



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato di Ricerca Internazionale in Agronomia Ambientale

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali

SSD: AGR/02

**CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO
QUALITATIVO DI CONDIMENTI A BASE DI
OLI EXTRAVERGINI AROMATIZZATI CON OLI
ESSENZIALI**

TESI DI DOTTORATO DI

Marcella Lattuca

IL COORDINATORE

Ch.mo Prof. Carmelo Dazzi

IL TUTOR

Ch.ma Prof.ssa Teresa Tuttolomondo

CICLO XXVI

ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 02/2017

A Roberto, alla mia famiglia e a Christian

INDICE

1. PREMESSA

2. PARTE GENERALE

2.1 Caratteristiche nutraceutiche dell'olio extravergine di oliva

2.2 L'ossidazione lipidica e la *shelf-life* degli oli imbottigliati

2.3 *Health claim*

2.4 Piante officinali

2.5 Piante officinali nella storia

2.6 Oli essenziali e loro attività

2.7 Gli oli aromatizzati

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Scopo del lavoro

3.2 Fasi della ricerca

3.3 Individuazione dei biotipi di origano, timo, salvia e rosmarino

3.3.1 Estrazione degli oli essenziali: materiali e metodi

3.3.2 Risultati e discussioni

3.4 Caratterizzazione quali-quantitativa degli oli essenziali

3.4.1 Materiali e metodi

3.4.2 Risultati e discussioni

3.5 Selezione oli extravergini d'oliva

3.6 Messa a punto di miscele di oli extravergini d'oliva e oli essenziali

3.7 Panel test

3.7.1 Materiali e metodi

3.7.2 Risultati e discussioni

- 3.8** Preparazione dei campioni di olio extravergine d'oliva e oli essenziali
- 3.9** Determinazione dei profili aromatici
 - 3.9.1** Materiali e metodi
 - 3.9.2** Risultati e Discussioni
- 3.10** Valutazione della resistenza degli oli extravergini e delle miscele allo stress termico e fotochimico
- 3.11** Individuazione dei profili acidi degli oli extravergini di oliva
 - 3.11.1** Materiali e metodi
 - 3.11.2** Risultati e discussioni
- 3.12** Determinazione degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva sottoposti a foto-ossidazione in presenza di aria
 - 3.12.1** Materiali e metodi
 - 3.12.2** Risultati e discussioni
- 3.13** Determinazione degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva sottoposti a stress termico
 - 3.13.1** Materiali e metodi
 - 3.13.2** Risultati e discussioni
- 3.14** Variazioni degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva e miscele di oli sottoposti a stress termico

4. CONCLUSIONI

5. BIBLIOGRAFIA

1. PREMESSA

"Se fossimo in grado di fornire a ciascuno la giusta dose di nutrimento ed esercizio fisico, né in eccesso né in difetto, avremmo trovato la strada per la salute". Il concetto di cibo come medicina è un'intuizione che possiamo far risalire ad Ippocrate. Esistono diversi elementi, correlati con l'alimentazione, che sono in grado di modificare la probabilità di comparsa di una determinata problematica di salute: l'alimentazione aiuta quindi a prevenire. Gli alimenti sono anche in grado di agire su determinate condizioni, modificandole; l'alimentazione, quindi, aiuta anche a curare. Quando si parla del rapporto tra alimentazione e salute, non si può non citare la nutraceutica.

Il termine nutraceutico, particolarmente "alla ribalta" in quest'ultimo periodo, deriva dall'unione dei vocaboli nutrizione e farmaceutico. La sua "comparsa" nel linguaggio comune risale al 1989, a coniarlo è stato, presumibilmente, il Dr. Stephen L. De Felice, fondatore della FIM, *Foundation for Innovation in Medicine*. La definizione di nutraceutico, fu però ribadita e chiarita attraverso un comunicato stampa nel 1994, in cui veniva indicata come "*qualsiasi sostanza che può essere considerata un alimento o parte di un alimento che fornisce benefici medici o salutari, compresa la prevenzione e il trattamento della malattia*".

Il tutto non deve confondersi con i cibi funzionali, i quali sono stati definiti dall'*International Food Information Council (IFIC)* come "*cibi o componenti della dieta che possono fornire un beneficio per la salute oltre alla nutrizione di base*".

Basandosi su queste definizioni, la differenza tra nutraceutico e alimento funzionale sta quindi nel fatto che il primo si riferisce al singolo

componente con proprietà terapeutiche presente nell'alimento, mentre il secondo identifica l'alimento che mostra specifici effetti fisiologici.

Il settore nutraceutico fa parte dell'ampia disciplina della Chimica Farmaceutica, diverse risultano essere le ricerche in atto nell'ambito della nutraceutica focalizzate sullo studio di alimenti, piante officinali e/o integratori alimentari prevalentemente su base vegetale. In particolare tali ricerche sono volte all'individuazione e quantificazione dei metaboliti bioattivi in essi contenuti, nonché allo sviluppo di nuovi metodi estrattivi ed analitici per la realizzazione di prodotti innovativi capaci di soddisfare le esigenze del “consumatore 2.0”.

Il concetto dell'alimentazione, infatti, è cambiato fortemente negli ultimi anni, considerandolo come uno strumento teso al benessere fisico e psichico. Tutto questo ha portato all'identificazione di alimenti biologicamente attivi in grado di migliorare la qualità della vita e ridurre l'incidenza di malattie.

Negli ultimi anni, sono stati introdotti sul mercato diversi tipi di nutraceutici per ridurre l'ipertensione, il colesterolo, la glicemia e l'osteoporosi.

A riscuotere particolare interesse, da parte delle industrie alimentari e farmaceutiche e anche dagli stessi consumatori, risultano essere gli alimenti contenenti un'elevata quantità di antiossidanti.

Le reazioni ossidative del metabolismo umano, infatti, generano una produzione di radicali liberi che deve essere controbilanciata da una serie di molecole definite antiossidanti. Su tale base, nei sistemi biologici, i polifenoli, poiché associati ad attività antiossidante, costituiscono uno degli esempi più studiati.

Tuttavia, occorre tutelare i consumatori da affermazioni fuorvianti e a volte false, sui nutraceutici, affinché si concretizzino i reali effetti benefici sulla salute. Dal punto di vista economico, secondo quanto emerge dall'analisi di *Ims Health Italia*, l'Italia è uno dei mercati europei più maturi nel settore della nutraceutica: nel 2014 la spesa ha raggiunto i 2,4 miliardi di euro, e il mercato italiano è cresciuto dell'8,2% rispetto a una media europea del 7,5%.

Un mercato in crescita considerato che alcuni di questi prodotti sono spesso utilizzati in associazione alle terapie o come strumento di prevenzione, tendenza che ha implicazioni importanti nella sfera comunicativa tra medico, farmacista e paziente.

2. PARTE GENERALE

2.1 Caratteristiche nutraceutiche dell'olio extravergine di oliva

L'olio extravergine di oliva è il prodotto ottenuto da un processo puramente meccanico dei frutti sani dell'olivo (*Olea europaea sativa L.*), che risponde ai requisiti fissati dal Regolamento CE 1989/03. Un siffatto olio è caratterizzato da un *flavour* fragrante e delicato che è stato apprezzato fin dall'antichità da tutti i popoli del bacino mediterraneo, sua naturale zona di provenienza, e che ne ha diffuso il consumo anche nei paesi in cui era praticamente sconosciuto (Nord Europa, Canada, Stati Uniti)¹.

L'olio extravergine di oliva oltre ad essere un condimento di grande pregio nutrizionale, come dimostra il ruolo di primaria importanza riservatogli nella “dieta mediterranea” è soprattutto un grande alimento, dotato di una ricca carica sensoriale che lo rende unico tra gli oli vegetali.

Il primo impatto del nostro organismo con un alimento è legato, infatti, alle sue caratteristiche organolettiche: colore, odore, sapore.

Oltre alle ottime caratteristiche organolettiche, un olio di alta qualità è dotato di altrettanti pregi nutrizionali, legati principalmente agli effetti benefici che ha sulla salute umana. Essendo un grasso vegetale ricco di acidi grassi monoinsaturi e di sostanze antiossidanti (polifenoli e tocoferoli, principalmente) è in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi. Favorisce, inoltre, il metabolismo e l'assorbimento dei grassi e delle vitamine A, E, K e D². Il consumo dell'olio extravergine d'oliva contribuisce a prevenire molte malattie croniche, soprattutto quelle cardiovascolari. Protegge stomaco e apparato digerente; agisce su colesterolo e arteriosclerosi, abbassa i livelli di LDL (colesterolo “cattivo”) e incrementa l'HDL (colesterolo “buono”)³. Previene il

¹ Morales et al., 1995; Angerosa, 1998

² Visioli e Galli, 1998

³ Viola, L'Olio di Oliva e la Salute, Consiglio Oleicolo Internazionale, Madrid, 1997

deterioramento delle cellule e l'insorgenza di tumori ed ancora, è utile nella vecchiaia perché favorisce l'assorbimento del calcio e la sua mineralizzazione, prevenendo l'osteoporosi⁴.

Per questi motivi l'olio extravergine di oliva risulta essere un alimento di grande pregio in quanto, oltre ad appagare i nostri sensi grazie alle variegata sfaccettature olfatto-gustative, è anche salutare.

L'olio extravergine d'oliva si distingue da tutti gli altri oli vegetali perché deriva da un frutto e non da semi e perché viene ottenuto esclusivamente mediante operazioni di tipo fisico-meccanico. La qualità di un olio extravergine, dunque, dipende in misura preponderante dalla qualità delle olive e, secondariamente, dalle tecnologie impiegate nell'estrazione. L'olio è contenuto nella polpa dell'oliva sotto forma di grosse gocce (olio vacuolare o libero) e di piccole goccioline (olio citoplasmatico o legato), più difficile da estrarre⁵.

È costituito per circa il 98% da trigliceridi, esteri di glicerolo con tre acidi grassi. Nell'olio extravergine di oliva gli acidi grassi sono in parte saturi (i principali sono acido palmitico e acido stearico), in quantità maggiore sono monoinsaturi (preponderante è l'acido oleico) e in misura minore polinsaturi, con due o tre doppi legami (acido linoleico e acido linolenico).

Il grado di insaturazione influenza la suscettibilità dell'olio all'ossidazione da parte dell'ossigeno atmosferico con formazione degli idroperossidi, i quali possono andare incontro ad ulteriori reazioni, con formazione di prodotti secondari di ossidazione, che, se volatili, contribuiscono alla insorgenza della rancidità⁶.

⁴ Curci, 2001

⁵ Sacchi et al., 2003

⁶ Sacchi et al., 2003

L'importanza della composizione in acidi grassi di un olio risiede nel fatto che essa è in grado di influenzarne molti aspetti, quali:

- l'aspetto organolettico (fluidità);
- lo stato fisico (cristallizzazione dei trigliceridi saturi a basse temperature);
- la stabilità all'ossidazione (minore per gli acidi grassi polinsaturi).

La composizione in acidi grassi ha importanti ripercussioni anche a livello nutrizionale, dato che la composizione lipidica della dieta può incidere sulla regolazione del livello di colesterolo nel sangue⁷. Le più recenti acquisizioni della ricerca medica, infatti, assegnano all'acido oleico un ruolo determinante nel mantenere il livello ottimale delle HDL (*High Density Lipoproteins*), lipoproteine responsabili del giusto tasso ematico di colesterolo, modificando positivamente i fattori di rischio per le malattie cardiovascolari⁸. Tuttavia, elevate concentrazioni di acido oleico, si riscontrano anche in altri oli come quello di nocciola o di girasole "ad alto oleico", ma il grande pregio nutrizionale dell'olio extravergine di oliva non è dovuto soltanto alla sua equilibrata composizione in acidi grassi, ma soprattutto alla presenza dei cosiddetti "componenti minori".

Questi, sebbene rappresentino non oltre il 2% in peso dell'olio, comprendono più di 200 composti diversi la cui concentrazione varia da poche ppm a qualche centinaia di ppm. Tra i componenti minori quelli che assumono particolare importanza sono:

- I composti volatili;
- Le sostanze antiossidanti;
- I pigmenti;

⁷ Grundy, 1986

⁸ Viola, 1997

- Gli steroli;
- Gli idrocarburi;
- I fosfolipidi;
- Gli alcoli terpenici.

Responsabili del *flavour* di un olio extravergine di oliva, in particolare delle sue “note verdi”, sono composti volatili quali aldeidi, chetoni, alcoli ed esteri, che derivano prevalentemente dall’azione enzimatica delle lipossigenasi, alcol deidrogenasi, esterasi ed isomerasi. Il componente più abbondante è la trans-2-esenale, caratterizzata da odore di erba tagliata di fresco o di mandorla amara⁹.

Al gruppo delle sostanze antiossidanti appartengono tocoferoli e composti fenolici, attualmente considerati i più importanti antiossidanti naturali che determinano l’eccezionale stabilità dell’olio extravergine di oliva durante la conservazione e nei processi di cottura¹⁰. Queste sostanze, pur avendo strutture chimiche differenti, hanno in comune la capacità di agire da *radical-scavengers*, e cioè di generare radicali stabili dopo aver ceduto un elettrone ai radicali messi in gioco nel processo di ossidazione, neutralizzandoli¹¹.

Tutte le diverse forme dei tocoferoli ($\alpha - \beta - \gamma - \delta$) hanno azione antiossidante; l’ α -tocoferolo, però, è la forma assorbita in via preferenziale dall’organismo (provitamina E) ed è quella più abbondante nell’olio extravergine di oliva, anche se la sua concentrazione è strettamente influenzata dalla varietà e dal grado di maturazione delle olive.

⁹ Morales et al.,1999

¹⁰ Montedoro et al.,1992

¹¹ Vitagliano, 1982

I composti fenolici, oltre ad intervenire nella prevenzione dell'ossidazione dell'olio, svolgono anche molte altre azioni: contribuiscono alla definizione dei caratteri organolettici, determinando, in particolare, la sensazione di amaro-piccante non sempre positivamente accettata dal consumatore¹²; proteggono il frutto dell'olivo dall'attacco di parassiti, come la larva della mosca olearia; svolgono un'azione inibitoria nei confronti degli enzimi del nostro organismo che agiscono sulla pressione arteriosa¹³; presentano proprietà antinfiammatorie, antiaterogene, antitumorali¹⁴.

I composti fenolici, denominati anche "biofenoli", sono costituiti da due frazioni: una semplice ed una complessa, detta anche idrolizzabile. Nella prima frazione, che rappresenta solitamente meno del 20% dei fenoli totali, sono stati identificati acidi fenolici e fenil-alcoli, tra i quali rivestono particolare importanza il tirosolo (pidrossifeniletanolo, Ty) e l'idrossitirosolo (3,4-didrossifeniletanolo, OHTy).

La seconda frazione, invece, è formata da strutture complesse che costituiscono oltre l'80% della componente fenolica totale e contengono, a livello molecolare, il tirosolo e l'idrossitirosolo. La resistenza dell'olio all'ossidazione è da mettere in relazione, più che al patrimonio di fenoli totali, soprattutto alla dotazione di fenoli complessi che contengono l'idrossitirosolo; infatti quest'ultimo, così come tutti gli o-difenoli, contribuisce maggiormente alla stabilità dell'olio.

Il rilascio nell'olio di tali componenti avviene a partire da precursori amari presenti nel frutto, tra cui i più abbondanti sono l'oleuropeina e il ligstroside, glucosidi di natura fenolica presenti nell'oliva, ma non nell'olio. Il loro contenuto nel frutto diminuisce con il progredire della

¹² Solinas et al., 1990; McEwan et al., 1994

¹³ Sacchi et al., 2003

¹⁴ Visioli et al., 2002; Markmann, 2007; Fernander et al., 2006; Escrich et al., 2006

maturazione per effetto di β -glicosidasi che liberano lo zucchero generando agliconi in parte liposolubili: la forma dialdeidica e la forma aldeidica dell'acido elenolico esterificato con idrossitirosolo (OHTy-EDA), le stesse esterificate con tirosolo (Ty-EDA), la forma dialdeidica del decarbossimetil acido elenolico esterificato con l'OHTy (OHTy-DEDA). Dall'idrolisi degli agliconi dell'oleuropeina e del ligstroside, ad opera di esterasi, si liberano tirosolo, idrossitirosolo ed acido elenolico¹⁵.

I pigmenti responsabili del colore dell'olio extravergine di oliva sono le clorofille ed i carotenoidi. Le clorofille, che si distinguono, in base alla formula chimica, in clorofille A e B, e feofitine A e B, sono presenti nell'olio in quantità variabili tra 1 e 20 ppm, soprattutto come feofitina A. Il contenuto totale dipende dal sistema di frangitura, dalle temperature di processo e dalla tecnologia di estrazione (generalmente è maggiore in oli estratti per centrifugazione che in oli estratti per pressione), oltre che dalla varietà e dal grado di maturazione del frutto (maggiore nelle olive poco mature). Oltre ad essere responsabili del colore verde dell'olio, questi composti possono assumere il ruolo di agenti pro-ossidanti, in particolare nel processo di fotossidazione di oli conservati alla luce, esercitando al contrario un'azione antiossidante al buio¹⁶.

I carotenoidi sono invece i principali responsabili del colore giallo, evidente in oli ottenuti da olive mature, dove il contenuto di clorofilla è significativamente ridotto. Tali pigmenti mostrano un'azione protettiva nei confronti della fotossidazione¹⁷.

Gli idrocarburi sono un gruppo estremamente eterogeneo di composti che possono essere suddivisi in idrocarburi saturi, tra cui il nonacosano è il predominante, e idrocarburi insaturi, il cui componente più

¹⁵ Montedoro et al., 1993

¹⁶ Endo et al., 1984; Kiritsakis e Dugan, 1985; Usuki et al., 1984

¹⁷ Sacchi et al., 2003

rappresentato è lo squalene, importante per la sua partecipazione alla riduzione del livello di colesterolo nel sangue e per la sua capacità di interdire la proliferazione di alcune cellule tumorali¹⁸.

In definitiva, la composizione chimica dell'olio extravergine di oliva, che dipende sia dal tipo di materia prima utilizzata sia dalla particolare tecnica estrattiva puramente fisica, grazie alla quale è possibile inglobare i componenti minori che andrebbero invece persi con i processi di estrazione al solvente e di rettificazione¹⁹, è strettamente collegata alla qualità nutrizionale dell'alimento.

Con il termine “qualità” si intende “l’insieme delle proprietà e delle caratteristiche di un prodotto che conferiscono ad esso la capacità di soddisfare esigenze espresse o implicite del consumatore”²⁰.

I parametri di qualità per l’attribuzione della categoria merceologica ad un olio extravergine di oliva sono dettati dal Reg. CEE 2568/91 e successive modifiche (Reg. CE 796/02; Reg. CE 1989/03).

Tabella 1: Parametri di qualità per la classificazione degli oli extravergini d'oliva.

CATEGORIA	ACIDITÀ	N° DI PEROSSIDI	INDICI SPETTROFOTOMETRICI			VALUTAZIONE ORGANOLETTICA	
			K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Md *	Mf *
Vergine extra	≤ 0.8	≤ 20	≤ 2.5	≤ 0.22	≤ 0.01	0	≥ 0
Vergine	≤ 2.0	≤ 20	≤ 2.6	≤ 0.25	≤ 0.01	≤ 2.5	> 0
Lampante	> 2	-	-	-	-	> 2.5	-

* Md: Mediana del difetto; Mf: Mediana del fruttato

La misura dell’acidità è la più antica determinazione utilizzata per la valutazione della qualità dell’olio e per la sua classificazione merceologica. Questo parametro fornisce elementi utili per valutare lo

¹⁸ Psomiadou e Tsimidou, 1999

¹⁹ Solinas et al., 1990

²⁰ Peri, 1995; Magli e Rotondi, 1998

stato di degrado dell'oliva prima dell'estrazione; i trigliceridi dell'olio, infatti, si degradano a seguito dell'azione di un enzima, la lipasi, che si trova nell'oliva ed esercita la sua attività all'interno del frutto se questo ha subito lesioni cellulari. La lipasi, in presenza di acqua, idrolizza il legame esistente tra l'acido grasso ed il glicerolo, producendo acidi grassi liberi che costituiscono l'acidità libera dell'olio.

Il numero di perossidi misura lo stato di ossidazione primaria degli acidi grassi. Questo parametro, determinato sull'olio appena prodotto, fornisce un'indicazione dello stato sanitario e di degrado dell'oliva. Il doppio legame tra gli atomi di carbonio è responsabile dell'ossidazione dell'olio da parte dell'ossigeno con formazione di idroperossidi, molecole decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, quali aldeidi e chetoni, responsabili del difetto di rancido. Il doppio legame va incontro a modifiche anche quando l'olio è sottoposto a trattamenti di rettificazione, con formazione di doppi legami coniugati. Sia questi ultimi che i prodotti secondari di ossidazione comportano una variazione dell'intensità di assorbimento nella regione dell'UV²¹. I processi ossidativi possono essere rivelati attraverso la misura delle costanti spettrofotometriche:

- K232 (valore dell'estinzione specifica a 232 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo d'assorbimento dei dieni coniugati);
- K270 (valore dell'estinzione specifica 270 nm, lunghezza d'onda cui corrisponde il massimo d'assorbimento dei trieni coniugati).
- DK (andamento della curva di assorbimento nell'intervallo 264-272 nm; mette in luce la presenza dei composti di ossidazione secondari).

²¹ Sacchi et al., 2003

Pari importanza rispetto alla determinazione dei parametri analitici, ai fini dell'attribuzione della categoria merceologica, assume la valutazione organolettica (Panel test).

Il metodo, introdotto nel 1991 con il Reg. CEE 2568 e modificato dal Reg. CE 796/02, consente di valutare nella maniera il più possibile oggettiva il profilo organolettico di un olio extravergine di oliva.

L'oggettività è garantita essenzialmente dalla standardizzazione delle condizioni di assaggio e dall'elaborazione statistica delle valutazioni effettuate indipendentemente dagli 8-12 assaggiatori esperti costituenti la giuria.

Accanto agli indici di qualità ufficiali, che consentono di attribuire ad un olio la categoria merceologica, è possibile ricorrere a parametri analitici non ufficiali allo scopo di caratterizzare in maniera più completa un olio dal punto di vista qualitativo. Informazioni utili sulla qualità di un olio possono essere fornite, infatti, da:

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

Ad influenzare questi parametri, le diverse operazioni tecnologiche hanno notevole ripercussione sulla composizione dell'olio extravergine di oliva:

- Metodi di raccolta
- Defogliatura e lavaggio delle olive.
- Conservazione delle drupe.
- La conservazione delle olive in condizioni non adeguate
- Frangitura
- Conservazione dell'olio.

Di particolare interesse, per il lavoro svolto che verrà di seguito illustrato, è focalizzare l'attenzione su quest'ultimo punto.

2.2 L'ossidazione lipidica e la *shelf-life* degli oli imbottigliati

La fase di stoccaggio dell'olio rappresenta un punto critico per quella che sarà la *shelf-life* del prodotto, ovvero la sua vita commerciale. L'olio estratto è un prodotto torbido di relativa stabilità. La torbidità, frutto della sospensione di tracce di acqua e sostanze solide, rende ancora l'olio sede di attività enzimatiche di degradazione, soprattutto a carico della componente fenolica.

È quindi buona norma stabilizzare l'olio attraverso la sua chiarificazione mediante travasi e filtrazioni. L'olio limpido, essendo privo di acqua, è potenzialmente oggetto solo di fenomeni di degradazione non enzimatici, quali l'autossidazione e la fotossidazione dei trigliceridi e l'idrolisi e l'ossidazione non enzimatica dei composti fenolici.

I tempi lunghi di conservazione (le tecniche produttive e commerciali dovrebbero garantire fino ad un anno di conservabilità) permettono a questi fenomeni di procedere e portare al decadimento qualitativo, a cominciare dal mancato rispetto dei parametri di legge.

La suscettibilità dell'olio a questi fenomeni dipende innanzitutto dalle caratteristiche originarie dell'olio; elevata acidità, e il basso

contenuto di composti fenolici rappresentano in forma combinata condizioni di composizione favorevoli alla degradazione in conservazione. Ciononostante l'ossigeno, la luce, le alte temperature, combinati a lunghi tempi di esposizione, favoriscono i fenomeni degradativi, aumentandone significativamente la velocità.

Le tecniche produttive possono quindi essere condotte cercando di rimuovere le cause ambientali di degradazione.

Finché l'olio è conservato in azienda è possibile tenere sotto controllo la degradazione utilizzando recipienti opachi alla luce (ad esempio serbatoi di acciaio inox) privi di aria nello spazio di testa e posti in ambienti a 18-20°C.

Quando l'olio è sul mercato e ancora di più quando è consumato diventa però difficile tenere sotto controllo le modalità di utilizzo del prodotto; diventano essenziali nella conservazione del prodotto le sue caratteristiche compositive di maggiore o minore stabilità, eventualmente unite a modalità di confezionamento e commercializzazione che possano ridurre l'impatto dell'esposizione incontrollata dell'olio alle cause ambientali di degradazione (ad esempio l'uso di confezioni primarie di protezione dalla luce, confezioni di ridotta capacità, tecniche logistiche che riducano i tempi di stoccaggio del prodotto prima dell'acquisto).

L'olio, dunque, durante il periodo di conservazione, subisce un processo di degradazione ossidativa. Per ossidazione non si intende una singola reazione chimica, ma il risultato di una serie di alterazioni che si verificano a carico degli acidi grassi, in particolare di quelli insaturi, per azione dell'ossigeno che, in presenza di catalizzatori (luce, metalli, calore), forma una complessa miscela di composti di ossidazione.

Nel processo di autossidazione (ossidazione a temperatura ambiente: 20-40°C), l'ossigeno atmosferico conduce alla formazione di

idroperossidi (prodotti primari di ossidazione) a partire dagli acidi grassi insaturi tramite un meccanismo di azione radicalico.

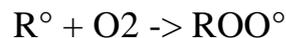
Le fasi fondamentali di questo processo sono quattro:

- INDUZIONE
- PROPAGAZIONE
- DECOMPOSIZIONE DEGLI IDROPEROSSIDI
- TERMINAZIONE

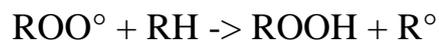
Nella prima fase d'**induzione** si ha la formazione di radicali liberi molto instabili, a partire da un acido grasso che ha perso un atomo di idrogeno da un metilene allilico (carbonio adiacente ad un carbonio impegnato in un doppio legame), grazie all'azione della luce ultravioletta e all'azione catalizzante dei metalli presenti nell'olio²²:



In seguito il radicale, reagendo velocemente con l'ossigeno, porta alla formazione di un radicale perossidico:



Questo composto molto reattivo continua a reagire con gli acidi grassi insaturi, portando alla formazione di idroperossidi (prodotti di ossidazione primari) e altri radicali, che ricominciano il ciclo:



Da questo punto ha inizio una reazione a catena in quanto il radicale ottenuto, in presenza di ossigeno, forma nuovamente un radicale

²² Frankel, 1998

perossidico ripetendo il processo (**propagazione**) e determinando così l'accumulo di idroperossidi.

I prodotti dell'ossidazione primaria, gli idroperossidi, sono composti inodori, incolori, molto instabili. Dalla loro decomposizione, favorita da temperature elevate, prendono origine i prodotti "secondari" che, invece, possono presentare un forte impatto sensoriale. Possono, infatti, essere altobollenti, quindi non volatili, oppure bassobollenti, e quindi volatili e responsabili dell'odore di "rancido" o "fritto".

In assenza di ossigeno, il processo si interrompe e il numero di idroperossidi rilevabili risulta basso, ma, se l'ossigeno non manca e la temperatura è relativamente alta, si producono numerose molecole di questi composti decisamente instabili che si decompongono in prodotti di ossidazione secondari, individuabili in molecole volatili e non, responsabili di difetti organolettici degli oli²³.

Quindi nella fase di **decomposizione** degli idroperossidi si formano composti tossici e/o maleodoranti che danneggiano sia la qualità nutrizionale che organolettica dell'olio (irrancidimento).

Il numero di molecole che si originano nella fase di decomposizione degli idroperossidi è molto alto. In relazione al numero di doppi legami presenti negli acidi grassi insaturi, si possono formare diverse specie di idroperossidi. La decomposizione di ognuno di questi idroperossidi può dare origine a diverse molecole (chetoni, aldeidi, ossiacidi, idrocarburi, ecc.) che possono simultaneamente contribuire al profilo sensoriale dell'olio. Si è osservato che dall'ossidazione in vitro dell'acido linoleico si sono formate 80-85 specie diverse di molecole. Risulta quindi difficile misurare con un unico metodo analitico l'effettivo stato di ossidazione di un olio.

²³ Frankel, 1998

Un primo passo consiste nello stabilire il grado di ossidazione iniziale con la determinazione del numero di perossidi. A questo andrebbe affiancata la misura di un marcatore dello stadio secondario dell'ossidazione, ad esempio uno dei composti volatili (aldeidi, idrocarburi) o non volatili che vengono a prodursi²⁴.

La fase di **terminazione** avviene, almeno teoricamente, quando due radicali si incontrano dando origine ad un prodotto inattivo (dimeri). I dimeri sono molecole che si trovano negli oli, ma affinché due radicali liberi si incontrino è necessario che l'olio sia riscaldato fortemente in maniera tale che i moti molecolari siano molto intensi. Questo si verifica nella frittura, dove si ritrovano molecole che hanno un ponte -O-O- tra due trigliceridi, molecole che, dunque, hanno un peso molecolare circa doppio rispetto ai trigliceridi normali. L'analisi dei dimeri è un indice specifico degli oli termossidati. Si deve, infatti, distinguere tra ossidazione a temperatura ambiente, o auto-ossidazione, e ossidazione indotta dalle alte temperature, o termoossidazione.

La prima assume importanza soprattutto ai fini della conservazione dell'olio, mentre quella ad alta temperatura, nei processi di cottura (frittura, cottura al forno, ecc).

La terminazione, inoltre, può avvenire per stabilizzazione del radicale con un antiossidante. Le molecole naturali che fungono da antiossidanti possono presentare diversi meccanismi di azione: alcune bloccano la fase di iniziazione (chelatori di metalli, quali ad esempio l'acido ascorbico), altre (*radical scavengers*, quali fenoli e tocoferoli) rallentano la fase di propagazione, "catturando" i radicali liberi, sono queste ultime, in particolare, ad intervenire nella fase di terminazione.

Per questo motivo, la qualità dell'olio imbottigliato, può essere fortemente compromessa da fenomeni di ossidazione e foto-ossidazione,

²⁴ Frankel, 1998

che alterano le caratteristiche organolettiche e nutrizionali del prodotto. La reazione è innescata, in presenza di ossigeno, da una fonte energetica quale il calore o la radiazione luminosa e procede fino alla completa alterazione del prodotto.

L'entità della fotodegradazione di un olio imbottigliato dipende, dunque, dal comportamento (trasmittanza, assorbanza, riflessione) del materiale di imbottigliamento nei confronti della luce visibile e della radiazione ultravioletta e dalle sue proprietà barriera nei confronti dell'ossigeno atmosferico, nonché dalle condizioni di stoccaggio del prodotto confezionato.

2.3 Health claim

Un *Health claim* (indicazione salutistica) è una modalità tecnica per assicurare un'informazione veritiera e completa in merito ai benefici sulla salute associati al consumo di un prodotto alimentare.

È divenuta negli ultimi anni una delle opzioni regolatorie più utilizzata per aiutare il consumatore a scegliere cibi più salutari.

Il Regolamento (CE) 1924/2006²⁵ individua i cosiddetti “*claims*”, in tre tipologie:

- indicazione nutrizionale: qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda che un alimento abbia particolari proprietà nutrizionali benefiche, dovute all'energia e/o alle sostanze nutritive o di altro tipo che contiene (Art. 2 Reg. 1924/2006);

²⁵ European Union: Regulation (EC) No. 1924/2006

- indicazione sulla salute: riguarda qualunque indicazione che affermi, suggerisca o sottintenda l'esistenza di un rapporto tra un alimento, o uno dei suoi componenti, e la salute (Art. 2 Reg. 1924/2006);
- indicazioni relative alla riduzione di un rischio di malattia.

Le indicazioni sulla salute fornite sui prodotti alimentari devono essere preventivamente autorizzate dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e incluse in un elenco di indicazioni consentite.

Per quanto riguarda l'olio extravergine di oliva, l'EFSA ha approvato una delle sette indicazioni "funzionali generiche" sulla salute sottoposte a valutazione (ai sensi dell'art. 13 par. 1) ossia quelle riferite al ruolo di una sostanza nutritiva o di altro tipo per la crescita, lo sviluppo e le funzioni dell'organismo; alle funzioni psicologiche e comportamentali; al dimagrimento e al controllo del peso, al senso di sazietà o alla riduzione dell'energia apportata dal regime alimentare". Tale indicazione è stata successivamente autorizzata dalla Commissione Europea (Reg. UE 432/2012²⁶). Il parere dell'EFSA riguardante i *claims* dell'olio di oliva è il seguente²⁷: *“Il costituente alimentare oggetto delle indicazioni sulla salute è costituito dai polifenoli (es. idrossitirosolo, complessi dell'oleuropeina e tirosolo) contenuti nell'olio di oliva (Olea europaea L., estratto e foglie). Il gruppo di esperti ritiene che i polifenoli contenuti in olio di oliva standardizzato sono sufficientemente caratterizzati in relazione agli effetti dichiarati. I claims indicati sono:*

- ✓ *"riduce lo stress ossidativo",*
- ✓ *"proprietà antiossidanti",*
- ✓ *"metabolismo lipidico",*
- ✓ *"attività antiossidante,*

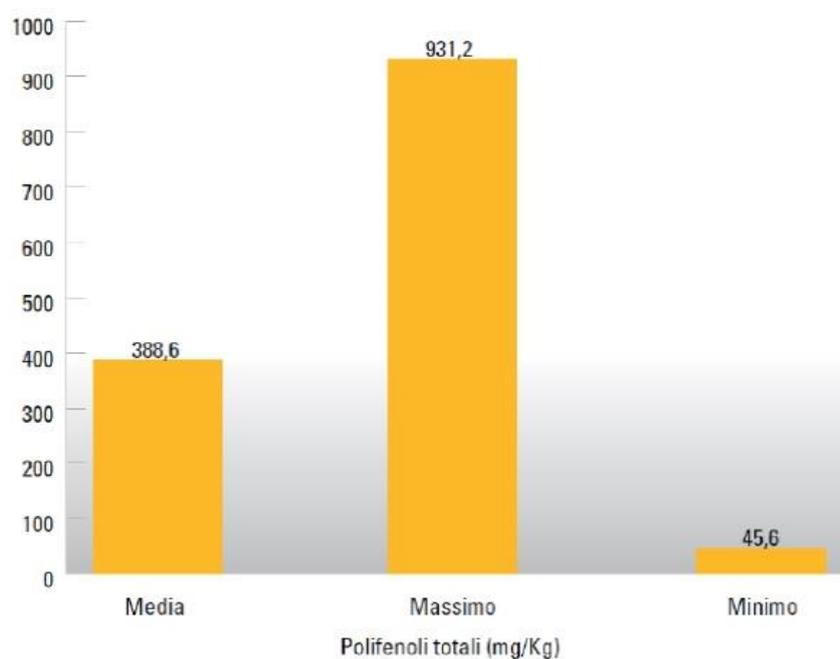
²⁶ Regolamento (UE) N° 432/2012

²⁷ EFSA Panel On Dietetic products, nutrition and allergies (NDA)

- ✓ “proteggono le cellule del corpo e LDL dai danni ossidativi”
- ✓ "proprietà antiossidanti".

Il gruppo di esperti presuppone che la popolazione target sia la popolazione generale. Nel contesto delle formulazioni proposte, il gruppo di esperti ritiene che gli effetti indicati si riferiscono alla protezione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) dal danno ossidativo. La protezione delle particelle LDL dal danno ossidativo può essere un effetto fisiologico benefico. Al fine di sostenere il claim, devono essere consumati quotidianamente 5 mg. di idrossitirosolo e suoi derivati (ad esempio complessi di oleuropeina e tirosolo) in olio di oliva. Questa quantità, se fornita da moderate quantità di olio d'oliva, può essere facilmente consumata nell'ambito di una dieta equilibrata. Le concentrazioni in alcuni oli possono essere troppo basse per consentire il consumo di questa quantità di polifenoli nel contesto di una dieta equilibrata”. Nella figura 1, sono riportati i valori medi (mg/kg) dei polifenoli totali in oli extravergini di oliva.

Figura 1: Valori medi (mg/kg) dei polifenoli totali in oli extravergini di oliva.



2.4 Piante officinali

Di particolare interesse per i consumatori sono le sostanze antiossidanti contenuti negli alimenti. A tal proposito particolare attenzione, nell'ultimo periodo, si è dato anche alle piante officinali.

Con il termine “officinali” si intende l'insieme di tutte quelle specie vegetali che, direttamente o tramite principi attivi estratti da esse, possiedono interesse medicinale o aromatico o cosmetico. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha puntualizzato il termine “pianta medicinale” assegnandola ad *“ogni vegetale che contiene sostanze che possono essere utilizzate per scopi terapeutici o preventivi, sotto forma di preparati semplici. Oppure, dopo averle isolate e modificate chimicamente, possono far parte di prodotti farmaceutici e quindi sono i precursori di sintesi chimico-farmaceutiche”*.

Con questa definizione si è voluto rivalutare tutta una serie di piante, di norma conosciute con l'espressione di “piante della medicina popolare”, che costituivano fino a pochi decenni fa la base della scienza medica, spesso dimenticate con il successivo avvento dei farmaci di sintesi²⁸. Tuttavia, negli ultimi anni, questo interesse sembra aver ripreso vigore poiché, secondo quanto riportato dall'OMS, più del 25% della popolazione nei Paesi industrializzati e più dell'80% nei Paesi in via di sviluppo, si cura con rimedi naturali²⁹. Con la definizione di “pianta aromatica”, invece, vengono indicate quelle piante dotate di una o più sostanze che conferiscono particolari odori o sapori e che vengono impiegate nella preparazione di bevande, profumi, cosmetici e per condire alimenti.

²⁸ De Maria, 1992

²⁹ Canter et al., 2005

2.5 Piante officinali nella storia

Le piante e le erbe officinali prendono il loro nome dalla parola latina “*officina*”, in riferimento agli antichi laboratori farmaceutici dove si procedeva all'estrazione di droghe tradizionalmente usate nella medicina popolare³⁰. Anche se le specie officinali sono state utilizzate, fin dall'antichità, per il loro profumo, sapore e per le proprietà conservanti³¹, tra gli oli essenziali conosciuti solo l'olio di trementina è menzionato dagli storici greci e romani³².

La distillazione come metodo per estrarre gli oli essenziali (EO) viene introdotta per la prima volta in Oriente (Egitto, India e Persia) più di 2000³³ anni fa ed è stato migliorato nel IX secolo dagli arabi³⁴. Il primo scritto autentico riguardo la distillazione è attribuito ad Arnaldo de Villa Nova (ca. 1235-1311), alchimista catalano³⁵. Dal XIII secolo gli oli essenziali venivano prodotti dalle farmacie e i loro effetti farmacologici furono descritti nei trattati di farmacopea³⁶, ma il loro uso non sembra essersi diffuso in Europa fino al XVI secolo. Da quel momento gli oli essenziali venivano scambiati e commercializzati nella città di Londra³⁷.

Mediante pubblicazioni separate inerenti la distillazione e l'uso degli oli essenziali, due alchimisti del XVI secolo Brunschwig e Reiff, citano solo un numero relativamente piccolo di oli, tra questi quelli di trementina, legno di ginepro, rosmarino, lavanda, chiodi di garofano, noce moscata, anice e cannella³⁸. Secondo il medico francese Du Chesne, nel

³⁰ AA.VV., 2001

³¹ Bauer et al., 2001

³² Guenther, 1948

³³ Guenther, 1948

³⁴ Bauer et al., 2001

³⁵ Guenther, 1948

³⁶ Bauer et al., 2001

³⁷ Crosthwaite, 1998

³⁸ Guenther, 1948

XVII secolo la preparazione di EO era ben nota e le farmacie generalmente possedevano 15-20 oli diversi³⁹.

L'uso dell'olio dell'albero del tè per uso medico è stato documentato sin dall'inizio della colonizzazione dell'Australia fino alla fine del secolo XVIII, anche se è probabile che sia stato utilizzato, precedentemente, dai nativi australiani⁴⁰.

I primi esperimenti riguardo proprietà battericide dei vapori di EO sono stati realizzati da De la Croix nel 1881⁴¹. Tuttavia, nel corso dei secoli XIX e XX, l'uso degli oli essenziali in medicina a poco a poco è diventato secondario rispetto al loro utilizzo per insaporire e aromatizzare⁴².

2.6 Oli essenziali e loro attività

Le piante aromatiche hanno tessuti specializzati nella secrezione di metaboliti secondari; questi tessuti sono situati in diverse parti. I prodotti di secrezione hanno natura chimica diversa: cristalli di ossalato di calcio, resine, gomme, mucillagini, terpeni, tannini, lattici, pigmenti, oli essenziali⁴³.

Questi ultimi sono i secreti più abbondanti, formati da miscele di molecole organiche volatili, solubili in solventi organici e insolubili in acqua, avente odore caratteristico della pianta che li produce.

Le famiglie botaniche più ricche di oli essenziali sono le Asteracee, le Lamiaceae, le Rutaceae, le Liliaceae, le Pinaceae⁴⁴.

³⁹ Guenther, 1948

⁴⁰ Carson et al., 1993

⁴¹ Boyle, 1955

⁴² Guenther, 1948

⁴³ Figueiredo et al., 2008

⁴⁴ Figueiredo et al., 2008

I costituenti di un'essenza possono essere raggruppati in quattro categorie principali:

1-idrocarburi non ramificati;

2-derivati del benzene;

3-terpeni aciclici e ciclici;

4-composti vari: ossigenati (aldeidi, chetoni, alcoli, esteri ed acidi), solforati od azotati.

I componenti di un olio essenziale possono poi subire trasformazioni chimiche nel corso dello sviluppo della pianta. Ad esempio, si è constatato che nei primi stadi di vegetazione la pianta presenta un'essenza contenente molti composti a funzione alcolica; durante il periodo di formazione e di sviluppo delle infiorescenze, gli acidi liberi che si trovano nella pianta reagiscono con gli alcoli formando esteri.

Le sostanze odorose compaiono generalmente nelle parti verdi della pianta, sin dai primi mesi di vita, poi continuano a formarsi ed accumularsi fino alla fioritura, rallentando con il progredire della stessa⁴⁵.

Per un completo studio della formazione degli oli bisogna considerare alcuni aspetti, quali l'effetto della crescita⁴⁶, il momento stagionale, l'influsso climatico⁴⁷. Ad esempio, le piante che crescono in alta montagna, dove le funzioni clorofilliane sono più attive per effetto della maggior luce, danno oli più ricchi in esteri di quelli che si trovano ad altitudini minori.

Le sostanze che comunemente conferiscono le proprietà aromatiche si accumulano in tutti gli organi della pianta (steli, foglie, gemme, fiori,

⁴⁵ Figueiredo et al., 2008

⁴⁶ Miguel et al., 2004

⁴⁷ Figueiredo et al., 2008

semi, frutti, legno e radici), sebbene siano maggiormente sintetizzati nelle parti aeree, in particolar modo in strutture specializzate dette peli ghiandolari, dotti resiniferi, ghiandole lisigene⁴⁸.

I costituenti degli oli essenziali possono essere catalogati in due classi: quella dei derivati terpenoidici, costituita da terpeni, multipli dell'isoprene (due o tre unità), che trae origine biosintetica dall'acido mevalonico, e quella dei composti aromatici, biogeneticamente derivanti dall'acido scichimico e dai fenilpropanoidi.

Gli oli essenziali possono essere classificati in base al costituente chimico maggiormente rappresentato. I principali gruppi sono i seguenti:

- a prevalente contenuto di idrocarburi (limone, ginepro);
- a prevalente contenuto di aldeidi (cannella, mandorlo, melissa);
- a prevalente contenuto di alcoli (sandalò, geranio, coriandolo);
- a prevalente contenuto di chetoni (carvi, salvia, assenzio, maggiorana);
- a prevalente contenuto di fenoli (origano, anice, timo comune, santoreggia, garofano);
- a prevalente contenuto di composti solforati (aglio, cavolo);
- a prevalente contenuto di esteri (lavanda, mirtillo, pompelmo);
- a prevalente contenuto di acidi (sedano, fragola);
- a prevalente contenuto di lattoni (bergamotto, cocco)⁴⁹.

Lungo gli anni gli oli essenziali e altri estratti delle piante, hanno suscitato un notevole interesse come risorsa di prodotti naturali. Sono stati saggiati come rimedi alternativi a numerose malattie. Gli oli essenziali hanno mostrato possedere proprietà antibatteriche, antifungine, antivirali,

⁴⁸ Novak et al., 2005

⁴⁹ Catizone et al., 1986

insetticide e antiossidanti⁵⁰. Alcuni oli essenziali vengono usati anche nel trattamento del cancro⁵¹.

Gli oli essenziali vengono impiegati anche per la conservazione dei cibi⁵², nell'aromaterapia⁵³, nell'industria cosmetica. In passato, così come negli ultimi anni, c'è stato un notevole interesse per le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali. Il meccanismo di azione degli oli essenziali sui microrganismi non è stato molto indagato. Alcuni autori hanno attribuito l'attività antimicrobica degli oli essenziali all'interazione del loro gruppo funzionale (essenzialmente il fenolo) con lo sviluppo delle cellule microbiche, mentre altri autori hanno evidenziato come gli oli essenziali causano un deterioramento della membrana citoplasmatica⁵⁴.

E' stato anche ipotizzato che la complessa costituzione degli oli essenziali rappresenta una forte barriera per la crescita dei microrganismi patogeni. Questa teoria è ben documentata nel dettagliato studio sull'attività antifungina dell'olio essenziale di *Myrica gale*⁵⁵.

Dall'analisi di diversi oli essenziali per le loro proprietà biocide nei riguardi di numerosissimi generi di batteri e funghi, si è constatato come essi abbiano esercitato un'inibizione nella crescita di questi microrganismi, dipendente dalla concentrazione dell'olio e dalla loro composizione chimica. Oltre a proprietà antimicrobiche⁵⁶ è stato dimostrato che gli oli essenziali posseggono anche proprietà antivirali⁵⁷, antimicotiche, antitossinogene⁵⁸, antiparassitarie⁵⁹, insetticide⁶⁰ ed

⁵⁰ Tepe et al., 2004

⁵¹ Sylvestre et al., 2006

⁵² Faid et al., 1995

⁵³ Shaw et al., 2007

⁵⁴ Ben Arfa et al., 2005

⁵⁵ Carlton et al., 1992

⁵⁶ Mourey e Canillac, 2002

⁵⁷ Bishop, 1995

⁵⁸ Ultee et al., 2000

⁵⁹ Pessoa et al., 2002

⁶⁰ Karpouhtsis et al., 1998

antigerminative. Queste caratteristiche sono, senza dubbio, correlate alle funzioni che tali oli hanno nelle piante⁶¹.

Per identificare la composizione dei diversi oli essenziali si sfrutta la gas-cromatografia e spettrometria di massa⁶². Gli oli essenziali possono essere composti da miscele di più di sessanta singoli componenti⁶³. Alcuni componenti possono essere presenti in percentuali maggiori dell'85%, mentre altri possono essere presenti solo in tracce. I componenti fenolici sono principalmente responsabili delle proprietà antibatteriche degli oli essenziali⁶⁴.

2.7 Gli oli aromatizzati

Un "olio di oliva aromatizzato" può essere definito come un olio extravergine di oliva (in genere un olio di oliva extravergine) che è stato elaborato con vegetali, erbe, spezie o frutti al fine di migliorarne il valore nutrizionale, arricchirne le caratteristiche sensoriali e/o aumentarne la *shelf-life*. Sono anche definiti “*gourmet olive oils*” a significare che sono identificati come prodotti con una qualità organolettica superiore⁶⁵.

Secondo gli standard del Consiglio Oleicolo Internazionale (COI), gli “oli aromatizzati” sono considerati condimenti e non possono essere denominati "olio d'oliva o vergine o extravergine di oliva aromatizzato con...". Invece, tali prodotti possono essere chiamati "condimento a base di olio extravergine d'oliva e aromi, spezie o erbe" e l'elenco degli ingredienti può indicare la categoria di olio di oliva utilizzato e gli aromi

⁶¹ Mahmoud e Croteau, 2001

⁶² Dafera et al., 2003

⁶³ Russo et al., 1998

⁶⁴ Cosentino et al., 1999

⁶⁵ Baiano et al., 2010

presenti secondo il Codex generale standard per l'etichettatura dei cibi preconfezionati⁶⁶.

La preparazione di infusi di erbe o fiori in olio è una pratica antica nata nel Bacino del Mediterraneo quando vegetali ed erbe essiccati erano immersi nell'olio d'oliva al fine di prevenire, empiricamente, reazioni di degradazione. Gli oli aromatizzati si arricchiscono degli aromi dei vegetali ed erbe aggiunti e sono stati utilizzati come condimenti in vari tipi di preparazioni culinarie (pasta, insalata, salse) o semplicemente come bagno per il pane.

Ogni Paese Mediterraneo è caratterizzato dai propri oli aromatizzati tradizionali votati ad usi specifici. Ad esempio, in Italia, infusi di erbe in olio di oliva sono particolarmente utilizzati su pane, in Portogallo, l'olio d'oliva è infuso con minuscoli peperoncini rossi, grani di pepe nero, aglio e, a volte, brandy, in Spagna sono impiegati principalmente peperoncino rosso ed erbe aromatiche.

Gli oli aromatizzati rappresentano anche una pratica antica eseguita durante la tradizionale estrazione dell'olio d'oliva al fine di pulire la pressa e per rendere meno sgradevoli gli oli ottenuti da olive stramature o conservate in maniera sbagliata⁶⁷.

La considerazione di olio alimentare pregiato, che l'olio extravergine d'oliva ha sempre avuto presso i consumatori del bacino del Mediterraneo, oggi si sta diffondendo praticamente in tutto il mondo tra i consumatori non tradizionali che pongono particolare attenzione alla possibilità di prevenire le malattie attraverso un dieta sana: questi potenziali consumatori, pur non essendo tradizionalmente aperti a tutti gli utilizzi dell'olio extravergine di oliva, sono disposti ad acquistare

⁶⁶ CODEX STAN 1-1985, Rev. 1-1991, modificato nel 2001

⁶⁷ Baiano et al., 2010

preparazioni già pronte di olio extravergine di oliva arricchito con ingredienti appartenenti sempre alla Dieta Mediterranea, i cosiddetti “*gourmet oils*”⁶⁸.

Per tutti questi motivi, gli oli aromatizzati sono diventati alcuni tra i condimenti più popolari usati sia da chefs gourmet che gente comune. La loro versatilità, facilità d'uso, e una vasta gamma di gusti li hanno resi ingredienti base tra consumatori tradizionali e non tradizionali in molti Paesi del mondo. Le applicazioni per le quali questo tipo di prodotto è largamente diffuso sono il condimento di insalata, verdure arrosto e pasta, salse e marinate, preparazioni a base di carne ed anche per le patate fritte. Altre applicazioni includono frutta secca e snack, che possono essere irrorate con l'olio prima della cottura, così come impasti, salse e impanature⁶⁹.

Da una parte tali prodotti potrebbero incrementare l'utilizzo di olio extravergine di oliva nei consumatori non tradizionali, favorendo anche il loro approccio al nuovo prodotto, dall'altra conferire un valore aggiunto all'olio extravergine di oliva. Erbe e spezie mediterranee sono i principali ingredienti che vengono usati per la produzione dei “*gourmet oils*”.

Le erbe e spezie vengono usualmente addizionate in cottura o a crudo alle pietanze della Dieta Mediterranea per arricchirne il gusto e l'aroma dei vari cibi⁷⁰; ad esse è inoltre riconosciuto anche il merito di esaltare il valore nutrizionale del cibo ed aumentarne la conservabilità e quindi la *shelf-life* (ad esempio nei prodotti sott'olio).

I “*gourmet oil*” preparati con l'aggiunta di varie erbe potrebbero quindi non solo soddisfare i requisiti organolettici dei consumatori, ma anche presentare ulteriori caratteristiche qualitative apprezzate dal

⁶⁸ Antoun & Tsimidou, 1997

⁶⁹ Baiano et al., 2010

⁷⁰ Antoun & Tsimidou, 1997

mercato dei prodotti agroalimentari, come la migliore conservabilità rispetto a quella dell'olio tradizionale o l'arricchimento di molecole nutraceutiche con elevata biodisponibilità.

Attualmente, sul mercato, sono disponibili numerosi tipi di olio aromatizzato con un assortimento molto ampio.

Piante aromatiche e frutti sono stati utilizzati nel corso dei secoli in molti campi (alimentare, farmaceutico, cosmetico e in profumeria) per il loro contenuto di oli essenziali e altri composti di cui sono riconosciute le proprietà antimicrobiche e antiossidanti.

Le sostanze ad attività biologica e con proprietà sensoriali presenti nei prodotti vegetali usati sono principalmente terpenoidi, biofenoli, carotenoidi, alcoli alifatici, aldeidi, chetoni etc.⁷¹

Gli aspetti sensoriali degli oli aromatizzati sono fortemente influenzati dalla diversa composizione di tali composti in erbe, spezie e frutti più comunemente utilizzati nel condimento olio.

Diversi studi riportano che l'aggiunta di erbe e spezie migliorano le caratteristiche sensoriali dell'olio originario aumentandone l'accettabilità in relazione al proprio profilo aromatico e dalla quantità aggiunta⁷².

Per la sua particolare composizione l'olio extravergine di oliva è fortemente dotato di sostanze dagli effetti salutari: acido oleico, altri acidi grassi insaturi e antiossidanti naturali tra clorofilla, carotenoidi, α -tocoferolo e composti fenolici come pinosresinolo, oleuropeina derivati (hydrotyrosol, 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA) e ligstroside derivati (tirosolo, p-HPEA-EDA, p-HPEA-EA). Interessanti proprietà antiossidanti sono di solito assegnati a composti estratti da piante

⁷¹ Baiano et al., 2010; USDA, 2007

⁷² Antoun & Tsimidou, 1997; Gambacorta et al., 2007

aromatiche. Di conseguenza, l'aggiunta di parti di questi all'olio di oliva, esalta le sue proprietà nutrizionali e effetti benefici soprattutto in termini di prevenzione dell'ossidazione⁷³.

Origano e rosmarino sono tradizionalmente conosciuti per le loro proprietà mediche, terapeutiche e antiinfiammatorie, e risultano efficaci nel ritardare l'alterazione dei cibi causata dai microrganismi. Anche l'aglio grazie alla presenza di molecole biologicamente attive, con proprietà antibatteriche e antibiotiche, lo rendono attivo contro funghi, virus e batteri⁷⁴.

È stato inoltre dimostrata l'efficacia dell'uso del peperoncino (*Capsicum annuum L.*), aggiunto come antiossidante nei cibi, nella riduzione dell'incidenza delle trombosi e nella diminuzione dei livelli di glucosio nel plasma⁷⁵.

Molti studi sono stati condotti allo scopo di verificare la stabilità ossidativa di oli di oliva arricchiti con origano, rosmarino ed aglio per verificarne l'effetto sulla *shelf-life* dell'olio extravergine di oliva stesso: da tali studi è emerso un effetto stabilizzante di tali spezie sulla conservazione del prodotto⁷⁶.

Anche dalle prove di conservazione riguardanti l'aggiunta di polvere di peperoncino all'olio di semi di lino, è stato dimostrato l'effetto ritardante sull'ossidazione dei gliceridi, attribuito al contenuto in composti fenolici antiossidanti del peperoncino⁷⁷.

Sono disponibili diversi metodi di aromatizzazione dell'olio e la scelta è molto importante in quanto il metodo di estrazione influenza sia

⁷³ Baiano et al., 2010

⁷⁴ Antoun & Tsimidou, 1997

⁷⁵ Ahindra, 2000

⁷⁶ Antoun & Tsimidou, 1997

⁷⁷ Ahindra, 2000

l'accettabilità che la stabilità all'ossidazione dell'olio aromatizzato⁷⁸. L'infusione è il metodo tradizionale di aromatizzazione dell'olio. Il materiale vegetale è in genere macinato e miscelato con l'olio, la miscela viene lasciata a temperatura ambiente per un tempo definito e con agitazione periodica. La miscela viene poi filtrata per rimuovere le parti solide ed è pronto all'uso.

Quando eseguita a temperatura ambiente, l'infusione può richiedere molto tempo (ore, ma anche giorni e mesi). Al fine di accelerare il processo, i possibili cambiamenti di questo metodo di aromatizzazione comprendono l'infusione in condizioni di vuoto o in atmosfera di azoto e il riscaldamento a temperatura moderata o l'estrazione assistita in forno a microonde.

Per evitare la presenza di problemi di torbidità e di dosaggio, l'alternativa all'infusione classica è la preparazione di estratti concentrati, che sono poi diluiti all'occorrenza con olio puro in modo da ottenere l'olio aromatizzato vero e proprio secondo le caratteristiche desiderate⁷⁹.

Un metodo sicuro per ottenere un olio aromatizzato con un determinato *flavour* è rappresentato dall'aggiunta delle spezie erbe o vegetali (in genere frutti come gli agrumi) direttamente alle olive al momento del processo di estrazione dell'olio.

In questo modo i sapori dagli agenti aromatizzanti sono molto ben assorbiti dall'olio, il residuo di ingrediente aromatizzante è separato dall'olio insieme ai residui solidi dell'oliva (sansa) e la parte acquosa viene rimossa con l'acqua di vegetazione.

⁷⁸ Baiano et al., 2010

⁷⁹ Baiano et al., 2010

Così, alla fine del processo si ottiene direttamente l'olio aromatizzato; il problema di tale procedimento è il giusto bilanciamento delle due matrici (olive e ingrediente aromatizzante)⁸⁰.

L'uso delle metodiche fin qui descritte hanno come effetto indesiderato la co-estrazione di composti indesiderati come cere e composti amari, modificando, in questo modo, le caratteristiche sensoriali e la stabilità durante la *shelf-life* del prodotto.

Per evitare questi problemi, un possibile approccio è l'uso degli oli essenziali o estratti vegetali come agenti aromatizzanti.

Gli oli essenziali possono essere ottenuti mediante estrazione con solvente, distillazione in corrente di vapore e estrazione con CO₂ supercritica⁸¹.

Gli aromi impiegati nella maggior parte dei casi sono comunque di origine naturale, in alcuni casi si utilizzano aromi ottenuti per via sintetica, altri creati chimicamente a partire da composti naturali.

Dall'analisi del ciclo di vita delle diverse tipologie di oli presenti sul mercato si rileva uno stato di complessiva maturità dei prodotti, soprattutto con riferimento a quelli poco differenziati, come l'olio extravergine di oliva, l'olio di sansa e semi vari.

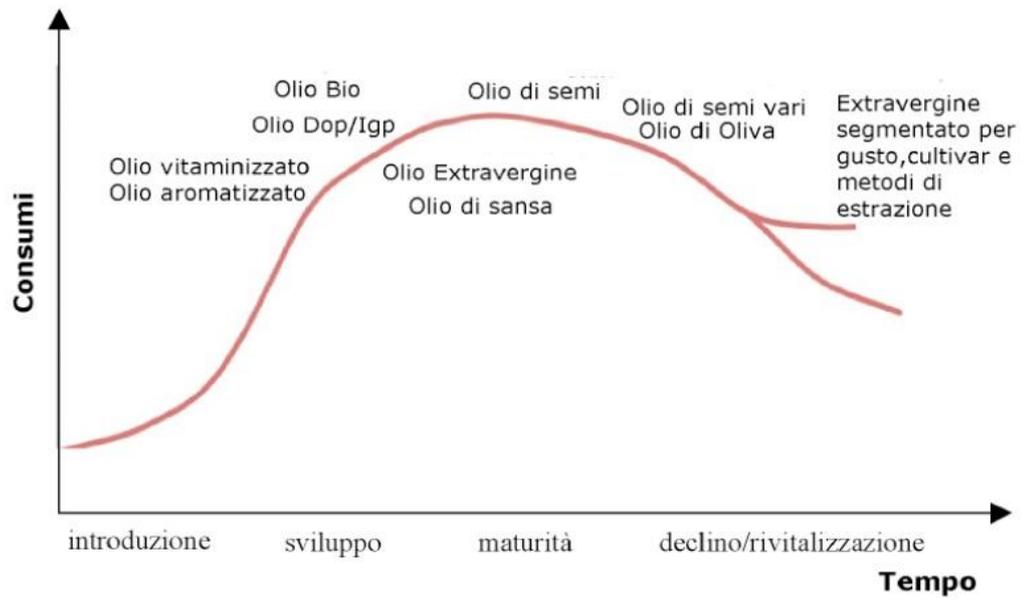
I prodotti che stanno invece vivendo una fase di sviluppo sono soprattutto gli oli vitaminizzati e aromatizzati, seguiti dai biologici e Dop-Igp; tipologie di oli che meglio soddisfano le attese di un consumatore sempre più esigente rispetto alle peculiarità di un prodotto rivelatosi fondamentale nell'alimentazione (Fig. 2)⁸².

⁸⁰ Baiano et al., 2010

⁸¹ Baiano et al., 2010

⁸² Biondi et al., 2008

Figura 2: Vita commerciale degli oli



3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Scopo del lavoro

Il settore agroalimentare riveste un ruolo importante nell'economia nazionale e, soprattutto, in quella siciliana. Tuttavia, tale settore risulta sempre più soggetto "all'invasione" di prodotti esteri di dubbia qualità ma dai prezzi al consumo più bassi e quindi particolarmente allettanti.

Le imprese agro-industriali, pertanto, per mantenere un ruolo concorrenziale, possono e devono puntare sull'aspetto qualitativo. Per centrare questo obiettivo, è importante che le imprese focalizzino l'attenzione sulla produzione di prodotti nuovi o sulla realizzazione di innovazioni di processo dei prodotti già presenti sul mercato, al fine di migliorarne la qualità.

I consumatori più attenti sono attratti da prodotti di elevato pregio, che oltre a soddisfare il palato facciano anche bene alla salute. Particolarmente richiesti risultano essere gli alimenti arricchiti in antiossidanti naturali.

Queste sostanze, definite chimicamente agenti riducenti, giocano un ruolo importantissimo nel buon funzionamento dell'organismo dell'uomo, in quanto riescono a prevenire o quantomeno a rallentare le reazioni di ossidazione durante le quali vengono prodotti radicali liberi che a loro volta innescano processi altamente dannosi per le cellule.

I processi di ossidazione sono infatti un aspetto molto delicato per gli organismi viventi in quanto, pur essendo necessari, possono diventare molto pericolosi se il livello di antiossidanti è molto basso perché si rischia il cosiddetto "stress ossidativo", che può portare a un precoce invecchiamento cutaneo, fino ad arrivare a patologie più serie quali neurodegenerative e diverse forme di tumore.

L'olio extravergine di oliva, oltre ad essere uno dei prodotti rappresentativi della tradizione e della cultura siciliana, rappresenta una preziosissima fonte di antiossidanti naturali.

Nella frazione insaponificabile, sono presenti infatti, i caroteni, tocoferoli e sostanze fenoliche idrofiliche. Questi antiossidanti sono quelli maggiormente correlati con le proprietà salutistiche dell'olio extravergine di oliva⁸³.

Particolare importanza assumono i tocoferoli (vitamina E), costituiti in prevalenza dall' α -tocoferolo che rappresenta circa il 90% dei tocoferoli totali ed è la forma più attiva che svolge un'importante attività antiossidante e vitaminica. Nonostante la presenza di queste sostanze, che fungono da conservanti naturali, l'olio extravergine risulta sensibile ai fenomeni di autossidazione, processo che porta alla formazione di composti (aldeidi, chetoni, ecc.) sgradevoli alla risposta sensoriale e dannosi per la salute dell'uomo, che possono determinare la fine commerciale del prodotto⁸⁴.

Considerato che i componenti antiossidanti dell'olio extravergine di oliva contribuiscono ad elevare significativamente la qualità di questo alimento, è possibile proteggerli dalla degradazione, potenziandone il loro contenuto.

A questo proposito, risulta interessante sottolineare come l'aggiunta all'olio extravergine di oliva di oli essenziali di specie officinali (timo, salvia, origano, rosmarino) oltre ad arricchire il prodotto di componenti aromatiche gradevoli al palato e versatili nelle preparazioni culinarie,

⁸³ Grande Covian, 1988; Trevisan et al., 1990; Kafatos & Comas, 1991; Manzini & Giacco, 1993; Jacotot, 1994; Morales, Luna, & Aparicio, 2000)

⁸⁴ AOCS Official Methods. (1993). Oil Stability Index (OSI)

rappresentino anche una fonte molto ricca in sostanze antiossidanti naturali.

È da evidenziare, a tal proposito, che la denominazione commerciale che assume l'olio extravergine d'oliva modificato nella sua composizione di partenza, è quella di "Condimento aromatico a base di olio di oliva". Diversi sono i metodi finora utilizzati per l'ottenimento di tali condimenti. Uno di questi è il processo di macerazione durante il quale parti o porzioni di pianta con proprietà aromatiche (generalmente foglie, radici, ramoscelli, bulbilli) vengono immerse direttamente nell'olio extravergine⁸⁵; questo processo non è scevro da inconvenienti. Da un lato a causa dell'azione estrattiva estesa anche ad altre sostanze (tannini, ecc) presenti nella frazione legnosa delle parti utilizzate, si può verificare il deterioramento della qualità del prodotto; dall'altro non sono da escludere contaminazioni batteriche e soprattutto di muffe.

Un altro metodo di aromatizzazione è l'aggiunta delle erbe aromatiche nella fase di gramolatura. Nel processo di produzione dell'olio extravergine di oliva, questo "step" è quello in cui avviene il rimescolamento della pasta d'olio, momento in cui si verifica la "rottura" dell'emulsione fra olio e acqua al fine di facilitarne la separazione nei processi successivi. L'aggiunta in questa fase di piante aromatiche, comporterebbe una doppia estrazione: quella dell'olio extravergine d'oliva da un lato e quella degli oli essenziali delle piante impiegate per aromatizzare dall'altro.

Recenti ricerche scientifiche nazionali e internazionali hanno, invece, suggerito l'aggiunta di oli essenziali, derivanti dal settore agrumario (limone e arancia) ed oli essenziali da specie officinali

⁸⁵ Grasas y Aceites-2001

aromatiche (timo, rosmarino, salvia)⁸⁶; in questo caso i risultati riportati sono interessanti, in termini di miglioramento della *shelf-life*, aromatizzazione e accettabilità del prodotto finale da parte del consumatore moderno⁸⁷.

Sulla base delle considerazioni sopra descritte, il progetto di ricerca della presente tesi di dottorato, ha come obiettivo, lo studio di una linea di condimenti a base di oli di oliva aromatizzati con oli essenziali di diverse specie officinali, al fine di ottenere un prodotto innovativo e con elevati standard di qualità.

3.2 Fasi della ricerca

Il lavoro di ricerca, di seguito illustrato, si è articolato in varie fasi che hanno previsto la:

- Selezione di biotipi delle specie aromatiche prese in esame;
- Produzione degli oli essenziali;
- Caratterizzazione quali-quantitativa degli oli essenziali;
- Selezione oli extravergini d'oliva;
- Messa a punto di miscele di oli extravergini d'oliva e oli essenziali;
- Panel test;
- Preparazione dei campioni di olio extravergine d'oliva e oli essenziali;
- Determinazione dei profili aromatici;
- Valutazione della resistenza degli oli extravergini e delle miscele allo stress termico e fotochimico.

⁸⁶ M. Mold-ao-Martins et al.

⁸⁷ Gambacorta et al. 2007

3.3. Individuazione dei biotipi di origano, timo, salvia e rosmarino

Questa fase ha previsto l'individuazione di biotipi, presenti all'interno del campo collezione di piante officinali, presso il Podere Didattico Sperimentale Orleans del Dipartimento SAF dell'Università degli Studi di Palermo.

Le specie considerate sono state:

- *Origanum vulgare L.* (15 Biotipi)
- *Thymbra capitata (L.) Cav.* (10 Biotipi)
- *Rosmarinus officinalis L.* (10 Biotipi)
- *Salvia officinalis L.* (5 Biotipi)

Al momento della fioritura, per ogni specie e per ciascun biotipo individuato sono stati rilevati i principali parametri biometrici e produttivi. Successivamente, si è proceduto alla raccolta del materiale vegetale da utilizzare per l'estrazione degli oli essenziali. I parametri biometrici e produttivi esaminati sono stati:

Timo

- Altezza pianta (cm);
- Diametro longitudinale (mm);
- Diametro trasversale (mm);
- Peso fresco (g);
- Peso secco (g);
- Altezza strato fiorito (cm);
- Umidità (%)

Salvia

- Altezza pianta (cm);
- Numero rami;
- Numero di fiori pianta;

- Larghezza 30 foglie (mm);
- Lunghezza 30 foglie (mm);
- Altezza strato fiorito (cm);
- Peso fresco (g);
- Peso secco (g);
- Umidità (%)

Origano

- Altezza cespo (cm);
- Altezza dello strato fiorito (cm);
- Peso secco cespo (g);
- Umidità (%);
- Fiori (%);
- Foglie (%);
- Steli (%);
- Ramificazioni ramo (num.);
- Steli cespo (num.)

Rosmarino

- Numero dei rami;
- Peso fresco (g);
- Peso secco (g);
- Diametro dei rami (mm);
- Numero degli internodi;
- Lunghezza degli internodi (apicale, mediale e basale) (mm);
- Numero delle foglie per ramo;
- Larghezza di 30 foglie (mm);
- Lunghezza di 30 foglie (mm);
- Lunghezza dello stelo (cm);

- Peso delle foglie (g);
- Peso degli steli (g);
- Umidità (%).

La produzione di biomassa fresca è stata determinata subito dopo la raccolta, mentre la produzione secca e tutti gli altri parametri sono stati determinati successivamente all'essiccazione all'aria del materiale vegetale.

3.3.1 Estrazione degli oli essenziali: materiali e metodi

L'estrazione degli oli essenziali è stata effettuata utilizzando un distillatore in corrente di vapore della ditta Albrigi, costituito da quattro elementi indipendenti, presso il Podere Didattico Sperimentale "Orleans" del Dipartimento SAF dell'Università degli Studi di Palermo. Gli oli essenziali sono stati ottenuti utilizzando biomassa secca delle diverse specie aromatiche e per i quali è stata determinata la resa espressa in % (v/p).

Figura 3: Distillatore in corrente di vapore (Albrigi) impiegato per l'estrazione degli oli essenziali.



La distillazione in corrente di vapore⁸⁸ è il metodo di estrazione più diffuso, le parti della pianta sono messe su una griglia su cui è fatto passare vapore a circa 110° C. La pianta rilascia l'essenza nel vapore che è convogliato verso una serie di stadi di raffreddamento successivi che provocano la liquefazione del vapore stesso. L'olio essenziale presente normalmente galleggia sulla superficie del distillato acquoso che è più leggero e quindi può essere separato facilmente. Questa tecnica estrattiva si basa sulla proprietà fisica degli oli essenziali di essere volatili, ossia facilmente vaporizzabili e trascinabili dal vapore acqueo.

Il tempo che intercorre tra la raccolta della pianta e la sua distillazione deve essere il più breve possibile, per evitare l'alterazione e la dispersione dell'olio essenziale nel tempo di conservazione.

La pianta prima di essere posta all'interno del distillatore, deve essere precedentemente ripulita da materiale estraneo alla distillazione.

Il passaggio del vapore, generato dall'ebollizione dell'acqua, attraverso il materiale vegetale, rende le pareti cellulari più permeabili, fino a determinare la rottura e la fuoriuscita dell'essenza, la quale, essendo volatile, viene vaporizzata.

Il miscuglio di vapor acqueo/essenza viene condensato in una serpentina raffreddata da un ricircolo d'acqua e riportato allo stato liquido, separandosi in olio essenziale e acqua distillata.

L'olio essenziale si deposita in superficie poiché possiede densità inferiore rispetto a quella dell'acqua.

Gli oli essenziali così ottenuti sono stati conservati in appositi contenitori al buio e a temperatura controllata, in attesa di essere processati per l'individuazione del profilo qualitativo.

⁸⁸ Mold~ao-Martins, Palavra Beir~ao-da-Costa, & Bernardo-Gil, 2000

3.3.2 Risultati e discussioni

Di seguito si riportano i risultati relativi alle osservazioni biometriche e produttive delle specie oggetto di studio (tabelle 2- 5).

Tabella 2: Principali risultati delle determinazioni biometriche e produttive dei 10 biotipi di *Thymbra capitata* (L.) Cav.

Biotipi	Altezza pianta (cm)	Diametro longitudinale (mm)	Diametro trasversale (mm)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Altezza strato fiorito (cm)
T1	28,1	71,4	60,8	431,7	337,9	12,2
T2	24,4	84,1	71,9	759,1	624,6	12,7
T3	32,0	74,0	69,4	509,9	416,5	16,9
T4	35,5	80,3	74,3	563,4	494,1	16,7
T5	34,0	85,4	63,8	723,7	656	16,7
T6	35,1	85,1	79,4	689,4	626,2	16,8
T7	19,5	53,3	39,0	103,2	75	11,1
T8	30,0	78,4	69,1	440,1	381,3	10,1
T9	29,5	95,4	80,8	619,3	522,9	11,6
T10	43,1	86,8	87,9	735,7	607,1	14,6
max	43,1	95,4	87,9	759,1	656	16,9
min	19,5	53,3	39,0	103,2	75,0	10,1
media	31,1	79,4	69,6	557,6	474,2	13,9

Tabella 3: Principali parametri biometrici e produttivi rilevati per le 5 accessioni di *Salvia officinalis* L.

Accessione	Altezza pianta (cm)	Numero rami (n.)	Numero di fiori pianta (n.)	Larghezza 30 foglie (mm)	Lunghezza 30 foglie (mm)	Altezza strato fiorito (cm)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)
S1	39,7	36,7	32,1	1,8	3,1	11,8	450,9	134,7
S2	45,9	46,4	38,3	2,5	6,7	18,5	805,8	329,0
S3	38,5	36,1	31,9	2,8	5,9	14,3	620,4	105,8
S4	42,5	39,8	33,2	2,1	4,9	13,4	718,7	284,5
S5	47,2	47,3	39,2	1,4	2,5	17,9	920,9	360,6
max	47,2	47,3	39,2	2,8	6,7	18,5	920,9	360,6
min	38,5	36,1	31,9	1,4	2,5	11,8	450,9	105,8
media	42,76	41,26	34,94	2,12	4,62	15,18	703,34	242,92

Tabella 4: Principali risultati delle determinazioni biometriche e produttive dei 15 biotipi di *Origanum vulgare L.*

Biotipi	Altezza cespo (cm)	Altezza dello strato fiorito (cm)	Peso secco cespo (g)	Umidità (%)	Fiori (%)	Foglie (%)	Steli (%)	Ramificazioni ramo (n.)	Steli cespo (n.)
O1	63.8	17.9	770.6	48.07	23.1	15.8	61.1	368.3	253.3
O2	47.3	14.2	399.9	35.81	28.9	20.1	51.0	302.3	301.3
O3	52.7	14.5	221.7	38.68	27.1	23.1	49.8	286.3	123.7
O4	70.0	16.1	504.1	51.44	23.4	19.1	57.5	351.3	251.3
O5	66.3	18.4	697.9	44.53	23.5	15.7	60.8	362.3	346.7
O6	47.8	14.8	503.8	39.46	28.4	48.1	23.5	275.0	480.5
O7	51.0	16.0	468.8	36.43	33.6	21.8	44.6	322.3	370.0
O8	52.5	13.8	442.8	37.11	24.4	51.2	24.4	227.0	405.3
O9	39.9	12.4	379.4	32.95	20.4	41.0	38.6	245.5	357.8
O10	60.2	14.0	413.2	42.33	28.2	52.7	19.1	257.0	217.3
O11	52.6	12.5	905.9	41.09	22.5	55.5	22.0	212.3	598.3
O12	64.0	16.1	684.0	39.93	19.1	22.7	58.3	292.0	728.3
O13	49.3	16.1	521.5	35.18	30.3	20.9	48.9	321.3	303.7
O14	54.5	14.1	390.7	47.57	30.0	17.7	52.3	237.3	239.3
O15	56.5	14.9	506.6	38.84	24.8	23.7	51.5	315.0	388.7
max	70.0	18.4	905.9	51.44	33.6	55.5	61.1	368.3	728.3
min	39.9	12.4	221.7	32.95	19.1	15.7	19.1	212.3	123.7
media	55.2	15.1	520.7	40.63	25.8	29.9	44.2	291.7	357.7

Tabella 5: Principali risultati delle determinazioni biometriche e produttive dei 10 biotipi di *Rosmarinus officinalis L.*

Biotipi	Num. Rami (n.)	Peso fresco (g)	Peso secco (g)	Diam. stelo (mm)	Num. inter Nodi (n.)	Lung. Inter. Apical e (mm)	Lung. Inter. Medial (mm)	Lung. Inter. Basale (mm)	Num. foglie ramo (.)	Largh. 30 foglie (mm)	Lungh. 30 foglie (mm)	Lungh. stelo (cm)	Peso foglie (g)	Peso steli (g)
R1	22.3	117.8	42.2	1.9	11.6	5.7	14.7	14.0	251.0	2.6	22.4	14.9	30.9	11.3
R2	78.5	273.1	79.2	2.5	9.4	7.9	18.0	16.8	146.2	3.3	29.6	15.3	46.4	32.8
R3	114.0	812.0	275.3	2.1	13.5	6.1	11.1	10.8	323.7	2.5	23.0	14.8	184.3	91.0
R4	123.3	996.8	341.6	2.0	14.2	7.2	10.7	10.1	163.2	2.1	22.0	15.5	222.3	119.3
R5	114.3	1415.1	536.9	2.0	14.4	6.1	10.6	10.5	183.7	2.4	22.7	16.2	341.5	195.4
R6	27.8	147.0	47.8	2.0	14.4	5.6	14.9	14.0	448.2	2.2	18.1	18.4	33.1	14.7
R7	15.3	66.0	18.7	1.8	16.3	6.8	20.5	19.1	257.7	2.5	21.6	17.2	13.1	5.6
R8	22.3	604.3	206.8	2.7	17.9	6.6	13.1	13.4	300.4	2.4	24.3	22.4	106.0	100.8
R9	38.3	63.6	26.3	1.7	6.7	4.6	8.6	10.0	59.2	2.2	17.1	6.8	14.8	11.5
R10	65.5	265.8	117.2	1.6	13.4	2.2	8.9	9.3	152.8	2.2	22.2	13.2	66.1	51.1
max	123.3	1415.1	536.9	2.72	17.9	7.9	20.5	19.1	448.2	3.3	29.6	22.4	341.5	195.4
min	15.3	63.6	18.7	1.61	6.7	2.2	8.6	9.3	59.2	2.1	17.1	6.8	13.1	5.6
media	62.1	476.2	169.2	2.03	13.2	5.9	13.1	12.8	228.6	2.4	22.3	15.5	105.9	63.3

Nelle figure 4-7 sono riportati i dati di resa di olio essenziale ottenuto per il timo, l'origano, il rosmarino e la salvia, nonché i valori medi di produzione di biomassa secca dei relativi biotipi⁸⁹.

⁸⁹ F. Firenzuoli et al., 2002

Particolarmente interessanti, risultano essere il timo denominato T₅, l'origano denominato O₆, il campione di rosmarino denominato R₅ ed il campione di salvia denominato S₂.

Figura 4: Resa dell'olio essenziale di Timo

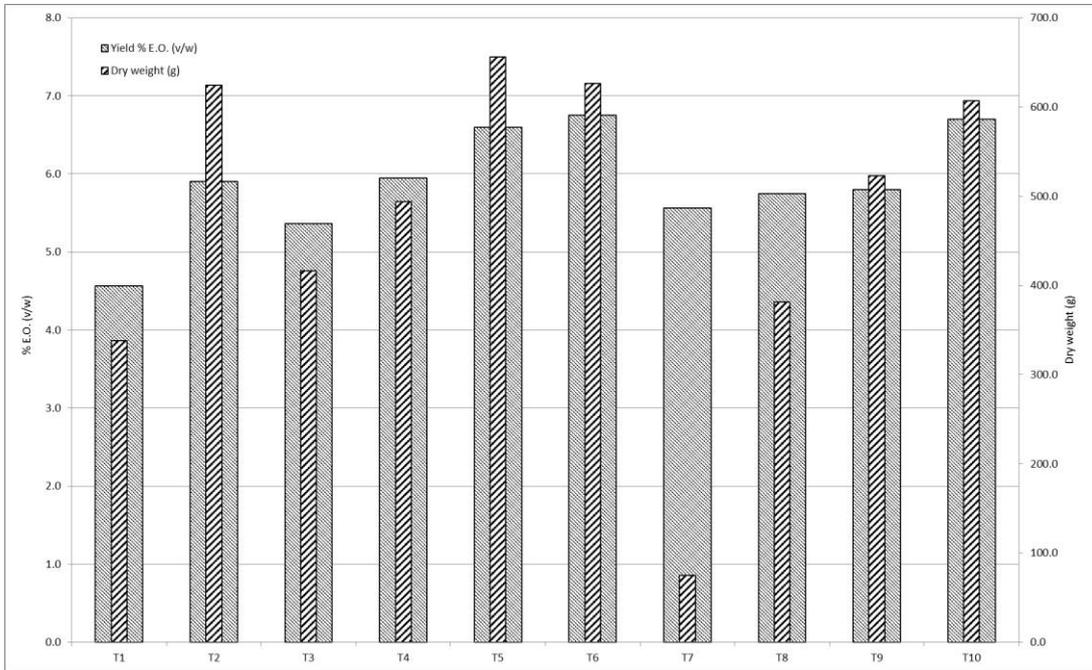


Figura 5: Resa dell'olio essenziale di Origano

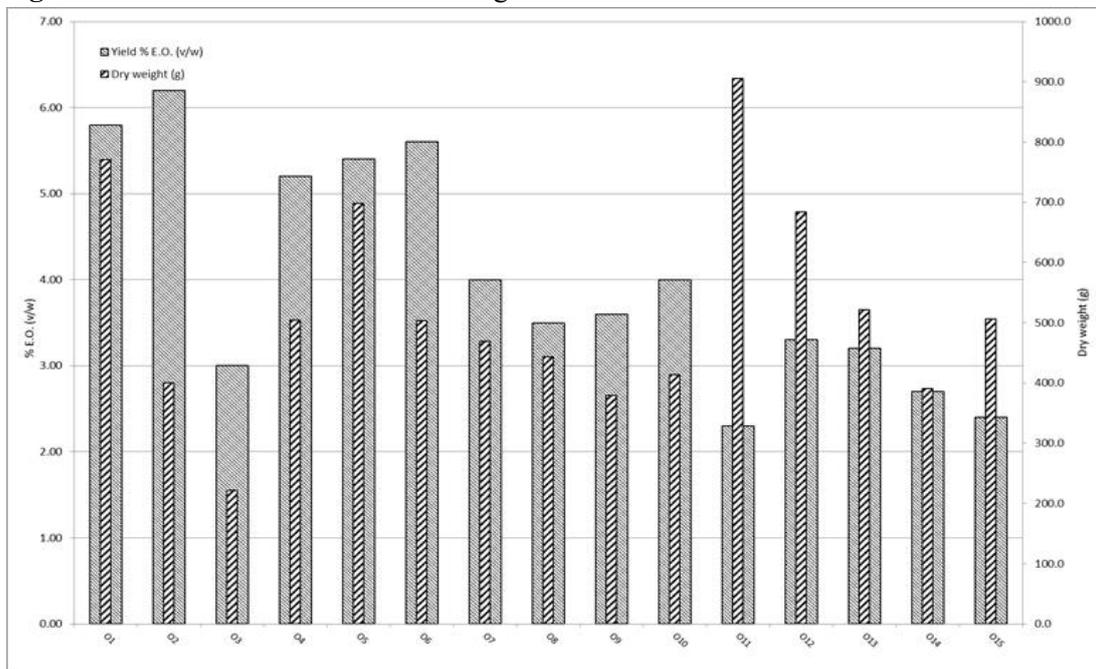


Figura 6: Resa dell'olio essenziale di Rosmarino

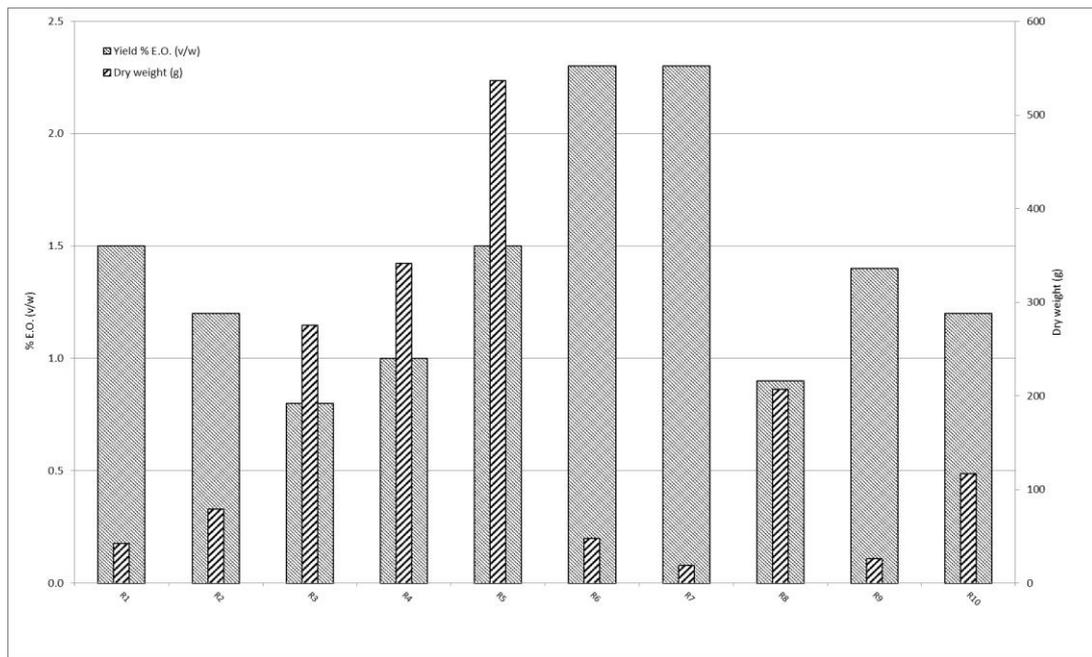
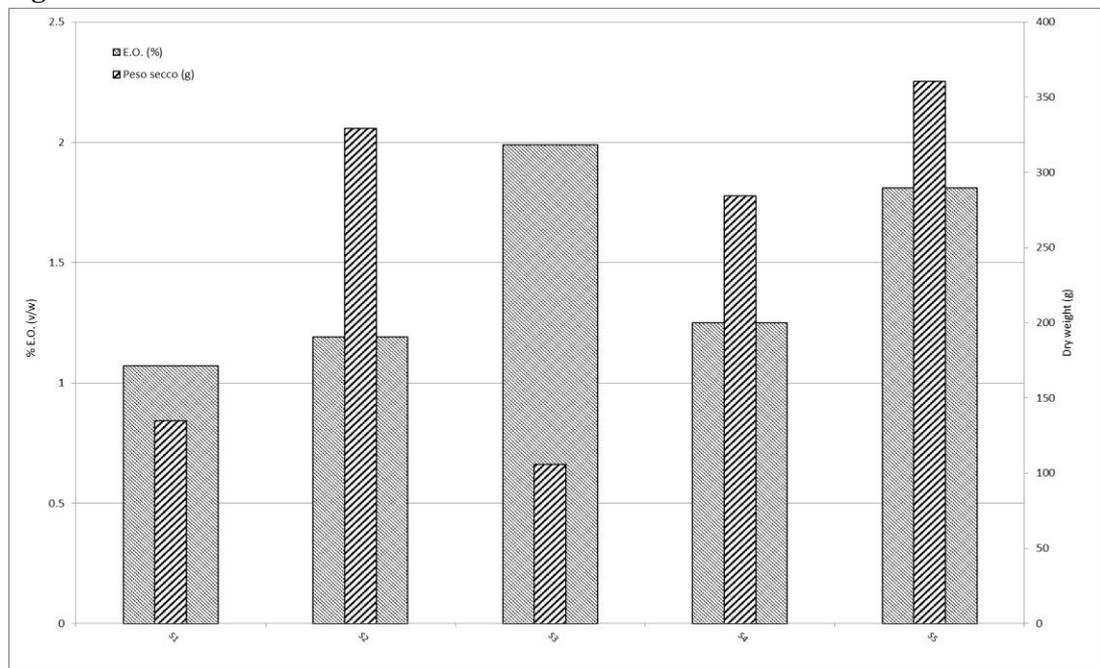


Figura 7: Resa dell'olio essenziale di Salvia



3.4 Caratterizzazione quali-quantitativa degli oli essenziali

Gli oli essenziali ottenuti dal processo di distillazione sono stati sottoposti a metodiche analitiche finalizzate alla determinazione quali-quantitativa dei componenti degli oli essenziali.

3.4.1 Materiali e metodi

Si è utilizzata a tale scopo come tecnica analitica, la Gas-Cromatografia⁹⁰ accoppiata ad un rivelatore di massa (Shimatzu 2010) dotato di una colonna da 30m, 0,25mm x 0,25µm slb 5-ms SUPELCO; strumento in dotazione al dipartimento di “Chimica organica” dell’Università degli studi di Palermo.

La gascromatografia, è una tecnica di chimica analitica piuttosto diffusa, che si basa sulla ripartizione dei componenti di una miscela da analizzare tra una fase stazionaria e una fase mobile gassosa, in funzione della diversa affinità di ogni sostanza della miscela con le fasi. Con l’ausilio del rivelatore di massa è possibile identificare prodotti incogniti, per determinazioni quantitative di composti noti e per chiarire le proprietà strutturali e chimiche delle molecole. Grazie ad uno studio preliminare si sono individuati i corretti parametri analitici e strumentali (migliore programma di temperatura e di pressione, flusso, metodo di iniezione del campione) per la discriminazione dei singoli costituenti degli estratti organici, e l’opportuno volume di diluizione delle specie.

A tale scopo, 80µI dei campioni in esame sono stati portati a volume di 20 ml con diclorometano. In seguito sono stati posti in delle opportune *vials* e posizionati nell’autocampionatore del GC-MS per essere iniettati in colonna. Sono stati impostati i parametri di esercizio come segue in Tabella 6:

⁹⁰ Adams, R. P. (1995) ->In C. Stream (Ed.), Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation

Tabella 6: Parametri strumenti		
PARAMETRI GASCROMATOGRAFO		
Temperatura Iniziale	40° C	
Temperatura Iniezione	250° C	
Iniezione	Split	
Pressione	66 KPa	
Flusso	16,5 ml/min	
Flusso colonna	1,23 ml/min	
Velocità Lineare	40 cm/sec	
Purge	3,0 ml/min	
Split	10	
PARAMETRI COLONNA		
<i>RATE</i>	<i>FINAL TEMPERATURA</i>	<i>HOLD TIME</i>
-	40° C	5
2	250° C	15
10	280° C	15
PARAMETRI MASSA		
Modalità	Scan	
Temperatura Sorgente	230° C	
Interfaccia	280° C	
Tempo di taglio del solvente	1 min.	
Potenziale filamento	0,07 Ev	
Masse acquisite	da 35 a 50	

L'identificazione dei singoli componenti dei diversi estratti di piante officinali è stata effettuata in maniera multiparametrica. Nel dettaglio, la corretta appartenenza dei singoli componenti è stata effettuata

sia mediante calcolo dei differenti “Indici di Kovats”⁹¹ (valore che identifica i tempi relativi di eluizione dei vari composti in gascromatografia), sia mediante confronto dei singoli spettri con quelli riportati in letteratura.

L’analisi quantitativa dei componenti di olio essenziale, è stata effettuata sulla base della misura dell’area (o dell’altezza) dei picchi del cromatogramma.

Di seguito si riportano le tabelle e i relativi grafici dei profili qualitativi delle quattro specie in esame:

Tabella 7: Principali composti dell’olio essenziale dei 10 biotipi di *Thymbra capitata* (L.) Cav.

Biotipo	α -Pinene	Mircene	α -Terpinene	p-Cymene	γ -Terpinene	Borneol	Carvacrol	β -Caryophyllene
T1	0,6	1,3	1,9	6,2	2,5	0,3	79,1	2,4
T2	0,6	1,8	1,6	6,3	4,4	0,7	75,2	2,8
T3	0,6	1,7	1,2	5,8	3,2	1,1	75,4	4,2
T4	0,5	1,5	1,0	4,5	3,0	0,4	78,3	3,2
T5	0,5	1,4	1,0	5,0	4,0	0,2	78,9	3,6
T6	0,6	1,7	1,4	6,4	3,7	0,9	77,1	1,4
T7	0,6	1,6	1,2	5,4	2,7	0,1	79,6	2,4
T8	0,6	1,7	1,4	6,4	3,7	0,1	77,1	2,1
T9	1,0	1,8	1,6	6,3	4,4	0,1	75,2	2,7
T10	0,6	1,7	1,4	6,4	3,6	0,1	77,1	2,1
max	1,0	1,8	1,9	6,4	4,4	1,1	79,6	4,2
min	0,5	1,3	1,0	4,5	2,5	0,1	75,2	1,4
media	0,6	1,6	1,3	5,9	3,5	0,4	77,3	2,7

⁹¹ Joulain & Konig, 1998; Adams, 1995

Figura 8: Principali composti dell'olio essenziale dei 10 biotipi di *Thymbra capitata* (L.) Cav.

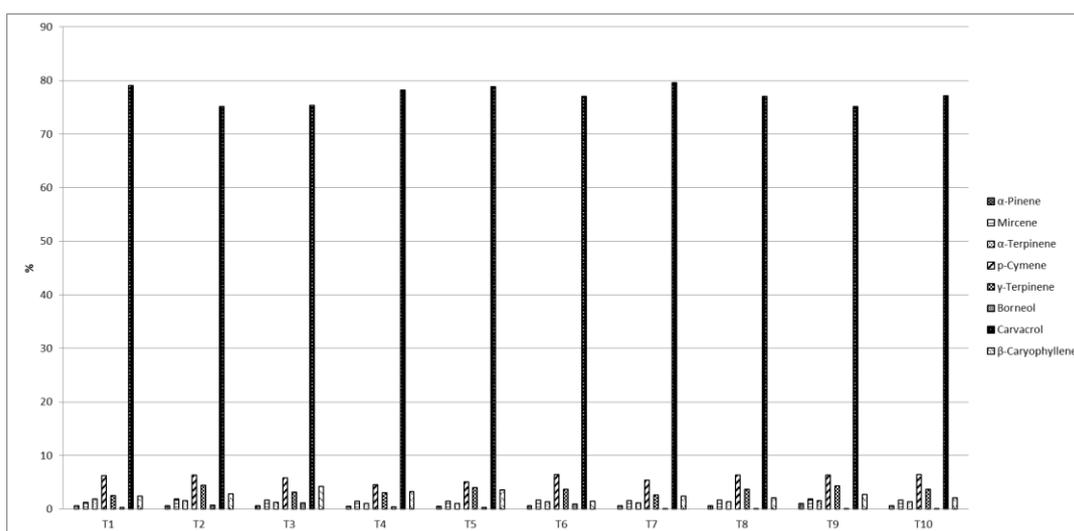


Tabella 8: Principali composti dell'olio essenziale dei 15 biotipi di *Origanum vulgare* L.

Biotipo	Thymol	γ -Terpinene	p-Cymene	α -Thujene	β -Myrcene	Carvacrol	β -Caryophyllene
O1	33,8	18,8	10,8	2,6	4,1	1,1	1,9
O2	25,8	16,6	18,7	2,8	4,6	8,3	4,0
O3	42,7	16,1	11,2	2,0	3,4	1,4	1,7
O4	22,8	24,9	11,5	1,6	2,5	1,2	1,9
O5	30,0	21,1	10,5	2,8	4,3	1,5	2,0
O6	45,3	16,0	8,5	1,7	3,2	1,3	1,7
O7	47,3	11,3	8,8	2,3	3,4	1,2	2,0
O8	34,4	30,5	8,1	1,7	3,0	1,6	2,1
O9	46,4	9,8	11,7	1,7	3,1	1,5	0,8
O10	31,3	21,1	10,9	2,6	4,4	0,6	0,6
O11	44,8	12,0	8,1	1,9	3,0	2,0	2,7
O12	54,4	19,5	5,2	1,5	2,1	0,3	0,8
O13	24,0	14,4	7,0	1,3	2,1	0,3	2,1
O14	46,7	10,1	10,7	1,4	2,6	0,7	2,0
O15	38,0	20,9	11,4	1,9	2,6	2,6	1,8
max	54,4	30,5	18,7	2,8	4,6	8,3	4,0
min	22,8	9,8	5,2	1,3	2,1	0,3	0,6
media	37,8	17,5	10,2	2,0	3,2	1,7	1,9

Figura 9: Principali composti dell'olio essenziale dei 15 biotipi di *Origanum vulgare* L.

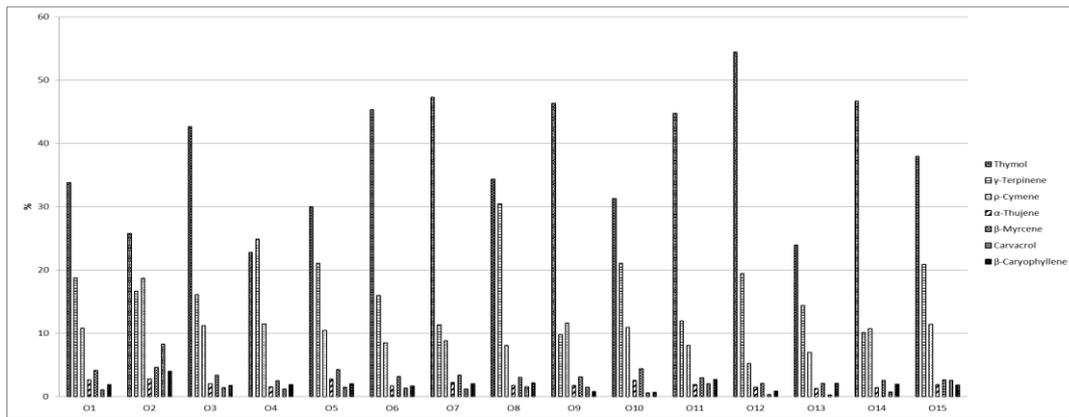


Tabella 9: Principali composti dell'olio essenziale dei 10 biotipi di *Rosmarinus officinalis* L.

Biotipo	α -Pinene	Camp hene	β -Pinene	Limonene	Terpinolene	1,8-Cineole	Linalool	Camp hor	Borneol	α -Terpineolo	Verbenone	Bormyl Acetato
R1	13,6	4,8	1,5	0,0	0,2	58,6	0,1	3,1	4,1	4,2	0,0	0,8
R2	27,1	7,4	0,5	3,5	1,1	22,2	1,3	12,0	6,2	2,8	3,9	0,3
R3	15,7	3,4	0,0	2,5	0,0	14,6	4,6	14,7	11,4	1,5	11,5	0,2
R4	17,9	3,8	0,2	0,9	0,2	7,7	4,2	12,7	10,4	1,7	12,5	2,1
R5	16,7	3,6	0,0	0,0	0,0	14,1	4,6	14,0	11,0	1,9	10,8	0,1
R6	16,4	4,6	4,0	0,2	0,5	39,8	0,2	14,3	9,3	3,6	0,0	0,2
R7	7,2	4,5	0,1	1,0	0,3	30,7	3,2	9,1	23,3	2,7	0,8	1,0
R8	16,7	3,5	0,0	0,0	0,7	13,7	4,3	13,6	10,6	1,8	10,9	1,1
R9	15,3	3,5	0,0	0,6	3,2	9,3	3,6	12,1	11,0	1,6	9,2	3,0
R10	18,9	4,3	0,6	1,3	0,7	14,3	0,6	14,4	11,1	0,6	6,5	1,0
max	27,1	7,4	4,0	3,5	3,2	58,6	4,6	14,7	23,3	4,2	12,5	3,0
min	7,2	3,4	0,0	0,0	0,0	7,7	0,1	3,1	4,1	0,6	0,0	0,1
media	16,5	4,3	0,7	1,0	0,7	22,5	2,7	12,0	10,8	2,2	6,6	1,0

Figura 10: Principali composti dell'olio essenziale dei 10 biotipi di *Rosmarinus officinalis* L.

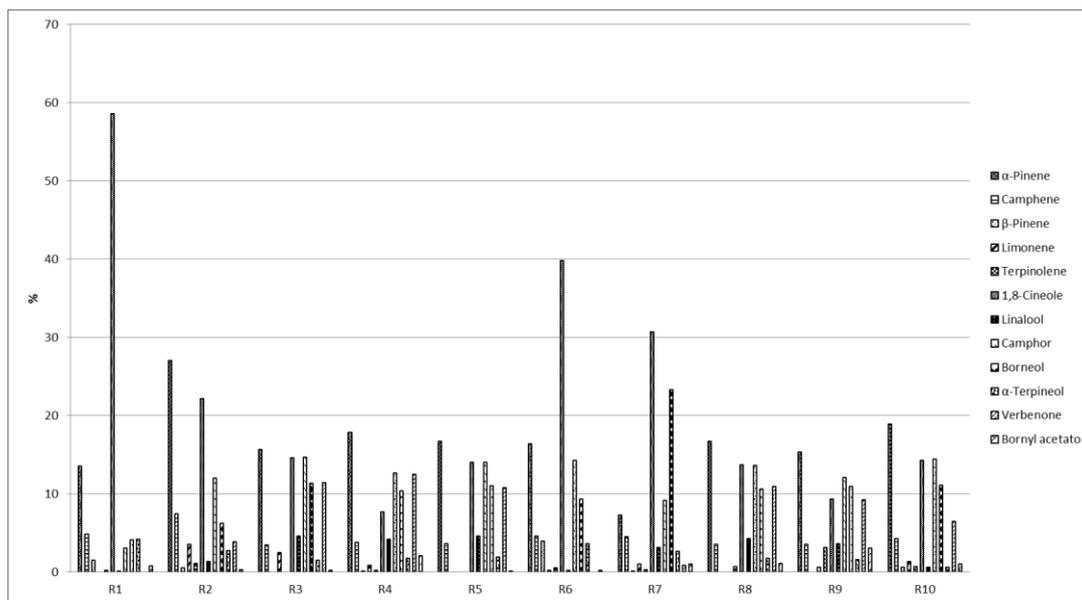
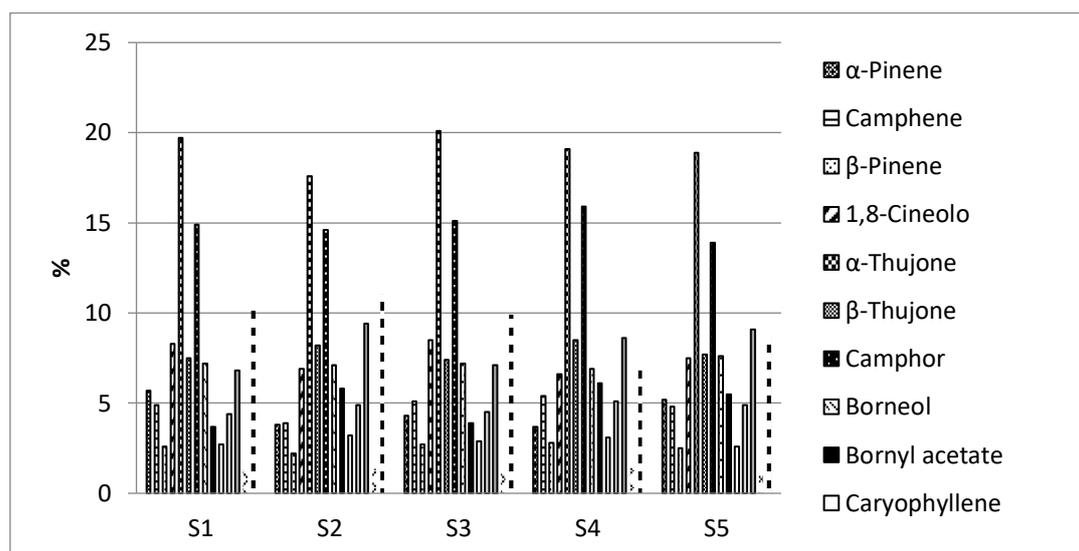


Tabella 10: Principali composti dell'olio essenziale delle 5 accessioni di *Salvia officinalis* L.

	S1	S2	S3	S4	S5	max	min	media
α-Pinene	5.7	3.8	4.3	3.7	5.2	5.7	3.7	4.5
Camphene	4.9	3.9	5.1	5.4	4.8	5.4	3.9	4.8
β-Pinene	2.6	2.2	2.7	2.8	2.5	2.8	2.2	2.6
1,8-Cineolo	8.3	6.9	8.5	6.6	7.5	8.5	6.6	7.6
α-Thujone	19.7	17.6	20.1	19.1	18.9	20.1	17.6	19.1
β-Thujone	7.5	8.2	7.4	8.5	7.7	8.5	7.4	7.9
Camphor	14.9	14.6	15.1	15.9	13.9	15.9	13.9	14.9
Borneol	7.2	7.1	7.2	6.9	7.6	7.6	6.9	7.2
Bornyl acetate	3.7	5.8	3.9	6.1	5.5	6.1	3.7	5.0
Caryophyllene	2.7	3.2	2.9	3.1	2.6	3.2	2.6	2.9
-Elemene	4.4	4.9	4.5	5.1	4.9	5.1	4.4	4.8
-Muurolene	6.8	9.4	7.1	8.6	9.1	9.4	6.8	8.2
Caryophyllene oxide	1.3	1.4	1.3	1.4	1.1	1.4	1.1	1.3
Sclareol	10.3	11.1	9.9	6.8	8.7	11.1	6.8	9.4

Figura 11: Principali composti dell'olio essenziale delle 5 accessioni di *Salvia officinalis* L.



3.4.2 Risultati e discussioni

Dall'analisi dei dati si evince che il composto maggiormente rappresentato nell'olio essenziale dei dieci biotipi di *Thymbra capitata* (L.) Cav. è il carvacrolo (79.6 – 75.2 %).

Relativamente ai dieci biotipi di *Origanum vulgare* L. il principale componente composto in maggior misura rappresentato è il timolo con valori percentuali compresi tra 54.4% e 28.8%. Altri composti ben rappresentati sono stati il γ - terpinene e il ρ – cimene. Trascurabile risulta, nella maggior parte dei biotipi, la quantità di carvacrolo che, secondo quanto riportato in letteratura, costituisce il composto più rappresentato nell'origano greco⁹².

Per i dieci biotipi di *Rosmarinus officinalis* L. l'analisi mostra che il composto maggiormente rappresentato nell'olio essenziale è l'1,8-Cineolo (58.6 – 7.7 %).

⁹² Tuttolomondo et al De Mastro

Infine, i composti più rappresentativi delle cinque accessioni di *Salvia officinalis* L. sono α -thujone (20.1 - 17.6 %) e la canfora (15.9 - 13.9 %).

3.5 Selezione oli extravergini d'oliva

La messa a punto di miscele di oli extravergini di oliva e di oli essenziali ha, come già discusso in precedenza, lo scopo di proteggere l'olio extravergine di oliva dalla sua degradazione, potenziarne il suo patrimonio in costituenti antiossidanti, al fine di fornire un prodotto salutisticamente e organoletticamente di alta qualità.

Considerando che sia l'olio extravergine di oliva (componente base) che gli stessi oli essenziali vanno incontro a fenomeni di degradazione⁹³ in funzione delle diverse condizioni di conservazione, è stato predisposto un protocollo per valutare la stabilità allo stress termico e foto-ossidativo.

A tal proposito, è stata opportunamente acquisita una campionatura di oli extravergine di oliva di diverse cultivar tipiche del territorio siciliano.

Le produzioni di oli extravergini monovarietalì provengono da due raccolte, una con drupe verdi e l'altra con drupe invaiate, queste sono state fornite dal Dipartimento SAF.

In particolare, la scelta delle cultivar utilizzate per la produzione di condimenti a base di olio extravergine d'oliva è ricaduta su tre specie

⁹³ Servili M. et al. 2004

tipiche del territorio siciliano: Nocellara del Belice, Biancolilla e Cerasuola⁹⁴.

La *Nocellara* del Belice rappresenta una cultivar molto pregiata ed è, tra le varietà autoctone siciliane, probabilmente una delle più apprezzate (nel 1998 ha ottenuto la certificazione DOP). Presente sul territorio siciliano da svariati secoli (probabilmente già ai tempi della Magna Grecia), questa cultivar è ottima sia per la produzione di olio extravergine che per il consumo da mensa, grazie anche alla sua pezzatura molto grossa.

Gli alberi di Nocellara non sono molto grandi, ma hanno una certa capacità di adattarsi alle più varie condizioni ambientali. Conosciuta anche come Oliva di Mazara o di Castelvetro, Tonda e Trapanese, è una varietà autoincompatibile e per l'impollinazione si fa generalmente ricorso a varie altre cultivar, in special modo la Giarrappa e la Pidicuddara.

Anche se il periodo di maturazione è piuttosto tardivo, quest'oliva entra in produzione relativamente presto ed ha un livello di produttività molto buono, non soggetto ad alternanza, con una resa dell'olio medio-alta (si supera spesso il 20%). Come lascia intendere il nome, questa cultivar è molto diffusa nel distretto olivicolo della provincia di Trapani, ma la sua adattabilità ha fatto sì che col tempo abbia attecchito anche in molte altre zone dell'isola, come Agrigento, Palermo e sul versante orientale.

L'olio ottenuto dalla spremitura di queste olive ha generalmente una colorazione che può andare dal giallo al verde intenso ed un'acidità molto bassa che si mantiene costantemente al di sotto dello 0,5%.

All'olfatto, l'olio extravergine di oliva in vendita si presenta con un fruttato di oliva di media intensità accompagnato da note di mandorla,

⁹⁴ Alessandro Mersi: www.olivolio.net – info@olivolio.net Consulente Tecnico in Olivicoltura, Tecniche e Sistemi di frangitura e Qualità dell'Olio d'Oliva

pomodoro verde, erba tagliata, carciofo e talvolta di erbe aromatiche. Il gusto è amaro, leggermente piccante e con una punta di dolce.

Conosciuta anche sotto altre denominazioni (Bianca, Bianchetto, Biancolina, Imperialidda, Jancuzza, Marmorina, Napoletana, Pruscarina, Siracusana, per citare solo le più celebri), la cultivar **Biancolilla**⁹⁵ è ritenuta una delle varietà più antiche tra quelle attualmente esistenti negli uliveti italiani. Annoverata tra le cultivar autoctone siciliane (si ritiene infatti che sia originaria della zona di Caltabellotta, nell'agrigentino), l'oliva Biancolilla è molto apprezzata per la propria grande produttività e per la rimarchevole rusticità.

Essa deve il proprio nome al fatto che durante la fase di maturazione le drupe passano dal tipico colore verde del frutto acerbo a una tonalità di rosso tendente al violaceo. Gli olivi Biancolilla sono delle specie autofertili, cioè non necessitano di impollinazione da parte di altre cultivar e per questo motivo viene spesso utilizzata come impollinatrice per la Nocellara del Belice che è invece autosterile.

Tuttavia, è frequente l'uso di cultivar come la Cerasuola e la Nocellara Messinese che vengono associati al Biancolilla come impollinatori e che influenzano in modo notevole i sapori dell'olio da essa ottenuto. Coltivata in prevalenza nelle province della Sicilia Occidentale (Palermo e Agrigento) è possibile comunque constatarne la presenza anche sul versante orientale dell'isola. Si tratta di una cultivar piuttosto resistente anche su territori alto-collinari e con scarsa disponibilità di acqua, fattore che la rende ottima per essere ospitata sui terreni aridi tipici della Sicilia, grazie soprattutto ad una delle sue principali peculiarità, ovvero la capacità di espandere delle radici molto profonde che le

⁹⁵ <http://www.oliodelasicilia.com>

consentono di raggiungere le fonti idriche necessarie al proprio sostentamento.

La vendita di olio extravergine di oliva siciliano di cultivar Biancolilla si è rivelata molto solida. Questa cultivar non viene usata per il consumo da mensa, ma è molto apprezzata per la produzione olearia.

L'olio extravergine di oliva Biancolilla è considerato molto pregiato ed è molto adatto alla vendita. Tramite la spremitura delle olive di questa cultivar si ottiene un olio che contiene molti dei sapori tipici della produzione alimentare sicula.

Di colore verde o giallo paglierino con sfumature vagamente dorate, quest'olio infatti si caratterizza per un fruttato leggero, lievemente piccante e molto aromatico in cui si avvertono le fragranze di mandorla, pomodoro e carciofo abbinata a dei gusti di erba fresca e oliva verde, anche se possono sussistere delle differenze in base al sottotipo e a seconda degli impollinatori adottati.

Il Biancolilla viene utilizzato spesso sia per la realizzazione di extravergine monovarietale sia in miscele, in modo da armonizzare il sapore di altre varietà di olii, visto la delicatezza del suo *flavour*.

La ***Cerasuola*** è sicuramente tra le cultivar più diffuse in tutto il territorio siciliano. Le zone di produzione di questa varietà, infatti, coprono ampi settori del versante occidentale della regione, in particolare nella provincia di Trapani (dove è nota anche come Ogliara o, presso Castelvetro, Palermitana), di Palermo (dove è conosciuta anche col sinonimo di Marfia) e nel comprensorio di Sciacca dove, a causa della sua forte sensibilità agli attacchi di rogna, è chiamata anche Purrittara. Queste olive hanno una vocazione esclusivamente olearia e, grazie all'ottimo rapporto tra polpa e nocciolo, la resa è piuttosto alta in quanto può raggiungere anche quote del 20%.

Tra le numerose qualità di questa cultivar non si può dimenticare l'elevato grado di resistenza alla siccità (carattere che si sposa alla perfezione con il clima della Sicilia, privo di precipitazioni per lunghi tratti dell'anno) e la capacità di prosperare anche in terreni poveri.

Questa pianta è androsterile e per questo motivo è necessario fare ricorso all'impollinazione da parte di altre cultivar: per questo scopo, è prevalente l'uso della Nocellara del Belice, della Biancolilla e della Giarrappa.

Le caratteristiche dell'olio ricavato dalla spremitura delle olive della cultivar Cerasuola variano a seconda della fase di maturazione in cui viene effettuato il raccolto, ma piuttosto influenti possono risultare anche il suolo ed i metodi di coltivazione.

In generale, l'olio extravergine di Cerasuola determina all'olfatto un fruttato di grado medio o intenso, unitamente a delle sensazioni di erba fresca e in certi casi di pomodoro, carciofo e cardo.

Laddove la maturazione delle olive è più avanzata, invece, il fruttato risulta più spiccato e fa capolino una tonalità molto aromatica di pomodoro maturo e di timo. Al gusto prevale l'amaro ed il piccante, ma è presente anche una punta di dolce.

La colorazione è gialla o verde. Quest'olio conserva molto bene le proprie qualità gustative nel corso del tempo ed ha un contenuto nutrizionale molto benefico per l'organismo a causa della presenza di beta-carotene, grassi insaturi e tocoferoli che svolgono un'efficace azione contro il colesterolo nel sangue, oltre che antiossidante e di difesa dalle patologie cardiovascolari, tumorali e contro l'invecchiamento cellulare.

D'altra parte, le olive Cerasuola sono ricche anche di grassi vegetali e pertanto non sono molto adatte a chi osserva un regime alimentare ipocalorico o a chi soffre di ipertensione arteriosa.

Oltre alle varietà suddette prese in considerazione in questo lavoro, si è scelta anche la cultivar spagnola *Arbequina*, considerata alla base del sistema di coltivazione superintensivo.

Questa cultivar presenta un ottimo portamento ed una vigoria abbastanza contenuta ed unisce ad una produttività precoce, abbondante e costante anche un'eccellente capacità di adattamento alle principali avversità, come elevata resistenza al freddo, alla salsedine e ad altre condizioni estreme.

Ed è soprattutto per questa sua grande versatilità, che l'*Arbequina* risulta ad oggi la varietà più impiegata e diffusa negli impianti superintensivi di tutto il mondo, ed è anche quella che in definitiva ha fornito ovunque i migliori risultati.

Vista l'enorme diffusione che sta avendo questa specie, è risultato interessante prenderla in esame anche per altre ragioni che risiedono nelle sue caratteristiche intrinseche riguardanti il livello qualitativo dell'olio che questa varietà è in grado di produrre.

L'olio prodotto da questa cultivar presenta un basso contenuto in Acido Oleico ed in Polifenoli totali e quindi una bassa stabilità nel tempo del prodotto finale.

Anche dal punto di vista strettamente organolettico sensoriale l'olio di *Arbequina* è stato oggetto di giudizi negativi.

Per tali ragioni, l'aggiunta di oli essenziali è risultata maggiormente giustificata, in termini di aumento di sostanze antiossidanti, al fine di prolungarne la *shelf-life*.

A questo si aggiunge anche il fatto, che l'olio della cultivar Arbequina, presenta caratteristiche organolettiche di basso valore, con un livello di fruttato molto basso ed un equilibrio eccessivamente spostato verso le sensazioni dolci e mature, proveniente soprattutto dal loro scarso contenuto in Polifenoli (sostanze chimiche responsabili degli aromi, ma anche della stabilità del prodotto).

Per questo aspetto l'aggiunta di oli essenziali di erbe aromatiche, potrebbe migliorare le sue caratteristiche organolettiche e di *compliance* del consumatore.

L'elenco dei campioni acquisiti e le relative sigle utilizzate per l'identificazione sono riportate in tabella 11.

Tabella 11: Elenco dei campioni di Oli Extravergini di Oliva acquisiti.

Cultivar	Epoca di raccolta	Codice identificativo
Arbequina	Invaio	OOAi
	Verde	OOAv
Nocellare del Bellice	Invaio	OONi
	Verde	OONv
Cerasuola	Invaio	OOCi
	Verde	OOCv
Biacolilla	Invaio	OObi
	Verde	OObv

3.6 Messa a punto di miscele di oli extravergini d'oliva e oli essenziali

In questa fase sono state preparate le miscele di oli aromatizzati costituite dai campioni di oli extravergine d'oliva sopraccitati e da diverse

concentrazioni di olio essenziale delle differenti specie aromatiche oggetto di studio.

In fase preliminare si era ipotizzato di effettuare la miscelazione utilizzando gli OE ottenuti da più biotipi, per ciascuna specie.

I risultati ottenuti relativi alla valutazione chemiotipica di tali oli, non hanno mostrato sensibili variazioni all'interno della stessa specie e

pertanto si è deciso, per le miscele, di utilizzare oli essenziali provenienti da un singolo biotipo per ciascuna specie. Tale criterio è stato scelto in base al miglior rapporto tra resa in olio essenziale e resa in biomassa secca. In particolare si è selezionato il campione di timo denominato T₅, il campione di origano denominato O₆, il campione di rosmarino denominato R₅ ed il campione di salvia denominato S₂, così come evidenziato nelle figure 12-15.

Figura 12: Ecotipo di Timo con miglior rapporto OE/ss

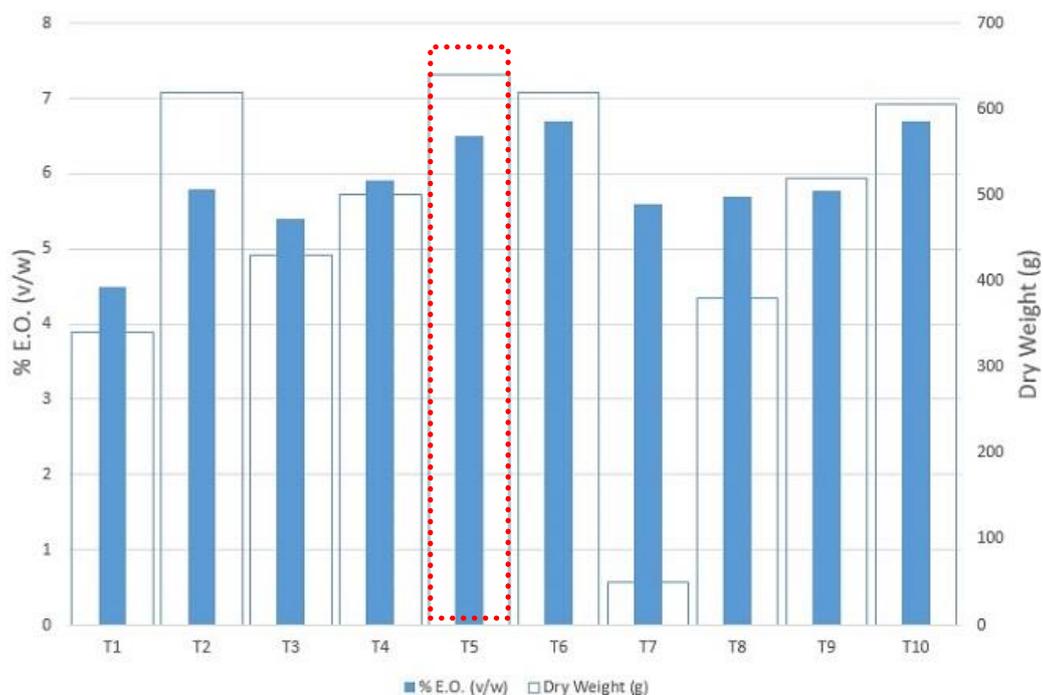


Figura 13: Ecotipo di Origano con miglior rapporto OE/ss

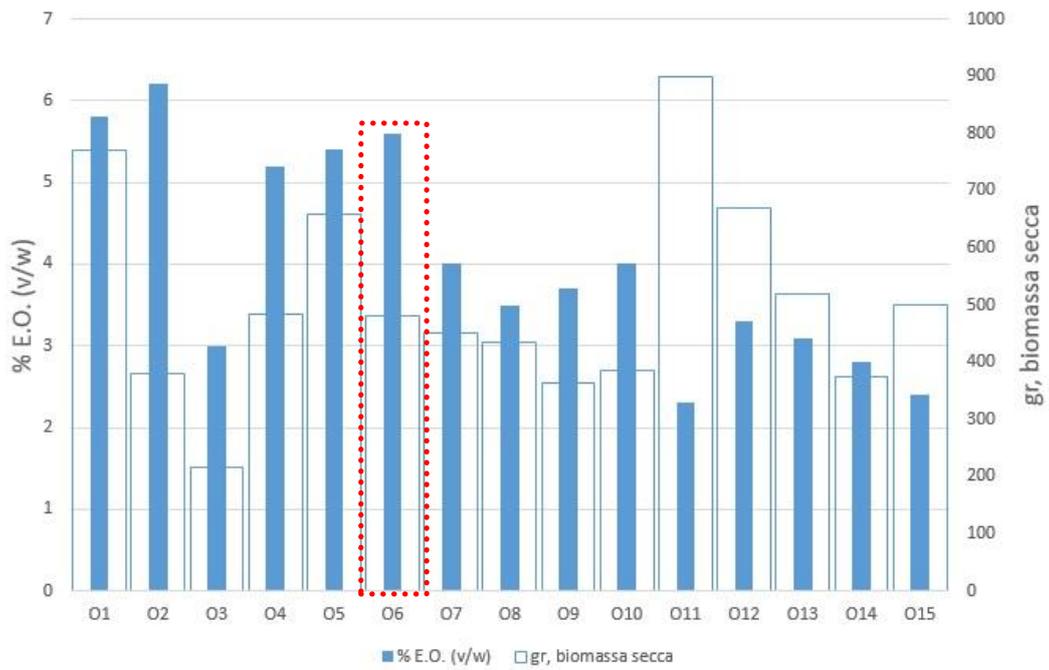


Figura 14: Ecotipo di Rosmarino con miglior rapporto OE/ss

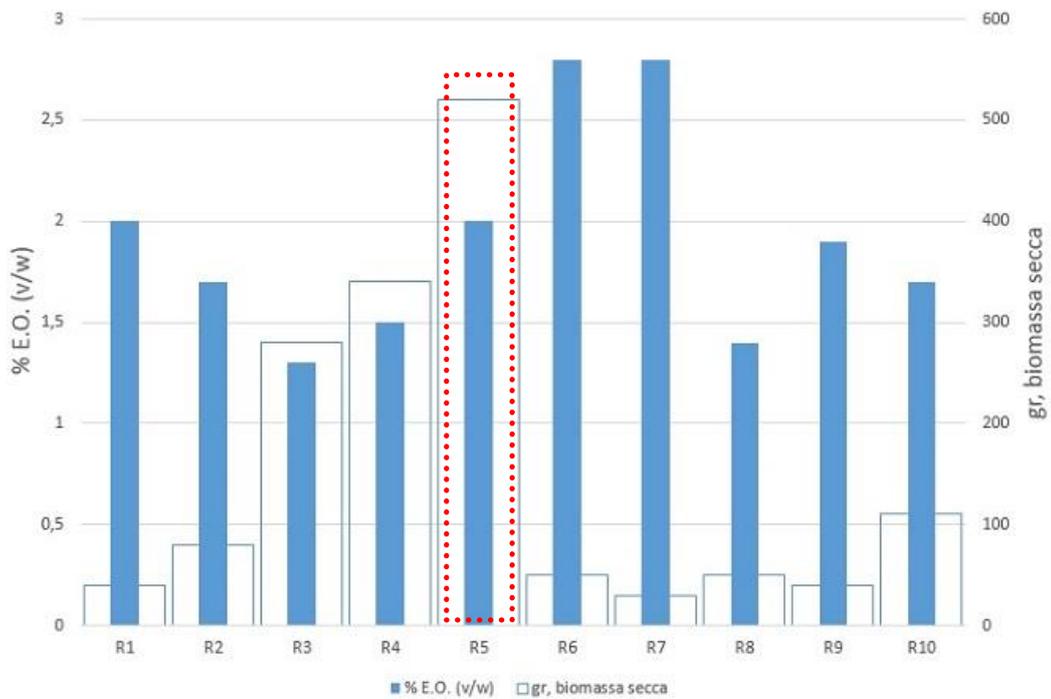
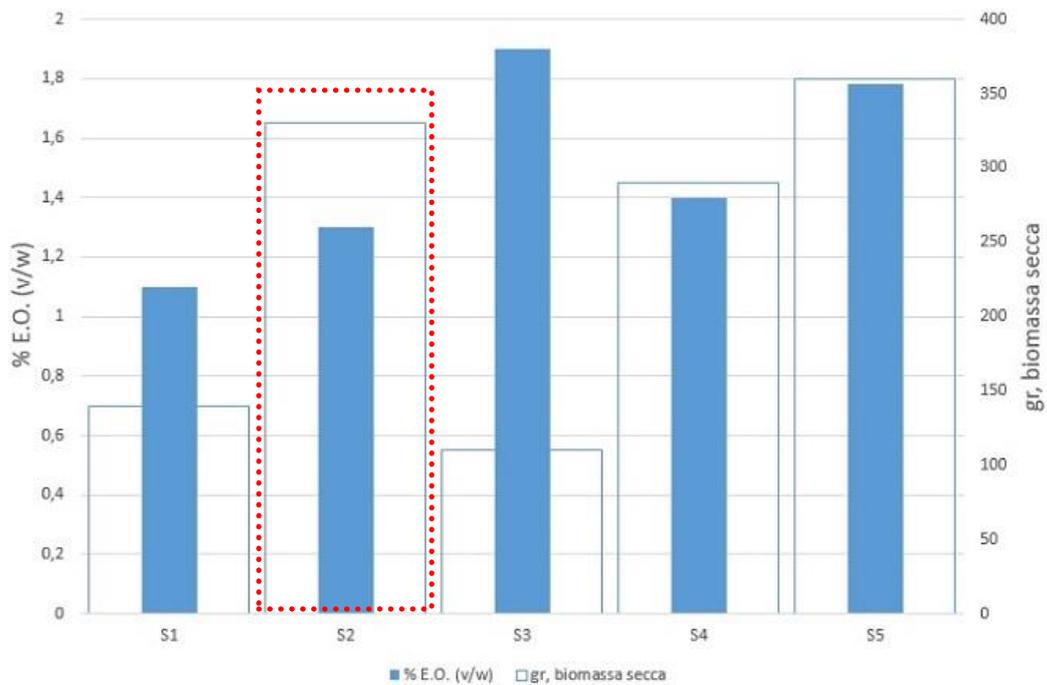


Figura 15: Ecotipo di Salvia con miglior rapporto OE/ss



L'elenco degli oli essenziali utilizzati per le miscele e le relative sigle adoperate per l'identificazione sono riportate in tabella 12.

Tabella 12: Elenco dei campioni di Oli Essenziali utilizzati

<i>Specie</i>	Codice identificativo
Timo	OET
Origano	OEO
Rosmarino	OER
Salvia	OES

3.7 Panel Test

Riguardo alla percentuale di olio essenziale da aggiungere all'olio extravergine di oliva, in via preliminare sono stati condotti, presso l'Università degli studi di Palermo dei test di gradimento⁹⁶.

Il fine ultimo di tali test era quello di stabilire la percentuale di olio essenziale maggiormente apprezzata.

3.7.1 Materiali e metodi

Sono stati 100 i soggetti chiamati a partecipare a questo metodo di indagine che sfrutta gli organi sensoriali umani i quali, secondo studi certificati, si comportano come dei veri e propri strumenti di misura.

Il Panel test si è svolto in modo che gli assaggiatori abbiano potuto esprimere il loro giudizio sulle caratteristiche sensoriali dell'olio, indipendentemente l'uno dall'altro.

Ad ogni assaggiatore sono stati somministrati n. 3 campioni di oli aromatizzati a differente concentrazione di olio essenziale (0,01% - 0,1% e 0,15%) relativo ad ogni specie aromatica.

Alla fine del test di valutazione, ciascun assaggiatore, ha compilato delle schede appositamente predisposte, allo scopo di esprimere un giudizio sulla intensità dell'aroma, vagliando come possibilità le seguenti diciture: *aroma assente; aroma lievemente percepito; aroma moderatamente percepito; aroma intenso; aroma fortemente intenso.*

Altra tabella sottoposta al campione di assaggiatori è stata quella che permetteva di esprimere un giudizio circa l'appetibilità e la

⁹⁶ ISO 8587, 1988

gradevolezza al palato delle miscele di olio aromatizzato alle diverse percentuali. In questo caso i soggetti interessati hanno potuto valutare indicando le seguenti opzioni: *per niente gradevole; poco gradevole; abbastanza gradevole; gradevole; molto gradevole.*

A titolo esemplificativo si riporta lo schema del *panel test*:



In quale di questi campioni di olio si avverte una maggiore intensità di aroma?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = aroma assente; 2= aroma lievemente percepito; 3=aroma moderatamente percepito; 4= aroma intenso; 5= aroma fortemente intenso

Quale di questi campioni di olio risulta più appetibile e gradevole al palato?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = per niente gradevole; 2= poco gradevole; 3=abbastanza gradevole; 4= gradevole; 5= molto gradevole



In quale di questi campioni di olio si avverte una maggiore intensità di aroma?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = aroma assente; 2= aroma lievemente percepito; 3=aroma moderatamente percepito; 4= aroma intenso; 5= aroma fortemente intenso

Quale di questi campioni di olio risulta più appetibile e gradevole al palato in base all'aroma?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = per niente gradevole; 2= poco gradevole; 3=abbastanza gradevole; 4= gradevole; 5= molto gradevole



In quale di questi campioni di olio si avverte una maggiore intensità di aroma?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = aroma assente; 2= aroma lievemente percepito; 3=aroma moderatamente percepito; 4= aroma intenso; 5= aroma fortemente intenso

Quale di questi campioni di olio risulta più appetibile e gradevole al palato?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = per niente gradevole; 2= poco gradevole; 3=abbastanza gradevole; 4= gradevole; 5= molto gradevole



In quale di questi campioni di olio si avverte una maggiore intensità di aroma?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = aroma assente; 2= aroma lievemente percepito; 3=aroma moderatamente percepito; 4= aroma intenso; 5= aroma fortemente intenso

Quale di questi campioni di olio risulta più appetibile e gradevole al palato?					
Campione	1	2	3	4	5
A					
B					
C					

Note: 1 = per niente gradevole; 2= poco gradevole; 3=abbastanza gradevole; 4= gradevole; 5= molto gradevole

3.7.2 Risultati e discussioni

Da questa indagine, è emerso che le miscele maggiormente apprezzate sono quelle aventi lo 0,15% di olio essenziale addizionato; in particolare maggiormente gradita è stata la miscela composta dall’olio extravergine della cultivar “cerasuola verde” cui è stato aggiunto lo 0,15% dell’olio essenziale di origano.

Gli oli con aggiunte di percentuali inferiori pari a 0,05 e 0,10 % di olio essenziale, risultavano nei giudizi degli assaggiatori poco aromatizzati.

3.8 Preparazione dei campioni di olio extravergine d'oliva e oli essenziali

In questa fase si è proceduto alla definizione delle diverse miscele di olii extravergini di oliva monocultivar addizionati con diverse percentuali di olii essenziali di piante aromatiche secondo lo schema sotto riportato (tabella 13) per un totale di 96 combinazioni.

Tabella 13: Matrice delle combinazioni Olio di Oliva (OO)/Olio Essenziale (OE)

OO \ OE		Timo: OE			Origano: OE			Rosmarino: OE			Salvia: OE		
		0.05	0.1	0.15	0.05	0.1	0.15	0.05	0.1	0.15	0.05	0.1	0.15
Arbechina: OO	Invaio	Ai T 0.05	Ai T 0.1	Ai T 0.15	Ai O 0.05	Ai O 0.1	Ai O 0.15	Ai R 0.05	Ai R 0.1	Ai R 0.15	Ai S 0.05	Ai S 0.1	Ai S 0.15
	Verde	Av T 0.05	Av T 0.1	Av T 0.15	Av O 0.05	Av O 0.1	Av O 0.15	Av R 0.05	Av R 0.1	Av R 0.15	Av S 0.05	Av S 0.1	Av S 0.15
Noce di mare del Belice: OO	Invaio	Ni T 0.05	Ni T 0.1	Ni T 0.15	Ni O 0.05	Ni O 0.1	Ni O 0.15	Ni R 0.05	Ni R 0.1	Ni R 0.15	Ni S 0.05	Ni S 0.1	Ni S 0.15
	Verde	Nv T 0.05	Nv T 0.1	Nv T 0.15	Nv O 0.05	Nv O 0.1	Nv O 0.15	Nv R 0.05	Nv R 0.1	Nv R 0.15	Nv S 0.05	Nv S 0.1	Nv S 0.15
Cerasuolo: OO	Invaio	Ci T 0.05	Ci T 0.1	Ci T 0.15	Ci O 0.05	Ci O 0.1	Ci O 0.15	Ci R 0.05	Ci R 0.1	Ci R 0.15	Ci S 0.05	Ci S 0.1	Ci S 0.15
	Verde	Cv T 0.05	Cv T 0.1	Cv T 0.15	Cv O 0.05	Cv O 0.1	Cv O 0.15	Cv R 0.05	Cv R 0.1	Cv R 0.15	Cv S 0.05	Cv S 0.1	Cv S 0.15
Biancolilla: OO	Invaio	Bi T 0.05	Bi T 0.1	Bi T 0.15	Bi O 0.05	Bi O 0.1	Bi O 0.15	Bi R 0.05	Bi R 0.1	Bi R 0.15	Bi S 0.05	Bi S 0.1	Bi S 0.15
	Verde	Bv T 0.05	Bv T 0.1	Bv T 0.15	Bv O 0.05	Bv O 0.1	Bv O 0.15	Bv R 0.05	Bv R 0.1	Bv R 0.15	Bv S 0.05	Bv S 0.1	Bv S 0.15

Sebbene la valutazione organolettica attraverso *panel test* abbia identificato come 0,15% la percentuale ottimale di olio essenziale da aggiungere per ottenere un olio aromatizzato gradevole, l'analisi chimica del profilo aromatico ha riguardato tutti i 104 campioni, ovvero olio extravergine di oliva (4 cultivar 2 gradi di maturazione) sia senza aggiunta di olio essenziale (8 campioni) che in presenza di 3 diverse percentuali (0,05, 0,1 e 0,15%) di 4 diversi tipi di olii essenziali (Salvia Rosmarino, Origano e Timo) (96 campioni – Tabella 11).

3.9 Determinazione dei profili aromatici

Il *flavour* di un alimento, e quindi di un olio extravergine di oliva è dovuto all'insieme dei suoi composti volatili e non, che vengono percepiti dal consumatore attraverso i recettori olfattivi e gustativi.

I composti chiave che determinano il *flavour* di un olio extravergine di oliva sono principalmente le aldeidi, gli alcoli e gli esteri che si generano dalla cascata delle lipossigenasi⁹⁷.

La composizione quali-quantitativa dei componenti volatili dipende dalla quantità e dall'attività dei diversi enzimi, che a loro volta sono condizionati principalmente da fattori genetici, dallo stato di maturazione delle drupe, dalle modalità di conservazione delle olive prima della lavorazione, dal grado di infestazione della mosca olearia e soprattutto dalla tecnologia di estrazione e conservazione dell'olio.

3.9.1 Materiali e metodi

Per la valutazione analitica del *flavour* l'attenzione è stata incentrata sulla determinazione della frazione volatile, essendone quest'ultima la parte caratterizzante, del campione più apprezzato il così come risultato dal panel test, ovvero quello costituito dalla miscela ottenuta dall'unione dell'olio extravergine d'oliva appartenente alla cultivar “cerasuola verde” cui è stato addizionato diverse percentuali dell'olio essenziale di origano.

Il campione olio extravergine di oliva/olio essenziale è stato sottoposto ad analisi chimica che permette di valutare la componente

⁹⁷ Angerosa, Mostallino, Basti, & Vito, 2000; Angerosa et al., 2004

aromatica volatile ed associare un profilo sensoriale analitico alla valutazione organolettica.

La tecnica analitica adatta a tale scopo è la gas-cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Per poter recuperare le componenti volatili di un alimento può essere utilizzata la tecnica di estrazione nota come spazio di testa statico (*Head Space HS*)⁹⁸.

Nella tecnica dello spazio di testa statico, il campione, ermeticamente chiuso in un idoneo contenitore e, mediante l'utilizzo di un bagno termostato, è portato alla temperatura desiderata e mantenuto in tali condizioni fino al raggiungimento dell'equilibrio tra i composti volatili presenti nella matrice e quelli nella fase vapore.

Le apparecchiature utilizzate sono le seguenti:

- Pipetta automatica 100-1000 µL;
- Vials in vetro da 20 mL con tappo in PTFE magnetico;
- Siringa GERSTEL-HEAD SPACE syringe kit 2,5 mL;
- GC-MS Agilent TECHNOLOGIES 7000C TRIPLE QUAD;
- Colonna cromatografica VARIAN DB5 0.25 mm x 30 m x 0.25 µm i.d.
- Autocampionatore GERSTEL MPS MULTIPURPOSE SAMPLER.

Il campione di olio extravergine di oliva ed olio extravergine di oliva aromatizzato è stato posto in dei *vials* dotati di tappo magnetico a vite e posizionati nell'auto-campionatore del GC-MS. I campioni sono stati incubati alla temperatura di 40°C per 10 minuti, trascorsi i quali la

⁹⁸ Kanavouras, A., Kiritsakis, A., & Hernandez, R. J. (2005)

siringa ha campionato lo spazio di testa arricchitosi dei componenti volatili che vengono analizzati nel sistema gascromatografico.

3.9.2 Risultati e Discussioni

Dall'analisi dello spazio di testa dell'olio extravergine di oliva sono stati rivelati circa dodici sostanze principali tra le quali, i composti aromatici maggiormente abbondanti sono stati identificati come o-cymene e β -ocimene.

Considerata la maggiore volatilità degli oli essenziali ed il maggior numero di componenti aromatici in essi contenuti, com'era ovvio attendersi, il profilo aromatico delle miscele aromatizzate, se paragonato con quello relativo al solo olio extravergine di oliva, è profondamente differente sia in termini qualitativi che in termini quantitativi.

L'analisi dei cromatogrammi ottenuti ha evidenziato diverse sostanze aromatiche, per la maggior parte riconducibili a composti terpenici, che sono state identificate attraverso le informazioni dello spettro di massa e degli indici di Kovats.

Inoltre, si è confermato che l'incremento di alcune sostanze volatili aromatiche si registrava in modo preponderante sulle miscele in cui era stata aggiunta la percentuale dello 0,15% di olio essenziale. Figura 16 e 17:

Figura 16: Confronto fra le sostanze volatili aromatiche delle miscele dell'olio essenziale di origano e dell'olio di cerasuola verde

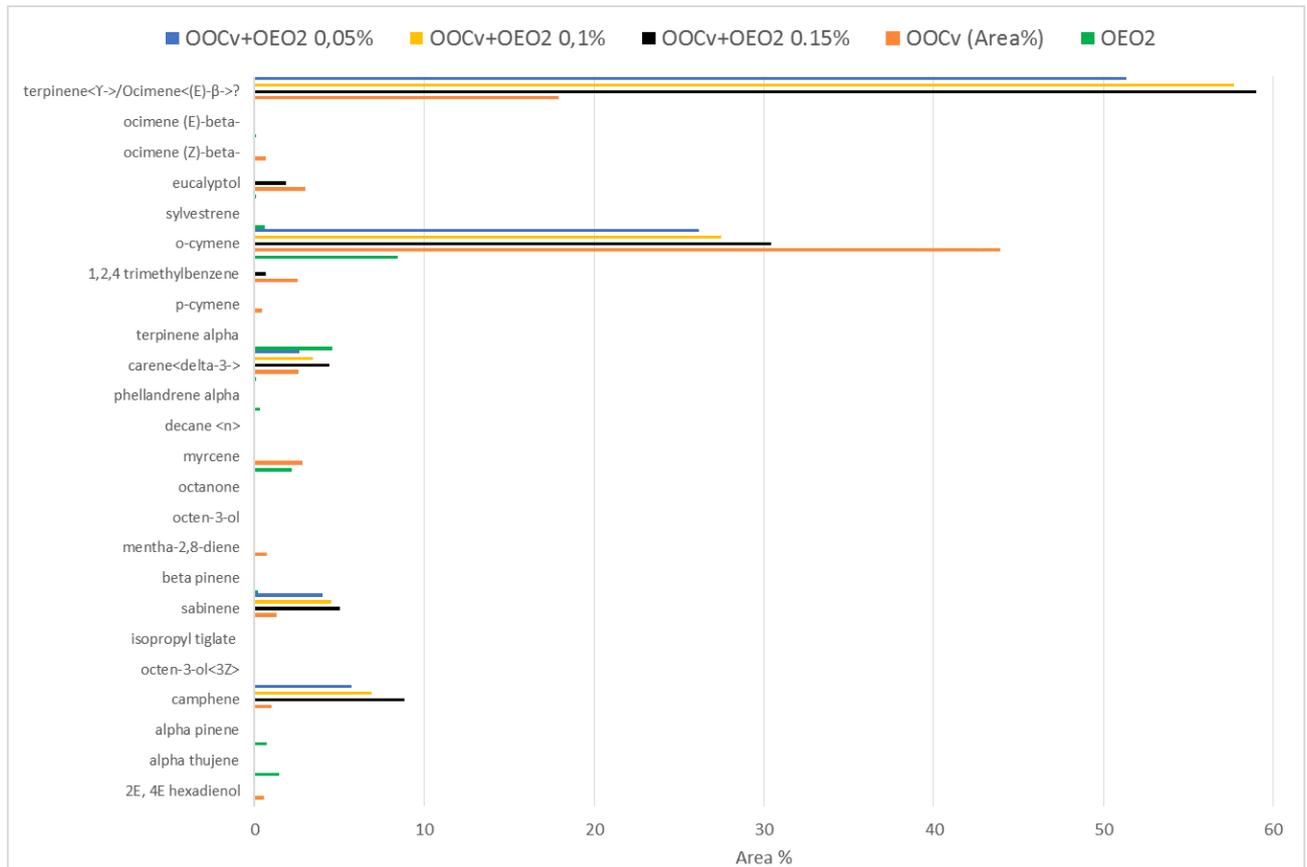
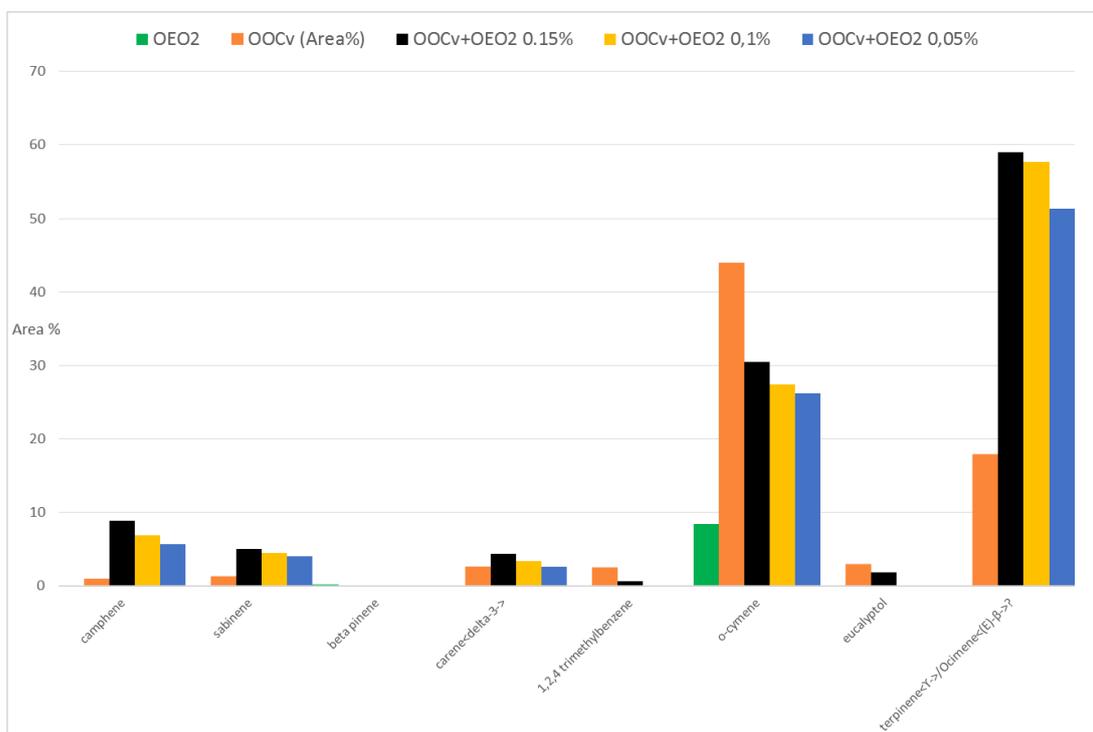


Figura 17: Confronto fra le sostanze volatili aromatiche preponderanti e più rilevanti



3.10 Valutazione della resistenza degli oli extravergini e delle miscele allo stress termico e fotochimico

Le analisi di resistenza allo stress termico e fotochimico⁹⁹, sono state effettuate per verificare un eventuale effetto protettivo sulle principali componenti nutrizionali dell'olio da parte degli oli essenziali addizionati e pertanto hanno riguardato gruppi specifici all'interno dell'insieme dei 104 campioni.

Al fine di individuare i principali fattori che possano influenzare la resistenza a possibili condizioni di stress, le indagini sono state condotte considerando:

- Stress Termico a 40 °C per simulare conservazione in luoghi caldi;
- Stress Termico a 100 °C per simulare alte temperature, comunque al di sotto del punto di fumo dell'olio;
- Stress Termico a 200 °C come alte temperature.
- Stress degradativo indotto dalla azione di luce e aria: condizioni di normale esposizione all'aria (Condizioni Normali CN) e irradiazione nel range degli UVA-Vis con massimi tra 300 e 400 nm, 450 nm e 550 nm.

Quest'ultimo parametro è stato scelto come condizione di massimo stress fotochimico in quanto contiene sia la componente a più alta energia (UVA) alla quale possa verosimilmente essere esposto l'olio extravergine di oliva, sia la componente visibile in grado di promuovere processi di fotosensibilizzazione agendo sulle sostanze colorate naturalmente presenti nell'olio extravergine di oliva.

⁹⁹ AOCS, 1993

3.11 Individuazione dei profili acidi degli oli extravergini di oliva

Considerando che gli acidi grassi assunti dall'organismo umano con la dieta, rivestono un ruolo di fondamentale importanza ai fini salutistici e tenendo conto, inoltre, il ruolo che gli stessi assumono nella *shelf-life* del prodotto, si è deciso di investigare gli effetti dello stress foto-ossidativo e termico sul profilo acido degli oli di oliva extravergine e successivamente sulle miscele con gli oli essenziali.

La determinazione analitica di alcuni parametri, quali gli acidi grassi, permette di ottenere utili informazioni sulla genuinità e tipicità di un olio.

Il primo passo è quindi stato rivolto alla caratterizzazione del profilo acido degli oli di oliva.

L'olio extravergine di oliva ha un profilo percentuale in acidi grassi tipico, differente da quella degli oli estratti da altre oleaginose. Tra gli acidi grassi presenti nell'olio extravergine d'oliva i più importanti sono riportati in tabella 14:

Tabella 14: Profilo acido tipico di un olio extravergine di oliva

Acidi grassi	Nomenclatura	% attese
Acido Palmitico	C 16:0	7-17
Acido Palmitoleico	C 16:1	0,3-5
Acido Stearico	C 18:0	1,5-4
Acido Oleico	C 18:1	63-83
Acido Linoleico	C 18:2	5,5-19

3.11.1 Materiali e Metodi

Nel corso della prova, le analisi sono state eseguite basandosi sul Regolamento (CEE) n. 2568/91, e sue successive modifiche, che prevede la transesterificazione degli acidi grassi¹⁰⁰ dei gliceridi presenti nell'olio nei rispettivi esteri metilici, i quali, rispetto ai corrispondenti acidi liberi, presentano una maggiore volatilità ed una minore polarità, quindi adatti all'analisi gascromatografica.

➤ Reagenti

- Soluzione KOH metanolica 2 M
- Preparazione soluzione: in un matraccio tarato da 100 mL aggiungere 11,2 g di idrossido di potassio e portare a volume con metanolo GC grade.
- Esano GC Grade.

➤ Apparecchiatura

- Falcon 15 mL con tappo a vite;
- Pipette automatiche 20-200 μL e 100-1000 μL ;
- Vials in vetro da 1,5 mL con tappo in PTFE;
- Siringa da 10 μL , graduata in divisioni di 0,1 μL ;
- GC Shimadzu 2010 dotato di detector a ionizzazione di fiamma (FID), software Shimadzu GC Solution;
- Colonna cromatografica VARIAN CP-Wax 52 CB, 0.25 mm x 30 m fused silica WCOT CP-Wax 52 CB (0.25 μm i.d.)

➤ Transesterificazione a freddo

A 100 μL di campione di olio extravergine di oliva, posti in una Falcon da 15 mL, sono stati aggiunti 2 mL di soluzione metanolica di

¹⁰⁰ Luigi Mondello, et al 2001

KOH 2 M. La soluzione idroalcolica è stata agitata al vortex per 10 secondi a 2500 rpm e lasciata riposare per 30 minuti a temperatura ambiente.

Trascorso tale tempo sono stati aggiunti 2 mL di esano. L'emulsione è stata agitata per qualche secondo e lasciata riposare al fine di separare le due fasi.

La fase in esano, contenente gli esteri metilici, è stata trasferita in una vial da 1,5 mL con tappo PTFE ed analizzata mediante GC-FID. Dal cromatogramma ottenuto si ricavano tempi di ritenzione e aree dei picchi per l'analisi quali-quantitativa degli acidi grassi presenti.

L'identificazione dei picchi è stata effettuata confrontando i tempi di ritenzione (R.T.) dei diversi acidi grassi con quelli ottenuti iniettando una miscela di *standards* di esteri metilici di acidi grassi puri (SUPELCO Olive Oil 1000 mg - net), nelle stesse condizioni operative.

3.11.2 Risultati e discussioni

Per l'analisi quantitativa è stato utilizzato il metodo della normalizzazione interna supponendo che i picchi degli analiti di nostro interesse, presenti sul cromatogramma, costituiscano il 100% dell'eluizione totale.

Dal cromatogramma sono state ricavate le aree dei singoli analiti e da quest'ultime le percentuali degli acidi grassi attraverso la seguente equazione:

$$(A_x/\sum A) \times 100$$

Con: A_x = area del picco corrispondente al componente x; ΣA = somma delle aree dei picchi degli analiti.

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente tabella 15.

Tabella 15: Profilo Acidico di Riferimento degli Olii Extravergini di Oliva

OO AG	Acido Palmitico 16:0	Acido Palmitoleico 16:1	Acido Stearico 18:0	Acido Oleico 18:1	Acido Linoleico 18:2
Cerasuola verde	10.27	0.3	2.47	75.64	11.32
Cerasuola invaio	13.86	0.58	2.25	71.61	11.7
Nozellara del Belice verde	10.2	0.42	2.99	76.18	10.21
Nozellara del Belice invaio	12.58	0.61	3.25	73.02	10.53
Biancolilla verde	12.01	0.54	1.93	71.34	14.19
Biancolilla invaio	13.9	0.56	2.25	71.56	11.73
Arbequina verde	17.08	1.48	1.72	66.28	13.43
Arbequina invaio	10.13	1.16	1.97	73.9	12.84

3.12 Determinazione degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva sottoposti a foto-ossidazione in presenza di aria

Tutte le sostanze grasse naturali subiscono nel tempo alterazioni della loro composizione chimica; che dipendono da fenomeni fisici, chimici e biologici.

L'irrancidimento¹⁰¹ è la più importante alterazione che si manifesta a carico dei grassi ed è dovuta a fenomeni enzimatici accelerati da una non

¹⁰¹ Frankel, 1998

idonea conservazione del grasso. Tra le diverse tipologie di irrancidimento la nostra attenzione si è focalizzata su quello ossidativo, il quale avviene ad opera di enzimi detti lipossidasi ed è catalizzato da attivatori esterni come luce e calore.

Tale fenomeno enzimatico consta di due fasi: l'autossidazione primaria, in cui si ha la formazione di idroperossidi, e l'autossidazione secondaria, in cui quest'ultimi subiscono ulteriore degrado dando luogo a specie di tipo aldeidico e chetonico conferendo all'olio il tipico odore acre di rancido.

Considerando che tale fenomeno di idroperossidazione riguarda gli acidi grassi insaturi, e che il rapporto acidi grassi saturi/acidi grassi insaturi rappresenta uno dei parametri fondamentali per le norme in materia di etichettatura alimentare, è di fondamentale importanza riuscire ad identificare e sviluppare metodiche che consentano di minimizzare la variazione del profilo acidico degli oli extravergini di oliva.

Considerato il significativo numero di composti chimici presenti negli oli essenziali è presumibile che la loro attività antiossidante non sia attribuibile ad uno specifico meccanismo, ma piuttosto ad una serie di azioni che si combinano e si amplificano per effetto di molecole che agiscono in sinergia.

Pertanto, per i test di resistenza fotodegradativa¹⁰² si è scelto di utilizzare una percentuale di olio essenziale pari a 0.15% assicurando un maggior effetto *scavenger* (neutralizzazione dei radicali liberi) grazie al più elevato quantitativo di antiossidanti addizionati all'olio extravergine di oliva.

¹⁰² AOCS, 1993

3.12.1 Materiali e metodi

Pertanto è stato definito un set di 40 campioni su cui effettuare i test di fotodegradazione, ovvero olio extravergine di oliva (4 cultivar, 2 gradi di maturazione) sia senza aggiunta di olio essenziale (8 campioni) che addizionato dello 0,15% di 4 diversi tipi di olii essenziali (Salvia Rosmarino, Origano e Timo) (32 campioni).

➤ **Apparecchiatura**

- Pipetta automatica 100-1000 μL ;
- Provetta in vetro pyrex;
- Simulatore solare Atlas UV-Test λ Metek MEASUREMENT & CALIBRATION TECHNOLOGIES;
- Vials in vetro da 1,5 mL con tappo in PTFE;
- Siringa da 10 μL , graduata in divisioni di 0,1 μL ;
- GC Shimadzu 2010 dotato di detector a ionizzazione di fiamma (FID);
- Colonna cromatografica VARIAN CP-Wax 52 CB, 0.25 mm x 30 m fused silica WCOT CP-Wax 52 CB (0.25 μm i.d.).

Al fine di evidenziare variazioni significative in merito alla percentuale degli acidi grassi in campioni di olii extravergini di oliva a seguito di stress foto-degradativo, e al fine di identificare le migliori condizioni operative, è stato deciso di monitorare nel tempo lo stress fotodegradativo di un campione di olio extravergine di oliva con alte percentuali di acido oleico.

A tal proposito è stato considerato il campione d'olio appartenente alla cultivar Cerasuola verde.

Il campione, posto nel simulatore solare, è stato irradiato ad una lunghezza d'onda di 360 nm ad una potenza di irradiazione di 0,40 W/m²

a diverso tempo di esposizione, 30 min. – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 16 – 32 e 40 h in presenza di aria.

Al termine della foto-ossidazione il campione irradiato è stato sottoposto ad analisi gascromatografica per la determinazione del profilo degli acidi grassi ed in particolare modo, considerando che l'acido oleico è l'acido preponderante negli oli di oliva, la variazione percentuale del contenuto di acido oleico è stata presa da riferimento per la scelta del tempo di esposizione agli stress fotochimici.

3.12.2 Risultati e discussioni

Considerato l'elevato contenuto in acido oleico, per il monitoraggio dei tempi di stress fotodegradativo è stato scelto il campione di olio extravergine di oliva appartenente alla cultivar Cerasuola Verde.

Dall'analisi dei risultati è stata evidenziata una significativa variazione della percentuale di acido oleico nel campione sottoposto a stress foto-ossidativo dopo 8 ore di irradiazione (Figure 18 e 19).

Tale variazione, risulta subire lievi oscillazioni fino a 32 ore di irradiazione, e presumibilmente tali oscillazioni potrebbero essere imputabili ad una variazione percentuale degli altri acidi grassi minoritari presenti nei campioni di olio che influiscono sul profilo acidico.

Figura 18: Degradazione percentuale dell'acido oleico a differenti tempi di esposizione a stress fotochimico in presenza di aria.

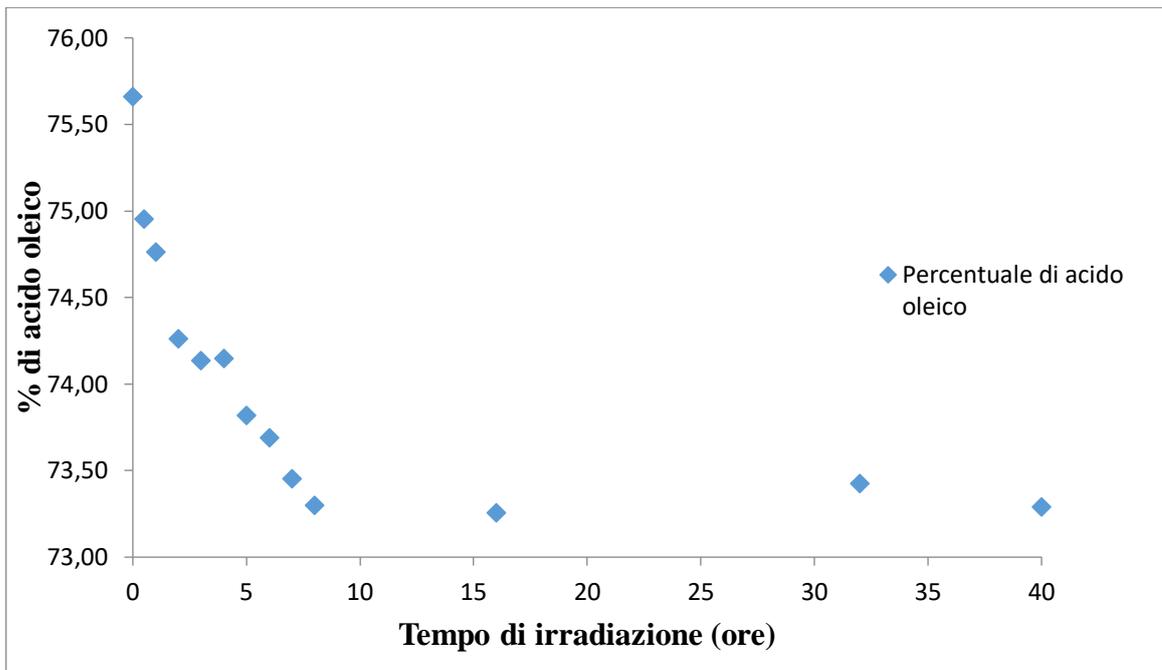
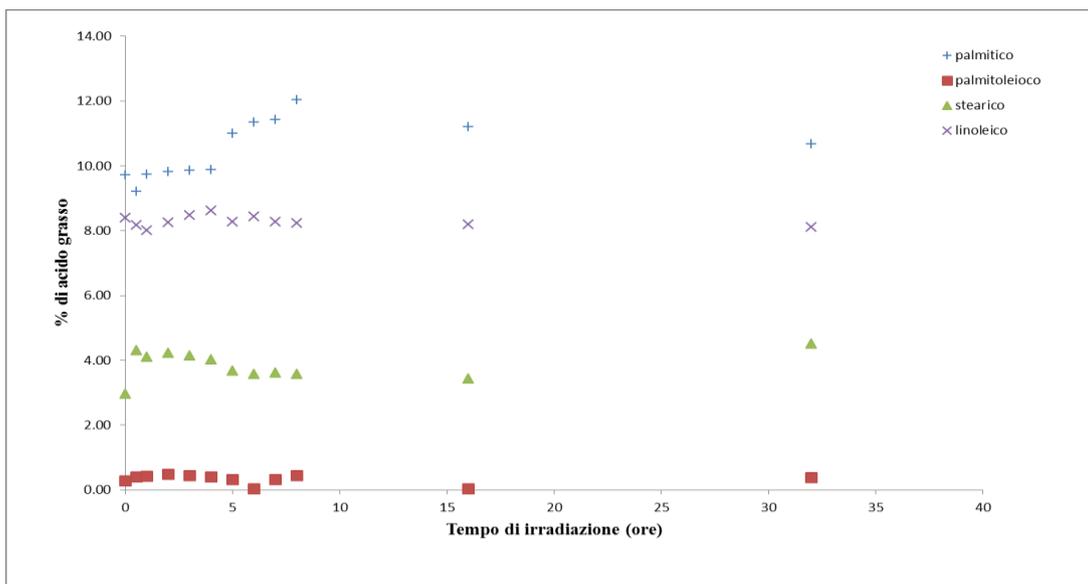


Figura 19: Degradazione percentuale degli acidi grassi minoritari a differenti tempi di esposizione a stress fotochimico in presenza di aria



Sulla base di questo monitoraggio, il tempo di 32 ore di irradiazione è stato scelto come standard per condurre le indagini di stress fotodegradativo sugli altri campioni.

La variazione del contenuto di acido oleico negli oli di oliva, aromatizzati e non, e sottoposti a stress foto-degradativo, è stata quindi monitorata per i due campioni di Cerasuola (Verde ed Invaiato) e sulle corrispondenti miscele con oli essenziali di Salvia, Timo, Rosmarino e origano, ed i risultati sono illustrati di seguito (Figure 20 e 21).

Il valore di riferimento del campione di olio non irradiato è indicato con la sigla NSF (Non Stressato Fotochimicamente).

Figura 20: Percentuale dell'acido oleico nei campioni di Cerasuola Verde (CV) e Cerasuola Verde aromatizzato con olio essenziale di salvia (OES), origano (OEO), timo (OET), rosmarino (OER) sottoposti a stress foto-ossidativo per 32 ore

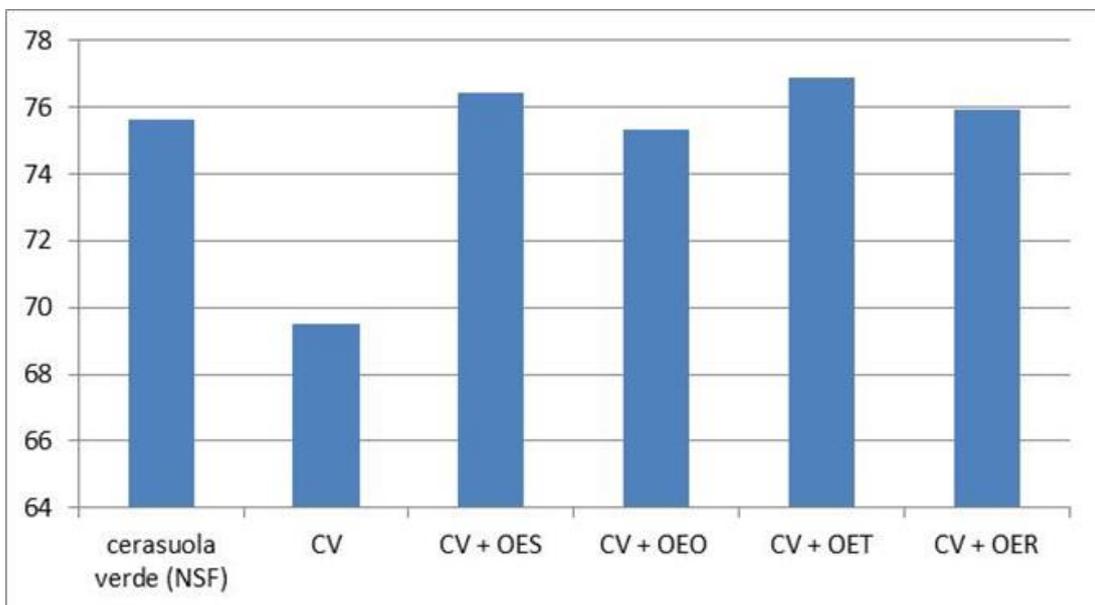
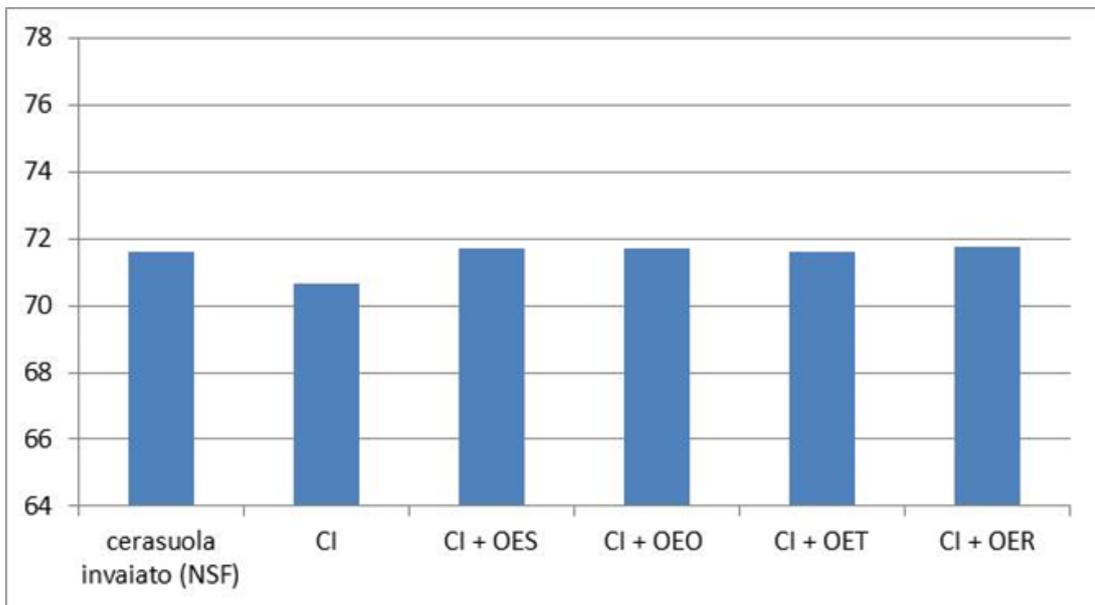


Figura 21: Percentuale dell'acido oleico nei campioni di Cerasuola Invaiaato (CI) e Cerasuola Invaiaato aromatizzato con olio essenziale di salvia (OES), origano (OEO), timo (OET), rosmarino (OER) sottoposti a stress foto-ossidativo per 32 ore



I dati sulla percentuale di acido oleico mostrano come la maggiore variazione si abbia nel caso della CV, mentre la diminuzione di acido oleico nei campioni di CI a seguito di stress fotodegradativo risulta essere di minore entità. È comunque importante sottolineare che in tutti i campioni di olio aromatizzato la percentuale relativa di acido oleico (rispetto agli altri acidi grassi) rimane pressoché costante ed analoga a quella di riferimento (olio NSF) confermando un effetto protettivo sull'acido oleico da parte degli oli essenziali addizionati.

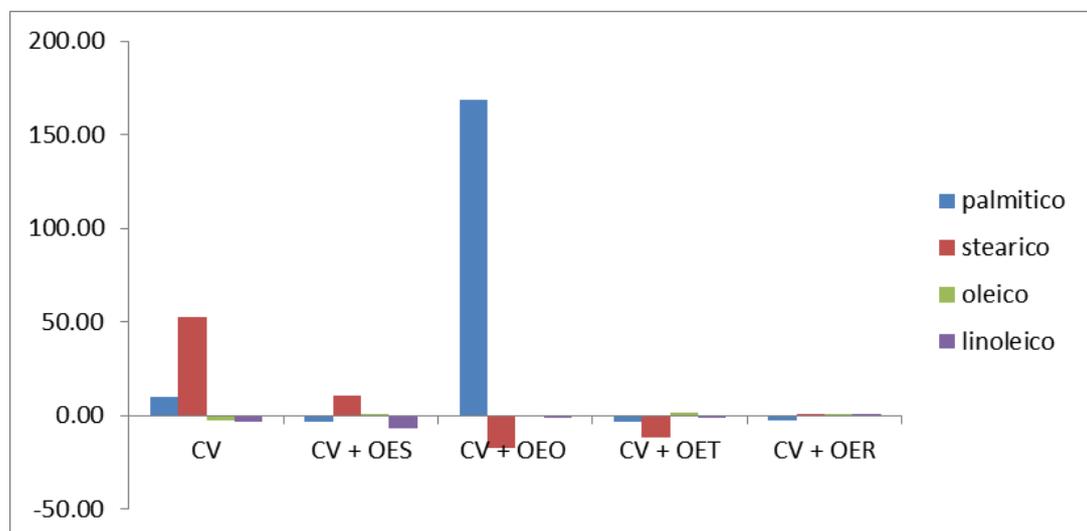
Un simile confronto è stato effettuato anche per i componenti minoritari degli acidi grassi (Palmitico, Stearico e Linoleico) con l'esclusione dell'acido palmitoleico la cui variazione non è rigorosamente interpretabile a causa delle forti oscillazioni dovute alla sua presenza in percentuali relative inferiori all'1%.

I risultati sono illustrati di seguito considerando le variazioni percentuali dei campioni irradiati rispetto al campione non irradiato.

Pertanto, per una migliore interpretazione dei grafici, si precisa che tali valori possono essere sia positivi che negativi in funzione del fatto che l'irradiazione possa aver provocato un impoverimento (degradazione) o un arricchimento (in termini relativi) di alcune componenti e che valori bassi corrispondono a variazioni minime e quindi ad una conservazione del profilo originario.

Tale tipo di confronto è possibile solo all'interno della stessa serie di campioni, essendo comune il punto di partenza ovvero l'olio NSF.

Figura 22: Variazione percentuale del profilo degli acidi grassi nei campioni di Cerasuola Verde (CV) e Cerasuola Verde aromatizzato con olio essenziale di salvia (OES), origano (OEO), timo (OET), rosmarino (OER), sottoposti a stress foto-ossidativo per 32 ore



Dai grafici soprariportati (Figura 22) è possibile evidenziare che nel caso della CV gli oli essenziali di Salvia Timo e Rosmarino sono quelli che consentono di mantenere meglio il profilo acidico originario.

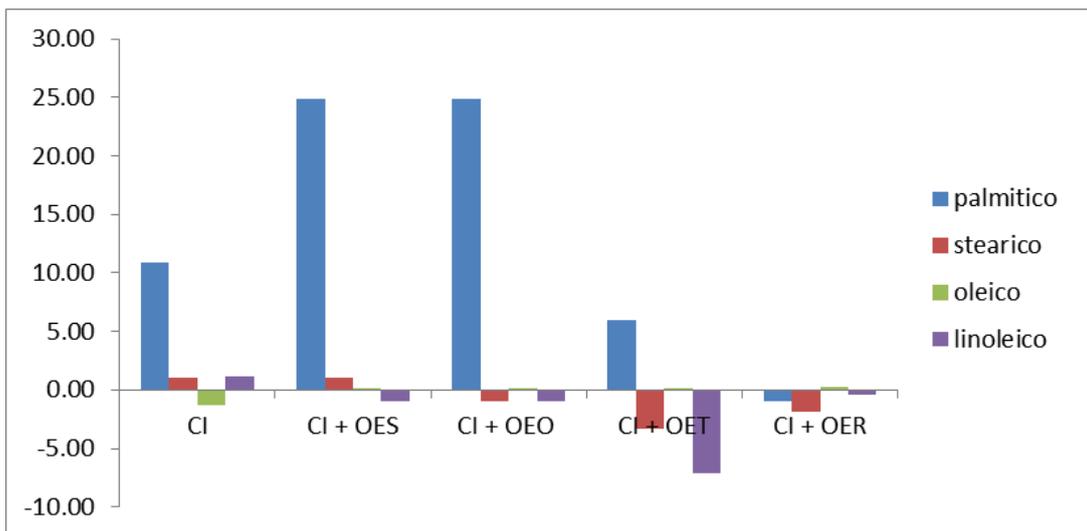
È interessante notare che invece, nel caso dei campioni di CI (Figura 23), si ha mediamente una maggiore variazione del profilo degli acidi grassi (dato non evincibile dalla sola analisi dell'acido oleico

precedentemente illustrata) e che tale variazione è marcata per l'acido palmitico (acido grasso saturo).

In questo caso, solo l'olio essenziale di rosmarino riesce a mantenere pressoché inalterata la composizione percentuale relativa degli acidi grassi.

Tali dati sembrano suggerire che la generalizzazione “olio essenziale aggiunto” = “olio extravergine di oliva protetto” debba essere verificata sia in funzione dell'olio da proteggere che in funzione del tipo di aroma aggiunto.

Figura 23: Variazione percentuale del profilo degli acidi grassi nei campioni di Cerasuola Invaiato (CI) e Cerasuola Invaiato aromatizzato con olio essenziale di salvia (OES), origano (OEO), timo (OET), rosmarino (OER), sottoposti a stress foto-ossidativo per 32 ore



3.13 Determinazione degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva sottoposti a stress termico

Generalmente, i composti organici, se sottoposti a stress di tipo termico, sono soggetti a fenomeni di degradazione che ne alterano profondamente la loro struttura, e quindi la loro funzionalità.

Nell'ambito del progetto di ricerca, lo scopo degli studi degli stress termici sui campioni di olio, è stato quello di investigare l'effetto di tale stress sulla composizione acidica di oli extravergini di oliva e di oli aromatizzati e l'eventuale effetto "protettivo" derivante dall'aggiunta di oli essenziali di piante aromatiche.

3.13.1 Materiali e metodi

Nel dettaglio, gli esperimenti sono stati condotti in differenti condizioni in termini sia di temperatura che di tempo di esposizione (da 40 a 200° C e per 32-40 ore in condizioni di saturazione di ossigeno).

L'effetto dello stress termico è stato investigato mediante analisi sulla variazione percentuale della composizione degli acidi grassi.

In considerazione della disponibilità di tutte e quattro le *cultivars* e di entrambe le epoche di maturazione degli oli extravergini di oliva si è deciso di valutare lo stress su tutti e otto i campioni.

➤ Apparecchiatura

- Pipetta automatica 100-1000 µL;
- Provetta scura in vetro;
- Piastra riscaldante dotata di agitatore magnetico;

- Bagno ad olio di silicone;
- Termometro digitale;
- Vials in vetro da 1,5 mL con tappo in PTFE;
- Siringa da 10 μ L, graduata in divisioni di 0,1 μ L;
- GC Shimadzu 2010 dotato di detector a ionizzazione di fiamma (FID);
- Colonna cromatografica VARIAN CP-Wax 52 CB, 0.25 mm x 30 m fused silica WCOT CP-Wax 52 CB (0.25 μ m i.d.).

Al fine di evidenziare le possibili variazioni significative in merito alle percentuali di acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva e di miscele di oli a seguito di stress termico, è stato deciso di sottoporre i diversi campioni di oli extravergini di oliva nei diversi stadi di maturazione a riscaldamento.

Quindi, 10 mL dei differenti campioni sono stati trasferiti in una provetta di vetro scuro e si è proceduto con l'immergere la provetta in un bagno ad olio di silicone a contatto con una piastra riscaldante dotata di agitatore magnetico.

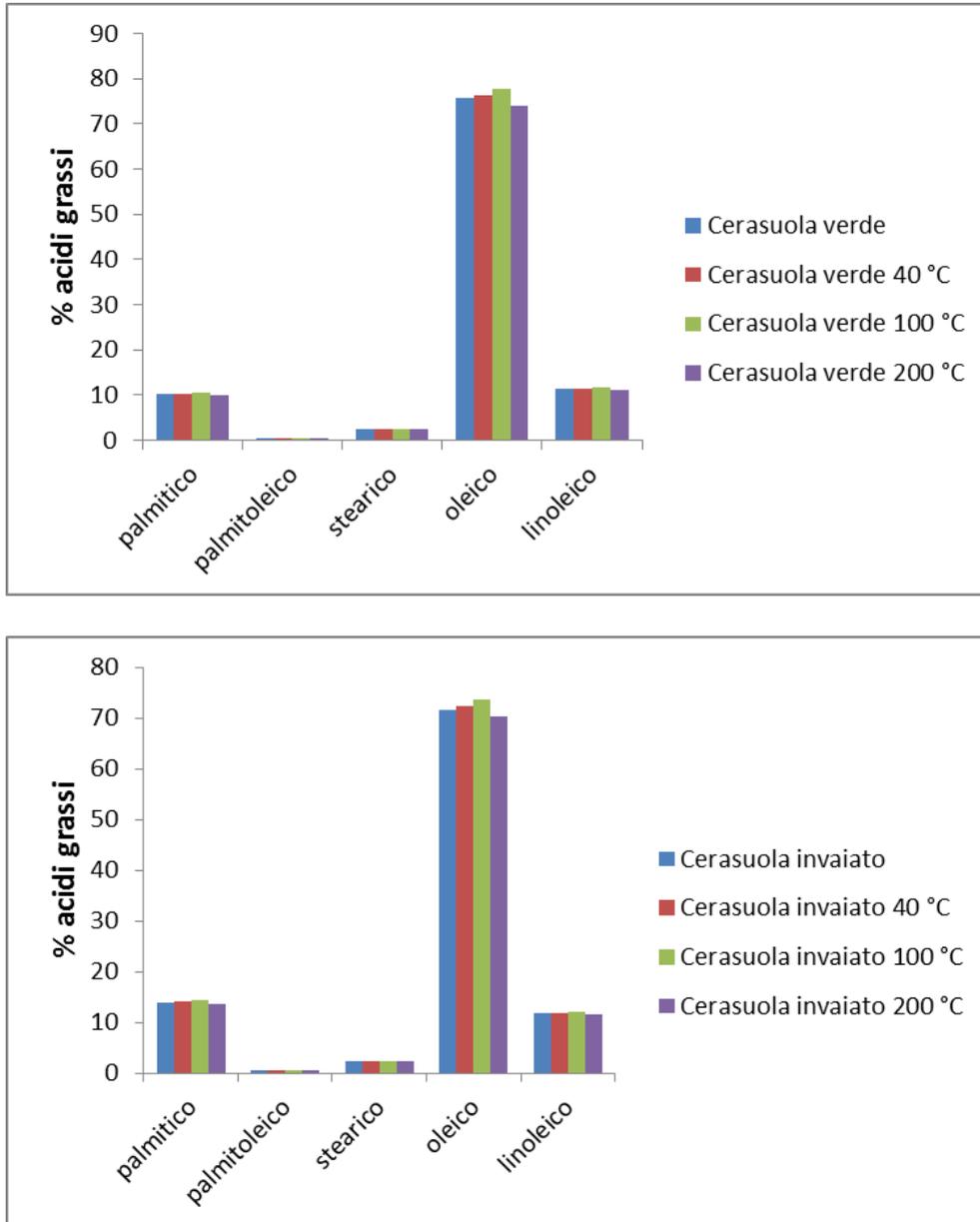
In prima istanza, i differenti campioni sono stati riscaldati ad una temperatura di 40 e 100 °C per 32 e 40 ore, per poi proseguire con ulteriori test condotti a 200 °C per 40 ore.

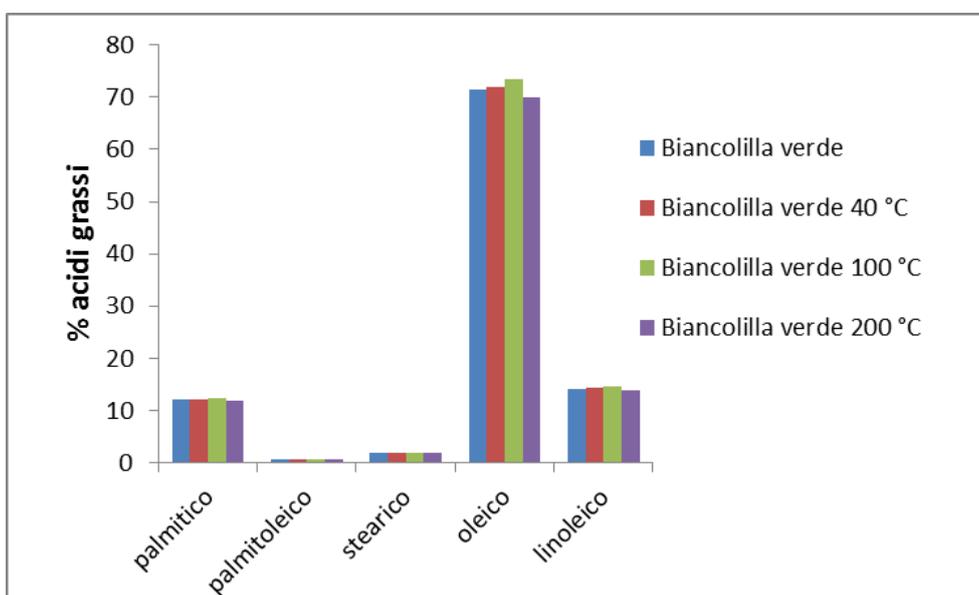
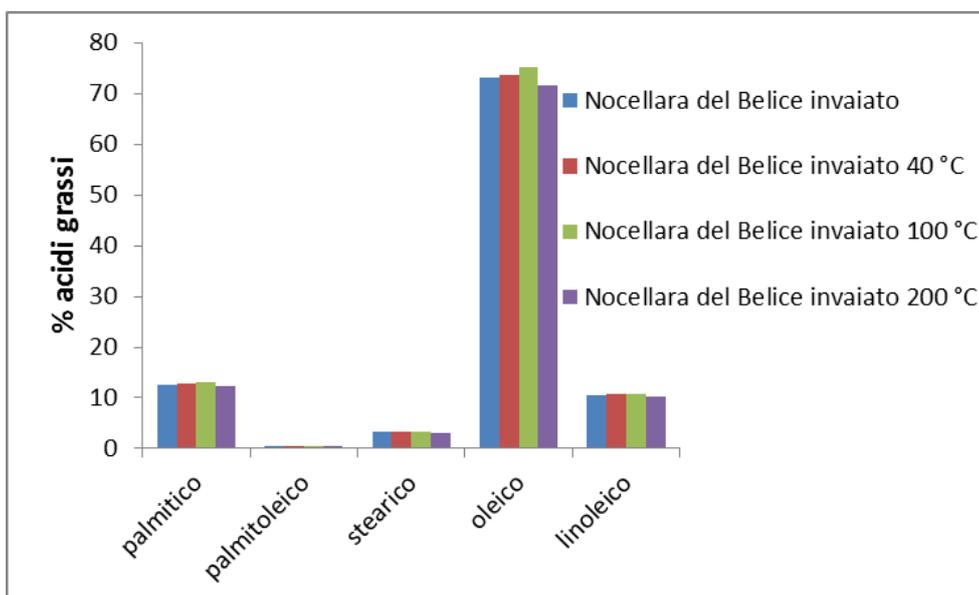
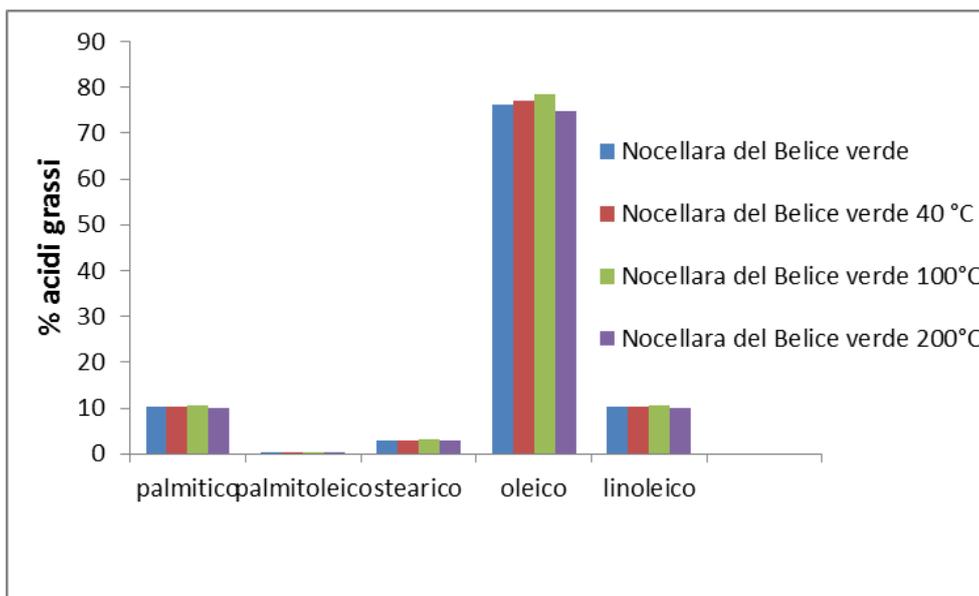
Al termine dello stress termico, il campione è stato sottoposto a pretrattamento e ad analisi gascromatografica per la determinazione del profilo degli acidi grassi seguendo la stessa metodica di analisi descritta in precedenza.

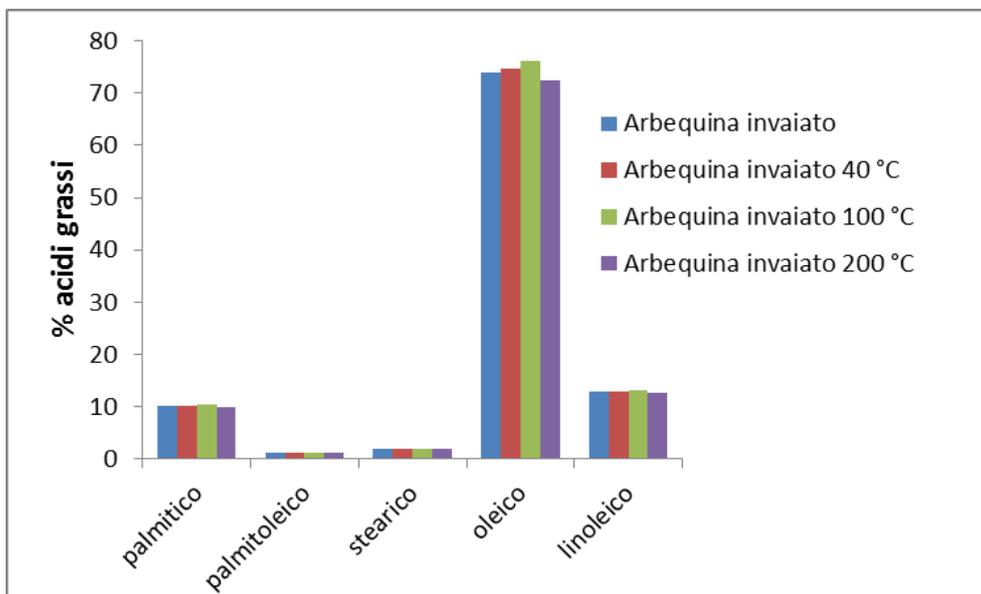
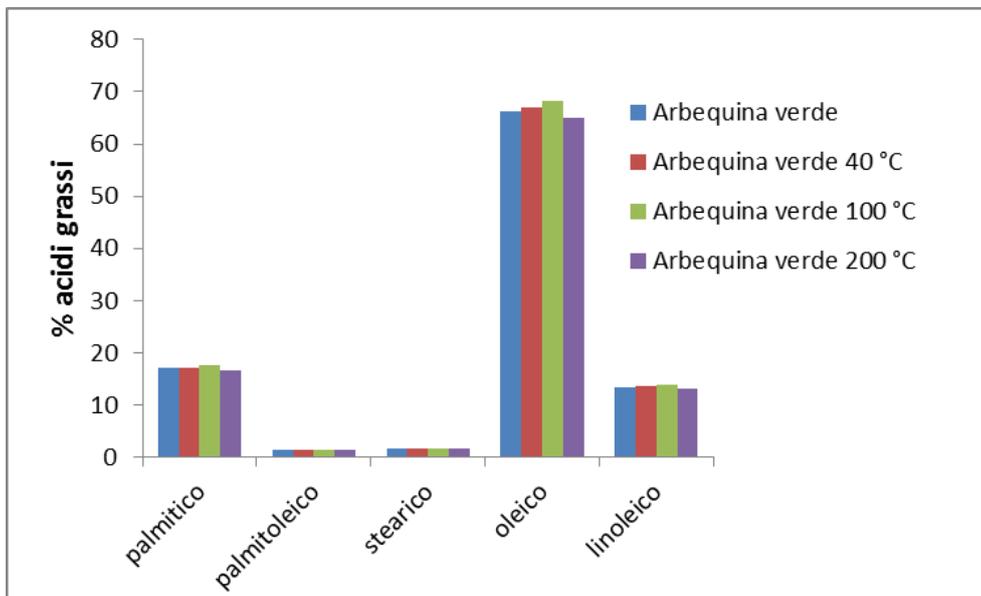
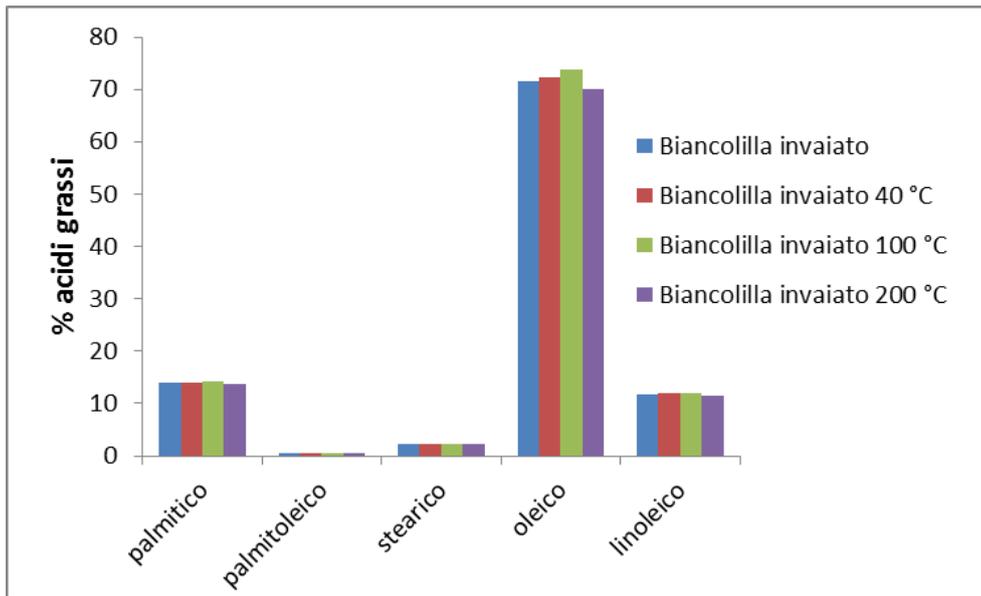
3.13.2 Risultati e discussioni

Dall'analisi dei risultati non è stata evidenziata una variazione significativa del profilo acidico dei campioni sottoposti a stress di tipo termico condotto a 40, 100 e a 200°C per 40 ore.

Figura 24: Degradazione percentuale degli acidi grassi a differenti temperature







Dalle figure 24, è possibile evidenziare che gli i campioni di oli extravergini di oliva sottoposti a stress termici da 40 a 200 °C, non subiscono significative variazioni in merito alla composizione degli acidi grassi.

Tale dato è in accordo con quanto riportato recentemente in letteratura.

In particolare, in un recente studio¹⁰³, è stata evidenziata la maggiore resistenza termica da parte degli oli extravergini di oliva rispetto agli oli di oliva, se sottoposti a stress termico.

In tale studio, i ricercatori hanno razionalizzato i dati ottenuti attribuendo la maggiore resistenza termica da parte dell'olio extravergine di oliva all'elevato contenuto di α tocoferolo e di polifenoli, le quali sostanze certamente risultano essere rilevante nei campioni di oli extravergini di oliva tipici della dieta mediterranea.

3.14 Variazioni degli acidi grassi in campioni di oli extravergini di oliva e miscele di oli sottoposti a stress termico

Poiché le analisi effettuate sugli oli extravergine di oliva tal quali, sottoposti a stress termico, non hanno evidenziato una variazione apprezzabile degli acidi grassi monitorati, non si è ritenuto opportuno sottoporre le miscele alla stessa tipologia di stress.

¹⁰³ Gharby, et al. del 2015

4 CONCLUSIONI

In questo lavoro, attraverso un processo innovativo di aromatizzazione dell'olio extravergine d'oliva, è stato apportato ed evidenziato un vantaggio di tipo commerciale, salutistico, edonistico e di durata del prodotto senza l'ausilio di conservanti artificiali.

✓ L'analisi del profilo sensoriale effettuato con il Panel Test, ha rilevato un apprezzamento notevole da parte del campione di assaggiatori preso in esame. Il prodotto, è risultato molto gradito soprattutto per la fragranza che racchiude, essendo esaltati maggiormente gli odori e i sapori mediterranei. Ciò è stato supportato, dalle analisi del *flavour* attraverso lo spazio di testa, che inequivocabilmente ci danno direttive circa l'effettivo incremento della componente aromatica "donata" dagli oli essenziali estratti dalle erbe aromatiche utilizzate.

✓ Un effettivo incremento della componente di antiossidanti che, come è noto, hanno una ricaduta positiva sulla salute dell'uomo, venendo quindi incontro alla tendenza che oggi il consumatore ha nei confronti dei prodotti nutraceutici che forniscono benefici medici, salutari, compresa la prevenzione e il trattamento della malattia.

Nel caso degli antiossidanti con cui si arricchisce un alimento nobile quale l'olio extravergine d'oliva, questi possono concorrere efficacemente alla prevenzione di patologie cardio vascolari, all'invecchiamento cutaneo e dei tessuti in genere, predisponendo il consumatore anche alla prevenzione di patologie gravi come il cancro.

✓ L'incremento degli antiossidanti nell'olio extravergine d'oliva grazie all'aggiunta degli oli essenziali, ha permesso all'olio stesso,

di resistere agli stress cui può andare incontro durante la sua conservazione.

Le analisi, effettuate sui campioni di olio extravergine d'oliva tal quale sottoposti a stress di tipo foto-ossidativo, hanno mostrato un decremento della percentuale di acido oleico, prezioso alleato della buona conservazione dell'olio e della salute del consumatore.

Alle stesse condizioni di stress di tipo foto-ossidativo, nelle miscele di olio extravergine d'oliva cui sono stati addizionati gli oli essenziali, la percentuale relativa di acido oleico è rimasta invece, pressoché costante ed analoga a quella del campione di riferimento, confermando l'effetto protettivo sull'acido oleico da parte degli oli essenziali addizionati.

5 BIBLIOGRAFIA

AA.VV., 2009. *Piante officinali in Sicilia: Studio agronomico, fitochimico e farmacologico mirato alla loro valorizzazione e allo sfruttamento agro-industriale*. 17

AA.VV., 2001. *Piccola guida alle erbe officinali: proprietà impieghi, notizie sulla coltivazione*. Agricoltura, supplemento 11:3.

Adams, R. P. (1995) In C. Stream (Ed.), *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*. Illinois: Allured Publishing Corporation.

Ahindra N (2000) *Stabilization of Flaxseed oil with Capsicum antioxidant*. JAOCS 77:799-800

Angerosa F. (1998). *La qualità organolettica degli oli vergini di oliva*. Frutticoltura 7/8, 47-50

Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2000). *Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds*. Food Chemistry

Antoun N, Tsimidou M (1997) *Gourmet olive oil: stability and consumer acceptability studies*. Food Research International 30, 2:131-136

AOCS Official Methods. (1993). *Oil Stability Index (OSI)*. Cd12b-92

Baiano A, Gambacorta G, La Notte E. *Aromatization of Olive Oil*. Transworld Research Network 2010, pp. 1-29

Bauer K., D. Garbe and H. Surburg 2001. *Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation, Properties and Uses*. Wiley-VCH editore, 293

Ben Arfa, S. C., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P.; 2005. *Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical Structure*. Letters in Applied Microbiology, 43:49-154

Biondi A, Borghetti N, Castellanza V, Farioli A, Magni A, Pasini S (2008) *L'analisi del settore dell'olio d'oliva in Italia*. Corso in Economia del consumo aa 2007/2008. Libera Università di lingue e Comunicazione

Bishop C. D., 1995. *Antiviral activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (Maiden & Betche) Cheel (tea tree) against tobacco mosaic virus*. Journal of Essential Oil Research 7:641-644

Boskou, D. (1996). *Olive oil: Chemistry and technology*. Champaign, IL (USA): AOCS Press

Boyle W., 1955. *Spices and essential oils as preservatives*. American Perfum. Essent. Oil Review, 66: 25– 28

Canter P. H., Howard T., Edzard E., 2005. *Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology*. Trends in Biotechnology vol. 23 (4):180-185

Carlton, R. R., Waterman P. G., Gray A. I., Stanley G. D., 1992. *The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet gale (Myrica gale) (Myricaceae)* Chemoecology, 3:55-59

Carson C.F. and Riley T.V., 1993. *Antimicrobial activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia*. Letters in Applied Microbiology, 16: 49-55

Catizone P., Marotti, M., Toderi G., Tètènyi P. 1986. *Coltivazione delle piante medicinali e aromatiche*. Patron editore, 199-209

Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. *In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils.* Letters in Applied Microbiology, 29, (2):130-135

Crosthwaite, D., 1998. *UK trade within the flavour and fragrance industry.* International Federation of Essential Oils and Aroma Trades—21st International Conference on Essential Oils and Aroma's. IFEAT, London, 6-12

Curci V. (2001). *Manuale dell'olio d'oliva.* Calderini ed agricole, Bologna

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006.* EFSA Journal 2011;9(4):2033 [25 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2011.2033

Endo Y., Usuki R., Kaneda T. (1984). *Prooxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate.* J. Am. Oil Chem. Soc. 61: 781-784

Escrich E., Solanas M., Moral R., Costa I., Grau L. (2006). *Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence.* Clin. Transl. Oncol. 8: 868-83

European Union: Regulation (EC) No. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council on nutrition and health claims made on foods. Official Journal of the European Union L 404, 30 December 2006, pp. 9-25

Faid M., Bakhy K., Anchad M., Tantaoui-Elaraki A., 1995. *Alomond paste: Physicochemical and microbiological characterizations and preservation with sorbic acid and cinnamon*. Journal of Food Production, 58:547-550

Fernander E., Gallus S., La Vecchia C. (2006). *Nutrition and Cancer risk: an overview*. J. Br. Menopause Soc. 12: 139-142

Figueiredo C. A., Barroso J. Pedro L. G., Scheffer J. J.C., 2008. *Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils*. Flavour and Fragrance Journal. 23(12): 213-226

Firenzuoli, F. (2002). *Fitoterapia*. Milano: Masson

Frankel E.N. (1998). *Lipid Oxidation*. The Oily Press, Dundee (Scotland)

Gasparoli A. e Fedeli E. (1987). *Valutazione dei componenti volatili negli oli alimentari: un approccio alla tecnica "Purge and Trap"*. Riv. It. Sost. Grasse. 64: 453- 460

Giomo A. (1999). *La qualità dell'olio d'oliva extra vergine come viene percepita dai consumatori*. Olivo & Olio. 3: 33-48

Grundy S.M. (1986). *Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol*. N. Engl. J. Med., 314: 745-748

Guenther E. 1948. *The Essential Oils*. D. Van Nostrand editore

Grande Covian, F. (1988). *Segundo coloquio internacional sobre grasas monoinsaturadas*. *Olivae*, 23, 32–34

G. Gambacorta, M. Faccia, S. Pati, C. Lamacchia, A. Baiano and E. La Notte *Changes in the chemical and sensorial profile of extra virgin olive oils flavored with herbs and spices during storage*

ISMEA, 1994: “*Piante officinali-Rapporto 1993*” De Maria, 1992

ISO/8587 (1988). *International Organization for Standardization*. Sensory analysis—Methodology—Ranking

Jacotot, B. (1994). *El aceite de oliva: Alimento medicinal. Olivae*, 54, 40–41

Joulain, D., & Konig, W. A. (1998). *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons. Hamburg: E.B.-Verlag*

Kafatos, A., & Comas, G. (1991). *Biological effects of olive oil on human health. In A. K. Kiritsakis (Ed.), Olive oil (pp. 157–181). Champaign, Illinois: American Oil Chemists Society*

Kanavouras, A., Kiritsakis, A., & Hernandez, R. J. (2005). *Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic. Food Chemistry*

Karpouhtsis I., Pardali E., Feggou E., Kokkini S., Scouras Z. G., Mavragani-Tsipidou P., 1998. *Insecticidal and genotoxic activities of oregano essential oils. Journal of Agriculture Food Chemistry* 46:1111-1115

Kiritsakis A. and Dugan L. R. (1985) *Studies in photooxidation of olive oil. J. Am.Oil Chem. Soc.* 62: 896-982

Luigi Mondello, Giovanni Zappia, Giovanni Dugo (2001) “*Fast GC per lo studio di matrici complesse*”

Magli M., Rotondi A. (1998). *L'olio di oliva per i consumatori particolarmente attenti all'aspetto salutistico nutrizionale*. *Olio & olio*, 7: 63-68

Mahmoud S. S., Croteau R. B., 2001. *Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences U S A*, 31, 98 (16):8925-8927

Mahmoud S. S., Croteau R. B., 2001. *Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences U S A*, 31, 98 (16):8925-8927

Margarida Mold~ao-Martins *Olive oil flavoured by the essential oils of Mentha · piperita and Thymus mastichina L.*

Markmann P. (2007) *Olive Oil can prevent cancer-a comment*. *Ugeskr Laeger*. 169- 615

Mc Ewan J. A. (1994). *Consumer attitudes and olive oil acceptance: the potential consumer*. *Grasas y Aceites*, 45: 9-15

Miguel G., Simoes M., Figueiredo A. C., Barroso J. G., Pedro L. G., Carvalho L., 2004. *Composition and antioxidant activities of the essential oils of Thymus caespitius, Thymus camphoratus and Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86:183–188

Montedoro G., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. (1993). *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil-3-Spectroscopic characterizations of secoridoid derivatives*, *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234

Morales M. T., Alonso, M. V., Rios, J. J. e Aparicio, R. (1995). *Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemiometrics*. J. Agri. Food Chem. 43: 2925-2931

Morales M. T., Angerosa F., Aparico R. (1999). *Effect of extraction of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: Chemical and sensory implications*

Mourey A., N. Canillac 2002. *Anti-Listeria monocytogenes activity of essential oils components of conifers*. Food Control 13:289–292

Novak J., Draxler L., Gohler I., Franz C. M., 2005. *Essential oil composition of Vitex agnus-castus - Comparison of accessions and different plant organs*. Flavour and Fragrance journal, 20 (2):186-192

Peri C. (1995). *Qualità: concetti e metodi*. Ed. Franco Angeli, Milano

Regolamento (ue) n. 432/2012 della commissione del 16 maggio 2012 relativo alla compilazione di un *elenco di indicazioni sulla salute consentite sui prodotti alimentari, diverse da 68 quelle facenti riferimento alla riduzione dei rischi di malattia e allo sviluppo e alla salute dei bambini*. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 136/1, 25.5.2012

Russo M., Galletti G. C., Bocchini P., Carnacini A., 1988. *Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (Origanum vulgare ssp. hirtum (Link) Iestwaart): a preliminar evaluation of their use in chemotaxonomy by Cluster Analysis. 1. Inflorescences*, Journal agriculture food chemistry, vol. 46, (9):3741 – 3746

Sacchi R., Della Medaglia D.A., Ambrosino M.L., Paduano A., Spagna Musso S.

(2003). *Linee Guida per la Qualità dell'Olio Vergine di Oliva – IV edizione, opera finanziata dall'UE nell'ambito del programma di miglioramento Qualitativo dell'olio di oliva (Reg. CE 2407/03), Portici, pp 1-80*

Said Gharby, Hicham Harhar, Bertrand Matthäus, Zakia Bouzoubaa, Zoubida Charrouf, *The Chemical Parameters and Oxidative Resistance to Heat Treatment of Refined and Extra Virgin Moroccan Picholine Olive Oil,* Journal of Taibah University for Science, Available online 20 July 2015

Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. 2004. *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols.* Journal of Chromatography A. 1504: 113-127

Shaw D., Annett J. M., Doherty B., Leslie J. C., 2007. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. *Phytomedicine*, 14 (9):613-620

Solinas M. (1990). *Caratteristiche degli oli vergini di oliva e marchio di qualità.* L'informatore agrario, 47: 19-25

Sylvestre M., Pichette A., Longtin A., Nagau F., Legault J., 2006. *Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of Croton flavens L. from Guadeloupe.* Journal of Ethnopharmacology , 103:99-102

Tepe B, Daferera D, Sokmen M, Polissiou M, Sokmen A: 2004. *In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of Thymus eigi M.* Zohary et P.H. Davis. Journal of Agriculture Food Chemistry , 52:1132-1137

Tuttolomondo T., DeMastro G. 2004. *Il ruolo della ricerca nella conservazione delle risorse genetiche delle specie officinali in Europa*

Trevisan, M., Krogh, V., Freudenheim, J., Blake, A., Muti, P., Panico, S., Farinaro, E., Mancini, M., Menotti, A., & Ricci, G. (1990). *Research Group ATS-RF2.* Journal of the American Oil Chemists Society, 263, 688–692

Usuki R., Endo Y., Kaneda T. (1984). *Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils.* Agric. Biol. Chem. 48: 991-994

Viola, *L'Olio di Oliva e la Salute*, Consiglio Oleicolo Internazionale, Madrid, 1997

Visioli F., Poli A., Galli C. (2002). *Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil*. *Medical Research Review*, 22(1): 65-75

Vitagliano M. (1982). *Industrie Agrarie*, seconda edizione, UTET Torino

Ultee A., Kets E. P. W., Alberda M., Hoekstra F. A., and Smith E. J., 2000. *Adaptation of the food-borne pathogen Bacillus cereus to carvacrol*. *Archives of Microbiology*, 174:233-238 Pessoa et al., 2002

USDA (2007) *Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland

Siti consultati

<http://www.olivolio.net>

<http://www.oliodelsicilia.com>

Ringraziamenti

Al termine di questi tre anni di dottorato desidero ringraziare tutte le persone che a vario titolo mi hanno accompagnato in questo percorso e senza le quali questo lavoro di tesi non sarebbe stato possibile realizzare. Innanzitutto voglio ringraziare la Prof.ssa Teresa Tuttolomondo per essersi sempre dimostrata disponibile a offrirmi il proprio preziosissimo contributo teorico e metodologico durante tutte le fasi del mio lavoro di ricerca e per essersi sempre prodigata a far sì che potessi fare esperienze costruttive e utili alla mia crescita come dottore di ricerca. Ringrazio il Prof. Claudio Leto, per avermi infuso, con la sua prontezza di spirito, direzione, ottimismo e positività. Il Dottore Salvatore La Bella per essere stato prezioso consigliere; il Dottor Ignazio Cammalleri per avermi sempre sostenuto nei momenti difficili. I dottori Antonella Maggio e Andrea Pace del dipartimento di “Chimica Organica”, per il prezioso contributo umano e professionale. Un ringraziamento speciale poi lo dedico alla Dott.ssa Geanina Bireescu, ricercatore senior dell’Istituto di Ricerca Biologica NIR SBS in Romania, non solo per l’immenso contributo teorico e metodologico offertomi e la sua dedizione a seguirmi nella ricerca durante il mio soggiorno in Romania, ma anche per l’esempio datomi di intelligenza, correttezza, amore e professionalità che costituirà sempre per me un modello da perseguire nella vita e nel lavoro. Voglio, inoltre, ringraziare tutti i colleghi e amici dottorandi con cui ho condiviso lezioni, impegni, preoccupazioni e frustrazioni, oltre a idee e soddisfazioni. In particolar modo Raffaele Leone e Vittorio Di Bella la cui amicizia è stata un tesoro scoperto per caso in questa non facile avventura e senza la quale questo dottorato non sarebbe mai stato altrettanto prezioso. Ringrazio, infine, immensamente la mia famiglia, mio marito Roberto ed il mio grande amico Francesco Christian per non avermi mai fatto mancare il proprio sostegno morale e materiale e senza i quali nulla sarebbe stato possibile.