of Cardiovascular Disease and Mortality in the PREDIMED Study. *BMC Med.*, 12, 78.

- Hajjar, D.P.; Gotto, A.M. (2013) Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases. *Am. J. Pathol.*, 182, 1474-1481.
- Hu, T.; He, X. W.; Jiang, J. G.; Xu, X. L. (2014). Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 1449–1455.
- Köseoğlu O., Sevim D., Kadiroğlu P., (2016) Quality characteristics and antioxidant properties of Turkish monovarietal olive oils regarding stages of olive ripening. *Food Chem.*
- Liu L., Zhang K., Sandoval H., et al. (2015) Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell.*, 160(1-2),177–190.
- Liu, H.; Ou, S.; Xiao, X.; Zhu, Y.; Zhou, S. (2015) Diabetes worsens ischemia-reperfusion brain injury in rats through GSK-3 β *Am. J. Med. Sci.*, 350, 204– 211.
- López-Villodres, J. A.; De La Cruz, J. P.; Muñoz-Marin, J.; Guerrero, A.; Reyes, J. J.; González-Correa, J. A. (2012) Cytoprotective effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs in rat brain slices subjected to reoxygenation after oxygen-glucose deprivation *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45, 624– 631.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10960–10966
- McNamara C.J.; Anastasiou C.C.; O’Flaherty V.; Mitchell R. (2008), Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 61, 127-134.
- Miro-Casas E., Covas M. I., Farre M., et al. (2003) Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clinical Chemistry* 49(6), 945–952.
- Olmo-García, L., Bajoub, A., Monasterio, R. P., Fernández-Gutiérrez, A., & Carrasco-Pancorbo, A. (2017). Metabolic profiling approach to determine phenolic compounds of virgin olive oil by direct injection and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food Chemistry*, 231, 374–385.
- Plastina P.; Benincasa C.; Perri E.; Fazio A.; Augimeri G.; Poland M.; Witkamp R.; Jocelijn Meijerink (2019) Identification of hydroxytyrosyl oleate, a derivative of hydroxytyrosol with anti-inflammatory properties, in olive oil by-products. *Food chemistry*, 279, 105-113.
- Preedy V.; Watson R. (2010) Olives and olive oil in health and disease prevention. Imprint: Academic Press.
- Priore P.; Caruso D.; Siculella L.; Gnoni G. V. (2015) Rapid down-regulation of hepatic lipid metabolism by phenolic fraction from extra virgin olive oil. *European Journal of Nutrition*, 54(5),823–833.

- Reboredo-Rodríguez, P.; Figueiredo-González, M.; González-Barreiro, C.; Simal-Gándara, J.; Salvador, M. D.; Cancho-Grande, B.; et al. (2017) State of the art on functional virgin olive oils enriched with bioactive compounds and their properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 668.
- Rodríguez-Morató J.; Xicota L; Fitó M.; Farré M.; Dierssen M.; de la Torre R. (2015) Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*, 20(3), 4655–4680.
- Rosignoli, P.; Fuccelli, R.; Fabiani, R.; Servili, M.; Morozzi, G. (2013) Effect of olive oil phenols on the production of inflammatory mediators in freshly isolated human monocytes *J. Nutr. Biochem.* 24, 1513– 1519.
- Sepporta, M. V.; López-García, M. Á., Fabiani, R., Maya, I., Fernández-Bolaños, J. G. (2013). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48 (4–5), 790–798.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Sherif O. Iman; Mohammed M.H.Al-Gayyar.(2018) Oleuropein potentiates anti-tumor activity of cisplatin against HepG2 through affecting proNGF/NGF balance. *Life sciences*, 198, 87-93.
- 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.
- Tsimidou, M. Z.; & Boskou, D. (2015). The health claim on “olive oil polyphenols” and the need for meaningful terminology and effective analytical protocols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 1091–1094.
- Valli E., A. Bendini, 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. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 548-555.
- Visioli F.; Galli C.; Bornet F.; et al. (2000) Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS Letters*, 46(2-3), 159–160.
- Zhou, D.-Y., Sun, Y.-X., & Shahidi, F. (2017). Preparation and antioxidant activity of tyrosol and hydroxytyrosol ester. *Journal of Functional Foods*, 37, 66–73.

Ringraziamenti

Ebbene sì, il momento tanto atteso è ormai arrivato, la laurea magistrale in scienza della nutrizione... Sembrerà banale, ma ricordare e riportare tutti i momenti trascorsi in questi due intensi ultimi anni, le persone incontrate, le esperienze vissute, non è affatto semplice e spero di non dimenticare nessuno.

Il primo fondamentale ringraziamento va alla mia famiglia. Grazie mamma, grazie papà; grazie per aver sempre creduto in me, per esserci stati anche e soprattutto nelle giornate poco positive, grazie per avermi permesso di scegliere liberamente, anche quando eravate consapevoli che avrei fatto scelte sbagliate! Del resto, come disse qualcuno, l'esperienza è il tipo insegnante più difficile perché prima ti fa l'esame, poi ti spiega la lezione ed è dagli sbagli che ci si rialza più forti di prima. Grazie Antonio e Francesco, siete stati una guida per me, il mio punto di riferimento, l'esempio da seguire da sempre. Semplicemente grazie, siete il mio tutto.

Un ringraziamento va al relatore di questa tesi, il professore Pierluigi Plastina. Grazie per avermi dato l'opportunità di entrare in laboratorio e di mettermi alla prova. Ho avuto modo di conoscere un mondo del tutto nuovo, sicuramente è stato un anno che mi ha arricchito molto, un anno in cui ho superato dei limiti. Grazie per avermi guidato nella stesura di questo lavoro, grazie per la sua pazienza.

Ringrazio anche la professoressa Fazio, la sua costante presenza in laboratorio è stata un punto di riferimento. Grazie per la sua disponibilità e gentilezza.

Il laboratorio mi ha dato anche l'opportunità di conoscere una persona speciale, Chiara! Quante volte ho scherzato sul fatto che avrei voluto fossi davvero la mia tutor? Eppure non scherzavo davvero e lo sai. In questo anno ho avuto modo di conoscerti un po' per volta e più passava il tempo, più mi rendevo conto di quanto fossi fortunata ad averti conosciuto. Il tuo tranquillizzarmi quando nulla andava per il verso giusto, non lo dimenticherò mai. La tua passione per il laboratorio che riesci a trasmettere, il tuo modo di essere, la tua generosità e disponibilità con tutti, fa di te una persona da ammirare (sì ma non ti esaltare adesso che hai letto eh).

Ringrazio Giuditta, Maria Lucia, Raffaella, Fabrizio ed Elena. Con voi ho trascorso giornate intere tra momenti di confronto, di svago, di allegria e anche di disperazione durante le

inevitabili giornate No. La vostra presenza in laboratorio è stata molto importante, ne abbiamo vissute sicuramente tante e se questo anno è stato piacevole per me, è stato anche grazie a voi.

Mi sono concentrata prevalentemente sull'ultimo anno, ma vorrei ricordare l'inizio di questa esperienza. Non posso che non menzionare il quartiere Nervoso, la casa in cui ho trascorso tutta la durata di questo percorso. Lo ammetto, ero un po' prevenuta. Ricordo ancora il mio essere allibita quando mi è stato chiesto di far parte del comitato di gestione, quando ho sentito per la prima volta il termine "Centro comune", eppure è stato quando ho notato l'ambiente così familiare, la voglia di socializzare, il rispetto tra tutti i residenti, che ho capito di aver scelto il quartiere giusto. Tra tutte le persone conosciute, non posso che non ringraziare i miei vicini Eugenio, Andrea, Marisa, Marco e tutte le mie coinquiline, in particolare Noemi e Filomena, grazie per i bei momenti trascorsi insieme, grazie per tutto il supporto, grazie per esserci stati sempre.

Grazie a tutti i miei colleghi di sempre e ai nuovi conosciuti in questi due anni, in particolare, Giulia, Martina, Stefano, Mario, Michela e Vincenzo. Non siete soltanto colleghi, fate ormai parte della mia vita e non avrei potuto avere compagni migliori.

Ringrazio le mie amiche di sempre per aver condiviso momenti di svago e per esserci state, nonostante i diversi impegni di tutte.

Grazie Marilena per il tuo costante sostegno! La distanza per noi non è assolutamente un limite, tu e il piccolo Alessandro siete stati e siete la mia forza!

Ringrazio tutta la mia famiglia, zii e cugini, per aver condiviso con me sacrifici e soddisfazioni. Grazie nonna, so che da lassù sarai felice per me in questo giorno importante.

Infine, ringrazio me stessa, per non aver mollato mai.